



T.C.

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİB VE
TOPOİZOMERAZ İNHİBİTÖRLERİ CAMPTOTHESEN VE
ETOPOSİDİN MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA NF-
κB SİNYAL YOLAĞI VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Barış KERİMOĞLU

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK

AKSARAY, 2015



T.C.

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİB VE
TOPOİZOMERAZ İNHİBİTÖRLERİ CAMPTOTHESEN VE
ETOPOSİDİN MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA NF-
κB SİNYAL YOLAĞI VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Barış KERİMOĞLU

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK

AKSARAY, 2015

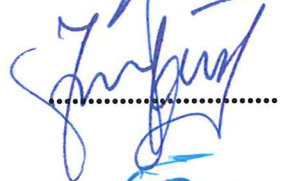
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 122307403 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi, Barış KERİMOĞLU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİB VE TOPOİZOMERAZ İNHİBİTÖRLERİ CAMPTOTHESEN VE ETOPOSİDİN MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA NF-κB SİNYAL YOLAĞI VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK
Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Mustafa YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU
Aksaray Üniversitesi


.....

.....

.....

Teslim Tarihi: 01 Eylül 2015

Savunma Tarihi: 18 Eylül 2015

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Barış KERİMOĞLU

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, proteozom inhibitörü bortezomib ve topoizomeraz inhibitörleri camptothecin ve etoposidin myeloid lösemi hücre hatlarında NF- κ B sinyal yolağı ve apoptozis üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu kapsamda, K562 ve HL-60 hücre hatları kullanılarak bortezomibin NF- κ B sinyal yolağına etkisi hücre canlılık testi MTT ve qRT-PCR (kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Deneyisel çalışmalar Aksaray Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (ASÜBTAM)-Moleküler Biyoloji ve Metabolizma Laboratuvarı ve Hücre Kültür Laboratuvarında yapılmıştır.

Yüksek Lisans öğrencisi Barış KERİMOĞLU'nun tezi olan "Proteozom İnhibitörü Bortezomib Ve Topoizomeraz İnhibitörleri Camptothecin Ve Etoposidin Myeloid Lösemi Hücre Hatlarında NF- κ B Sinyal Yolağı Ve Apoptozis Üzerine Etkilerinin Araştırılması" adlı tez Aksaray Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2014-007 kod nolu "Topoizomeraz inhibitörlerinin NF- κ B sinyal yolağına etkisi" adlı proje ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam sırasında, ihtiyacım olan her an bilgisi, tecrübelerini aktaran ve tüm içtenliğiyle devamlı yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Kamile ÖZTÜRK'e,

Yüksek lisans tez çalışmamın deneysel aşamalarında kullanılan K562 ve HL-60 hücre hatlarını temin ettiğimiz İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yusuf BARAN ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Ali ÜNAL hocalarıma,

Laboratuar çalışmaları sırasında yardımını eksik etmeyen arkadaşım Mehtap TARHAN'a, deneysel çalışmalarım esnasında ihtiyacım olan her an teknik desteklerini esirgemeyen Aksaray Üniversitesi, Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi uzman ve teknik çalışanlarına,

Maddi manevi tüm güçlüklerle karşı her zaman yanımda olan, beni özveri ile yetiştiren, bu günlere gelmemi sabırla bekleyen ve bu noktaya ulaşmamda çok büyük katkısı olan, haklarını asla ödeyemeyeceğimi bildiğim CANIM AİLEME,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
DOĞRULUK BEYANI	i
ÖNSÖZ	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	16
2. LİTARATÜR ÖZETİ	5
2.1 Kanserın Moleküler ve Genetik Temeli.....	5
2.2 Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB)	6
2.2.1 NF-κB protein ailesi.....	7
2.3 NF-κB İnhibitörü/İnhibitör Kappa B (IκB) Protein Ailesi.....	9
2.3.1 Klasik IκB proteinleri.....	10
2.3.2 NF-κB öncülü olan IκB proteinleri	11
2.3.3 Nükleer IκB proteinleri	11
2.4 IKK (IκB Kinaz) Protein Ailesi	13
2.5 NF-κB Sinyal Yolağı	14
2.5.1 NF-κB sinyal iletim yolunun aktivasyonu	14
2.5.2 Klasik aktivasyon yolu.....	15
2.5.3 Alternatif aktivasyon yolu.....	16
2.5.4 Atipik aktivasyon yolları.....	16
2.6 NF-κB Sinyal Yolağının Aktivatörleri ve Hedef Genleri	17
2.7 NF-κB ve Kanser	19
2.7.1 NF-κB ve proliferasyon	20
2.7.2 NF-κB anjiyogenez ve metastaz	21
2.8 Apoptozis ve NF-κB	21

2.8.1	Apoptozis	21
2.8.2	Apoptozun düzenlenmesi	24
2.9	NF-κB ve DNA Hasarı.....	26
2.10	NF-κB İnhibisyonu ile Kanser Tedavisi	29
2.10.1	Proteozom İnhibitörü Bortezomib.....	31
2.11	Topoizomeraaz İnhibitörleri	33
2.12	Hematolojik Maligniteler	35
3.	MALZEME VE YÖNTEM	37
3.1	Kullanılan Kimyasallar	37
3.2	Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Dondurulması.....	37
3.3	Hücre Canlılığının Saptanması	38
3.4	Sitotoksikite Tayini: MTT Test	38
3.5	K562 ve HL-60 Hücre Sayılarının Optimizasyonu.....	39
3.6	K562 ve HL-60 Hücre Hatlarına İlaç Uygulanması	39
3.7	Kombine İlaç Uygulamaları.....	40
3.8	RNA İzolasyonu Yapılması	40
3.9	RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi	41
3.10	Real Time RT-PCR Yöntemi ile Gen İfade Düzeylerinin Saptanması.....	42
3.10.1	Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	42
3.10.2	Kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR).....	42
3.10.3	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ Yöntemi kullanılarak qRT-PCR ürünlerinin miktarının hesaplanması	44
3.11	İstatistiksel Değerlendirme.....	44
4.	BULGULAR	45
4.1	Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Canlılığı.....	45
4.2	Hücre Sayısı Optimizasyonu Çalışmaları	46
4.3	İlaçların Sitotoksik Değerleri	47
4.3.1	Hücre hatlarına Bortezomib uygulaması.....	47
4.3.2	Hücre hatlarına Etoposid uygulanması	49
4.3.3	Hücre hatlarına CPT uygulanması	51
4.4	Kombine İlaç Uygulamasının K562 ve HL-60 Hücre Hatlarında % Canlılığa Etkisi	52
4.5	İzole Edilen RNA'ların Saflığının Kontrolü ve Konsantrasyon Tayini.....	54
4.6	Gen İfade Düzeyleri	55
4.6.1	Bortezomib-Etoposid kombinasyonun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	56

4.6.2	Bortezomib-Etoposid kombinasyonun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	58
4.6.3	Etoposid-Bortezomib kombinasyonun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	61
4.6.4	Etoposid-Bortezomib kombinasyonun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	63
4.6.5	Bortezomib-Camptothecin kombinasyonun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	65
4.6.6	Bortezomib-Camptothecin kombinasyonun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	67
4.6.7	Camptothecin-Bortezomib kombinasyonun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	69
4.6.8	Camptothecin-Bortezomib kombinasyonun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	71
4.6.9	Etoposid-Camptothecin kombinasyonun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	74
4.6.10	Etoposid-Camptothecin kombinasyonun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	76
4.6.11	Camptothecin-Etoposid kombinasyonun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	78
4.6.12	Camptothecin-Etoposid kombinasyonun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları	80
5.	TARTIŞMA-SONUÇ	82
	KAYNAKÇA	97
	ÖZGEÇMİŞ	112

ÖZET

PROTEOZOM İNHİBİTÖRÜ BORTEZOMİB VE TOPOİZOMERAZ İNHİBİTÖRLERİ CAMPTOTHESEN VE ETOPOSİDİN MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA NF-κB SİNYAL YOLAĞI VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nükleer faktör kappa B (NF-κB) tümör oluşumu ile doğrudan ilişkili olan hücre proliferasyonu, apoptozis, angiogenez ve metastazın yanında, bağışıklık sistemi ve inflamasyon gibi birçok önemli olayda rol alan 500'den fazla genin regülasyonunu uyaran bir transkripsiyon faktörüdür. NF-κB'nin hematolojik malignitelerin neredeyse tamamında ve birçok solid tümörde daimi olarak aktif olduğu gösterilmiştir. Bu durum NF-κB sinyal yolağını bloke eden ajanları kanser terapi için iyi bir hedef haline getirir. Ancak NF-κB sinyal yolağını bloke eden ajanların tümör gelişiminde rol alan mekanizmaları baskılamasının yanında inflamasyon ve bağışıklık sistemi gibi mekanizmaları da inhibe etmesi istenilmeyen bir durum olduğu için kombine terapilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında; klinikteki etkinlikleri proteozomu inhibe etmek olan Bortezomib (Bort), topoizomeraz I inhibitörü olan Camptothecin (CPT) ve topoizomeraz II inhibitörü olan Etoposid (Eto) ilaçlarının tek başına ve kombine uygulamalarının kronik myeloid lösemi (K562) ve akut premyeloitik lösemi (HL-60) hücre hatlarında etkin bir kemoterapötik rejim oluşturup oluşturmadığı, Bort'in DNA'da hasar yapıp yapmadı ve buna ek olarak; topoizomeraz inhibitörlerinin NF-κB sinyal yolağını aktive edip etmediğini bulmak ve bu mekanizmaların apoptozis ile olan ilişkisini moleküler düzeyde saptamak amaçlanmıştır. Bu amaçlara ulaşmak için öncelikle tek başına ve ikili ilaç kombinasyonları uygulanan hücre örneklerine MTT test kullanılarak hücre canlılıkları saptanmıştır. Real time RT-PCR yöntemi ile apoptozis, DNA hasarı ve NF-κB sinyal yolağı arasındaki ilişki gen düzeyinde araştırılmıştır. Bu ilişkiyi saptamak için NF-κB1 (p50), Rel-A (p65), ATM, ATR, p53 genlerinin ve apoptozis için anti-apoptotik Bcl-2, pro-apoptotik Bax ve Kaspas-3 genlerinin mRNA düzeyindeki değişimler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, Bort, CPT ve Eto'in tek başına her iki hücre hattında da doz bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığını ve apoptozise neden olduğunu gözlemledik. Ayrıca, Bort'in her iki hücre hattında da ATM, ATR ve p53 genlerinin mRNA düzeyinde kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğunu bulduk. Bu durum Bort'in bilinen NF-κB inhibisyonu yanında DNA'da da hasar yaparak apoptozise neden olabileceğini gösterdi. Buna ek olarak; Bort'in K562 ve HL-60 hücrelerinde Rel-A gen ifadesindeki artışa bağılı olarak NF-κB sinyal yolağını tamamen inhibe etmek yerine NF-κB'nin pro-apoptotik fonksiyonunu açığa çıkardığı bulundu. Çalışmamızda Eto ve CPT'in DNA'da hasar yaptığını ve ayrıca Eto ve CPT'nin, Rel-A ve NF-κB1 gen ifade düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olarak NF-κB sinyal yolağının aktive edebileceğini bulduk. Bort, Eto ve CPT'in birlikte kullanıldığı ilaç kombinasyonları her iki hücrede de sitotoksik etkinin artmasına neden oldu. Hücre canlılığı deneyleri K562 hücrelerinin (%0-20 ye kadar düşen canlılık ile) HL-60 hücrelerine göre kombine terapiye daha iyi cevap verdiğini gösterdi. Tüm ikili kombinasyonların her iki hücre hattında da Bcl-2'de azalma, Bax ve Kaspaz 3 genlerinin ifadesinde artışa neden olması kombine terapinin apoptozise yol açtığını doğruladı ve her iki hücre hattında da Rel-A gen ifadesinde kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğu bulundu. Bu sonuç tüm kombinasyonlarının Rel-A bağımlı NF-κB sinyal yolağına etki ettiğini ve sonuçta Rel-A'nın NF-κB sinyal yolağının pro-apoptotik mekanizmasını tetiklemede elzem olduğu fikrini ileri sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: NF-κB, Apoptozis, DNA Hasarı, Bortezomib, Etoposid, Camptothecin, qRT-PCR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PROTEOSOME INHIBITOR BORTEZOMIBE AND TOPOISOMERASE INHIBITORS CAMPTOTHESIN AND ETOPOSIDE ON NF- κ B SIGNALING PATHWAY AND APOPTOSIS IN THE MYELOID LEUKEMIA CELL LINE

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) is a transcription factor which triggers more than 500 genes regulation that play an important role in many cases such as inflammation and immune system in addition to cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and metastasis. NF- κ B has been shown to be constitutive activation in almost all hematologic malignities and solid tumors. In this case, the blocking agents of NF- κ B signaling pathway have become a good target in the cancer therapy. However, combination treatments should be developed for the undesirable situations in which the blocking agents of NF- κ B signaling pathway inhibit the mechanisms that play a role in tumor progression, in addition to inhibition of mechanisms such as inflammation and immune systems.

In this study, it has been studied whether alone or combined usage of medicines which are bortezomibe (Bort), camptothecin (CPT), etoposide (Eto), which respectively inhibits proteasomes, topoisomerase I, topoisomerase II in clinics, affect chemo-therapeutically on chronic myeloid leukemia (K562) and acut-promyelocytic leukemia(HL-60). Another significant aim of this study is to find out whether bortezomib which gets NF- κ B signaling pathway stopped by inhibiting its proteasome, causes a DNA damage or not. Additionally, we aimed to find whether the inhibitors of topoisomerase, which cause DNA damage, activate NF- κ B signaling pathway or not, and to find the link between these mechanisms and apoptosis in molecular level. To achieve these aims, firstly the viability of cells was found by the application of alone or combined medicines in MTT test. The relation among apoptosis, DNA damages and the NF- κ B signaling pathway was analyzed in gene level by real-time RT-PCR method. To determine the relation, the changes in mRNA level of NF- κ B1 (p50), Rel-A (p65), ATM, ATR, p53 genes, and for apoptosis anti-apoptotic Bcl-2, pro-apoptotic Bax and Caspas-3 was found by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

As a result, we observed that Bort, CPT, and Eto cause a decrease in cell viability and apoptosis on both cell lines according to their dose by finding the changes of cell viability and the expression of apoptotic genes. Interestingly, we found that Bort cause an increase in ATM, ATR and p53 gene expression in mRNA level on both cell lines. Additionally, we have found that Bort triggers the pro-apoptotic function of NF- κ B based on the increase of RelA expression in K562 and HL-60 cells rather than inhibiting NF- κ B signaling pathway. We surprisingly found that Eto and CPT have an effect on Rel-A and NF- κ B1 gene expression and they activate NF- κ B signal pathway while confirming Eto and CPT cause DNA damage. All two-combined application of Bort, Eto and CPT caused an increase in cytotoxic activity. However, we determined that K562 cells had a better response(by %0-20 survivor rate) in cell vitality tests compared to HL-60 cells. All two combination of these medicines on both cell lines cause a decrease in bcl-2 and increase in Bax ve Caspaz 3 genes expression levels. The data confirmed that combined-therapy causes apoptosis. These results assert that all combinations effect NF- κ B signal pathway which is related to Rel-A and eventually, these results support that Rel-A is an essential molecule for triggering the pro-apoptotic mechanism of NF- κ B signal pathway.

Keywords: NF- κ B, Apoptosis, DNA Damage, Bortezomibe, Etoposide, Camptothecin, qRT-PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: NF-κB alt birimlerinin genel yapısı	9
Şekil 2.2: NF-κB alt birimleri ve IκB proteinlerinin genel yapılarının şematik olarak gösterimi.....	13
Şekil 2.3: NF-κB sinyal iletim yolu.	15
Şekil 2.4: NF-κB sinyal iletim yolunun aktivasyonu.	17
Şekil 2.5: NF-κB'nin hedef genleri	18
Şekil 2.6: NF-κB'nin etkilediği mekanizmalar.	20
Şekil 2.7: Apoptozisde etkili olan iki yolak.....	23
Şekil 2.8: NF-κB uyarılması.	25
Şekil 2.9: DNA hasarına yanıt esnasında ATM ve ATR'nin aktivasyonu.....	26
Şekil 2.10: DNA hasarın yanıtta apoptoz mekanizması.	27
Şekil 2.11: Ubikitin-proteozom yıkım yolu.	32
Şekil 2.12: Bortezomib'in moleküler yapısı.	33
Şekil 3.1: TaqMan probun çalışma prensibi.	43
Şekil 3.2: qRT-PCR'ın amplifikasyon basamakları.	44
Şekil 4.1: K562 hücre hattının 40X ve 20X objektiflerdeki görüntüsü.	45
Şekil 4.2: HL-60 hücre hattının 40X ve 20X objektiflerdeki görüntüsü.	45
Şekil 4.3: K562 hücre hattı için absorbans-hücre sayısı ve standart eğri grafiği.	46
Şekil 4.4: HL-60 hücre hattı için hücre sayısı optimizasyon grafiği ve standart eğrisi grafiği.	47
Şekil 4.5: Bort konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık üzerine etkisini gösteren grafik.	48
Şekil 4.6: Bort konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık üzerine etkisini gösteren grafik.	49
Şekil 4.7: Eto konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık üzerine etkisini gösteren grafik.....	50
Şekil 4.8: Eto konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık üzerine etkisini gösteren grafik.....	50
Şekil 4.9: CPT konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık üzerine etki grafiği.	51
Şekil 4.10: CPT konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık üzerine etki grafiği.	52

Şekil 4.11: Tüm ikili ilaç kombinasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık etki grafikleri.....	53
Şekil 4.12: Tüm ikili ilaç kombinasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık etki grafikleri.....	54
Şekil 4.13: Total RNA' ların %1'lik agaroz jel görüntüsü.	55
Şekil 4.14: Bort-Eto kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.....	57
Şekil 4.15: Bort-Eto kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	58
Şekil 4.16: Bort-Eto kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.	59
Şekil 4.17: Bort-Eto kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	60
Şekil 4.18: Eto-Bort kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.....	61
Şekil 4.19: Eto-Bort kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	62
Şekil 4.20: Eto-Bort kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.....	63
Şekil 4.21: Eto-Bort kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	64
Şekil 4.22: Bort-CPT kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.	65
Şekil 4.23: Bort-CPT kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	66
Şekil 4.24: Bort-CPT kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.	67
Şekil 4.25: Bort-CPT kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	69
Şekil 4.26: CPT-Bort kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.	70
Şekil 4.27: CPT-Bort kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	71
Şekil 4.28: CPT-Bort kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.....	72
Şekil 4.29: CPT-Bort kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	73
Şekil 4.30: Eto-CPT kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.....	74
Şekil 4.31: Eto-CPT kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	75

Şekil 4.32: Eto-CPT kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.....	76
Şekil 4.33: Eto-CPT kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	77
Şekil 4.34: CPT-Eto kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.....	78
Şekil 4.35: CPT-Eto kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	79
Şekil 4.36: CPT-Eto kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri.....	80
Şekil 4.37: CPT-Eto kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri.....	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1: NF- κ B gen/protein ailesinin sınıflandırılması.....	7
Çizelge 3.1 cDNA sentez için gerekli PCR programı.....	42
Çizelge 3.2. qRT-PCR reaksiyon koşulları.....	44
Çizelge 4.1: Bort konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri.....	48
Çizelge 4.2. HL-60 hücre hattında Bort konsantrasyonlarının % canlılık ve standart sapma değerleri.....	49
Çizelge 4.3. K562 hücre hattındaki Eto konsantrasyonlarının % canlılık ve standart sapma değerleri.....	49
Çizelge 4.4: Eto konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri.....	50
Çizelge 4.5: CPT konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri.....	51
Çizelge 4.6: CPT konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri.....	52
Çizelge 4.7: İlaçların K562 ve HL-60 hücre hattındaki IC ₅₀ dozları.....	53

SİMGELER DİZİNİ

κ	Kappa
α	Alfa
β	Beta
ϵ	Epsilon
γ	Gamma
δ	Sigma
mL	Mililitre
cm ²	Santimetre kare
μ L	Mikrolitre
mg	Miligram
μ M	Mikromolar
nM	Nanomolar

KISALTMALAR DİZİNİ

AML	Akut Myeloid Lösemi
Apaf-1	Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM-and Rad3-İlişkili
BAFF	B Lenfosit Aktive Edici Reseptör
Bcl-2	B Hücresi Lenfoma Geni 2
Bcl-3	B cell CLL/Lymphoma 3
BCR	B Hücresi Reseptörü
Bort	Bortezomib
CD40L	CD40 ligand
Chk1	Checkpoint Kinaz 1
CPT	Camptothecin
DMSO	Dimetilsülfoksit
E3	Ubikitin Ligaz
Eto	Etoposid
FasL	Fas Ligand
FBS	Fetal Bovine Serum
GRR	Glisin Aminoasidi Bakımından Zengin Bir Bölge
HL-60	Akut Premiyeloid Lösemi Hücre Hattı
IAP	Apoptoz Protein İnhibitörleri
IKK	İnhibitör kappa Kinazlar
IL-1	İnterlökin 1
IκB	İnhibitör kappa B
K562	Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hattı
KLL	Kronik Lenfoid Lösemi
KML	Kronik Myeloid Lösemi
LPS	Lipopolisakkaritler
LT-β	Limfotoksin Beta Reseptör
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MTT	4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NEMO	NF-κB Esansiyel Modülatör
NF-κB	Nükleer faktör kappa B

NIK	NF- κ B'yi İndükleyen Kinaz
NLS	Nükleer Lokalizasyon Dizisi
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
qRT-PCR	Kantitatif Real Time PCR
RHD	Rel Homoloji Domain
RPA	Replikasyon Protein A
RUP	Regulated Ubiquitin/Proteasome-Dependent Processing
SUMO	Ubikitin İle İlişkili Küçük Düzenleyici
TCR	T Hücresi Reseptörü
TLR	Toll Benzeri Reseptörler
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör- α
Top I	Topoizomeraz I
Top II	Topoizomeraz II
UBC	Ubikitin İle Bağlanan Enzim
UV	Ultraviyole
VDAC	Voltaj Bağımlı Anyon Kanalına
XIAP	X'e Bağlı Apoptoz Baskılayıcı Protein
β -TrCP	β -Transdusin Tekrarı İçeren Proteinler

GİRİŞ

Kanser, sınırsız hücre proliferasyonu, apoptoza direnç, angiogenesis, immortalizasyon, invazyon ve metastaz gibi karakteristik özellikleri olan genetik bir hastalıktır. Kanser hücrelerinin gelişimi ve yaşaması pro-apoptotik ve anti-apoptotik sinyal moleküllerinin dengesine bağlıdır. Bu moleküler mekanizmalarda görev alan sinyal yolaklarının bozulması kanser gelişiminde etkin bir rol oynar [1]. Son yıllarda Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolağının kanser gelişiminde kritik öneminin anlaşılması, bu sinyal yolağına olan ilgiyi artırmakta ve araştırmacıları yoğun bir şekilde çalışılmaya itmektedir [2].

NF- κ B ilk olarak B hücrelerinde bulunan bir transkripsiyonel faktörü olarak bulunmuştur. İmmünoglobulin kappa hafif zincirinin enhancer elementlerine bağlı bulunduğu için bu ismi almıştır. Başlangıçta B hücrelerine özgü bir transkripsiyonel faktör olarak düşünülmüş olmasına karşın, sonraları her hücre tipinde bulunan ve yapısal olarak ilişkili birkaç proteinden oluşan bir aile (NF- κ B/Rel ailesi) olduğu gösterilmiştir. İnsanda NF- κ B transkripsiyonel faktör ailesi NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), cRel, Rel-A (p65) ve RelB olmak üzere beş farklı proteinden oluşur. Bu proteinler farklı kombinasyonlara girerek homodimer ya da heterodimer formlar oluştururlar. Bu dimerik formlar ise DNA'da κ B olarak da bilinen korunmuş hedef bölgelere bağlanarak gen ifadesini düzenlerler [2-4].

Rel/ NF- κ B proteinlerinin oluşturduğu farklı dimerik formlar, uyarılmamış hücrelerin sitoplâzmasında inhibitör κ B olarak adlandırılan farklı inhibitör proteinlere (I κ B α , β , ϵ) bağlı bir şekilde, inaktif formda bulunurlar. NF- κ B aktivasyonuna neden olan birçok uyarıcı, I κ B'nin fosforilasyonunu sağlayarak onun proteozomda degrade olmasına ve sonuçta sitoplâzmada serbest kalan NF- κ B dimerinin nükleusa geçmesine ve hedef genlerin promotoruna bağlanarak transkripsiyonun başlamasına imkân sağlar. NF- κ B aktivasyonunda farklı dimerik formlar, uyarıcı ve hücre tipine göre değişen, farklı genlerin transkripsiyonunu düzenlerler [2].

NF- κ B aktivasyonu başlıca klasik (canonical) ve alternatif (non-canonical) yol olmak üzere iki ana yolakla gerçekleşir. Klasik NF- κ B aktivasyon yolağı birçok hücre tipinde görülen ve p65-p50 heterodimerini gerektiren yolaktır.

Bu yolakta I κ B α , inhibitör kappa kinazlarla (IKK; inhibitör kappa kinazlar IKK α /IKK1, IKK β /IKK2 ve IKK γ /NEMO şeklinde heterodimerler halinde bulunur) fosforlanır.

Serbest hale geçen p65/p50 heterodimeri nükleusa geçerek hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır. Alternatif NF- κ B yolağında ise bu yolağa özgü bir kinaz [5], IKK α 'yı aktive eder sonra bu kinaz p100'ü fosforlar ve sonuçta p52-RelB heterodimeri oluşur. Bu dimerik form nükleusa geçerek hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır. Ayrıca bu iki yolağa ek olarak atipik bir yolakdan daha bahsedilir [2-4]. Atipik yolak özellikle DNA hasarı gibi hücrede oluşan stres durumlarında devreye girerek NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonunu başlatır.

NF- κ B aktivasyonu oldukça sıkı kontrol altında tutulur. Normal hücrelerde, sadece uygun uyarıcıdan sonra aktive olur ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır. NF- κ B, proinflamatuvar sitokinler, T ve B hücre mitojenleri, bakteri ve lipopolisakkaritler (LPS), virüsler, viral proteinler, fiziksel ve kimyasal stresler gibi birçok uyarıcı tarafından aktive olur [6, 7]. İyonize radyasyon ve DNA hasarına neden olan kemoterapik ajanların da NF- κ B aktivasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [8]. NF- κ B aktivasyonu sağlıklı hücrelerde indüklenebilir bir durumdur fakat bu durum çok kısa sürer. Tümör hücrelerinde ise özellikle proto-onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar NF- κ B aktivasyonunda bozulmalara neden olurlar. Böyle durumlarda NF- κ B devamlı aktif durumda kalır ya da regülasyonu bozulduğu için hedef genlerin ifadesi bozulur [9].

Son yıllarda, NF- κ B'nin hücre proliferasyonu, apoptozis, angiogenez, inflamasyon ve metastaz gibi birçok önemli olayda rol alan, 500 den fazla genin regülasyonuna katıldığı rapor edilmiştir. NF- κ B'nin özellikle hücre proliferasyonunda ve apoptozisin inhibisyonunda rol alması tümörejenizisile doğrudan ilişkilidir [7]. Bunu pro-apoptotik genleri baskılayarak, anti-apoptotik genleri indükleyerek, c-myc ve siklin D1 gibi hücre çoğalmasına neden olan birçok onkogenik sinyali indükleyerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca tümör hücrelerinin invazyon, metastaz ve anjiyogenezinde de rol alan genlerin transkripsiyonunu indüklediği rapor edilmiştir [7, 10, 11]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, NF- κ B'nin hematolojik malignitelerin nerdeyse tamamında ve bazı solid tümörlerde daimi olarak aktif olduğunu göstermiştir [12, 13].

Bu sonuç, NF- κ B'nin tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığını ileri sürerken, kanser terapisi içinde umut verici bir terapötik hedef haline getirmektedir. Kemoterapi ve radyoterapi uygulanmış kanser hücrelerinde gözlenen apoptozise direnç mekanizmasında da NF- κ B'nin bu tümörojenik fonksiyonunun rol aldığı ileri sürülmüştür [14].

Bu nedenle NF- κ B inhibisyonunu temel alan kombine ya da tek başına terapilere gidilmesinin kanser tedavisinin başarısını artıracak ileri sürülmüştür [9, 15]. Ancak son yıllarda, NF- κ B'nin yaygın olarak bilinen tümörojenik fonksiyonuna zıt yönde, hücre ve uyarana bağlı olarak apoptozisi indükleyebileceği ve bir tümör baskılayıcısı gibi görev yapabileceği de rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, özellikle kemoterapik ajanlarla muamele edilmiş kanser hücre hatlarında, NF- κ B'nin anti-apoptotik hedef genleri baskılaması sonucu apoptozisde artışa neden olduğu gözlenmiştir [16, 17].

Bugün NF- κ B aktivasyonunun tümörojenesis açısından doğuracağı bu çelişkili sonuçlar, NF- κ B sinyal yolağıyla ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiğini gösterirken, NF- κ B aktivasyonun hücre tipi, aktivasyon tipi ve uyarana bağlı olarak değişebileceğini de göstermektedir. Aynı zamanda kanser terapide karşılaşılabilecek zorluklara da işaret etmektedir. Bu nedenle özellikle son yıllarda farklı kanser tiplerinde, hatta aynı tip kanserin farklı gelişim basamaklarında NF- κ B sinyal yolağının daha iyi tanımlanmış olması gerektiği vurgulanmış, böylece doğru kemoterapik tedavinin seçilmesi ve uygulanmasının mümkün olabileceği ileri sürülmüştür [15, 18].

Bugün klinik uygulamalarda etkinliği NF- κ B sinyal yolağını inhibe eden ilaçlardan birisi bortezomibdir. Bortezomib (PS-341/Velcade) Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından multiple myeloma tedavisinde kullanılması onaylanmış bir proteozom inhibitörüdür. Bortezomibin proteozomları inhibe etmesi, hücre döngüsünün durmasına, apoptozu ve anjiyogenezi inhibe eden çeşitli sinyal iletim yollarının bozulmasına neden olur. Yapılan çalışmalarda, bortezomibin transkripsiyonel faktör NF- κ B'nin aktivasyonunu inhibe ettiği de görülmüştür. Bortezomibin apoptozu indüklemesi ve proliferasyonu baskılaması hücrelerin kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapiye karşı duyarlılıklarının artmasına da sebep olmaktadır [19].

Topoizomeraz inhibitörleri günümüzde kanser terapide kullanılan ve etkinliği bilinen ilaçların diğer bir sınıfıdır. Topoizomerazlar, replikasyon, transkripsiyon ve rekombinasyon gibi olaylarda DNA'daki topolojik stresi ortadan kaldırmakla görevli enzimlerdir [20]. Topoizomeraz enzimleri, topolojik stresi ortadan kaldırmak için DNA'da tek zincir kırıklarına neden olan Tip I ve DNA'da çift zincir kırıklarına neden olan Tip II olmak üzere iki gruba ayrılırlar [20, 21].

Kanser hücreleri gibi sürekli bölünen hücrelerde topoizomeraz aktivitesi hayati önem taşıdığı için, topoizomeraz inhibisyonu kanser tedavisinde etkin yöntemlerden birisidir. Bugün birkaç topoizomeraz inhibitörünün (camptothecin, etoposid, dauxorubisin vs) klinikte bazı kanser türlerinde tedavi amaçlı kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır [8, 22].

Yapılan bu tez çalışmasında; klinikteki etkinlikleri proteozomu inhibe etmek olan bortezomib, topoizomeraz I inhibitörü olan camptothecin ve topoizomeraz II inhibitörü olan etoposid ilaçlarının tek başına ve kombine uygulamalarının kronik myeloid lösemi (K562) ve akut premyelotik lösemi (HL-60) hücre hatlarında etkin bir kemoterapötik rejim oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmada proteozomu inhibe ederek NF- κ B sinyal yolağını baskıladığı bilinen bortezomibin DNA'da hasar yapıp yapmadığını bulmak, buna ek olarak DNA'da hasar yaptığı bilinen topoizomeraz inhibitörlerinin NF- κ B sinyal yolağını aktive edip etmediğini bulmak ve bu mekanizmaların apoptozisle olan ilişkisini moleküler düzeyde saptamak tezin diğer önemli amaçlarından birisidir. Bu amaçlara ulaşmak için ilk olarak tek başına ve ikili ilaç kombinasyonları uygulanan hücre örneklerine MTT test kullanılarak hücre canlılıkları saptanmıştır. İkinci basamakta aynı örneklerden RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi yapıldıktan sonra kantitatif real time RT-PCR yöntemi ile apoptozis, DNA hasarı ve NF- κ B sinyal yolağı arasındaki ilişki gen düzeyinde araştırılmıştır. Bu ilişkiyi saptamak için NF- κ B1 (p50), Rel-A (p65), ATM, ATR, p53 genlerinin ve apoptozis için anti-apoptotik Bcl-2, pro-apoptotik Bax ve Kaspas-3 genlerinin mRNA düzeyindeki değişimler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak saptanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kanserin Moleküler ve Genetik Temeli

Kanser, sınırsız hücre proliferasyonu, apoptoza direnç, anjiogenesis, immortalizasyon, invazyon ve metastaz gibi karakteristik özellikleri olan genetik bir hastalıktır. Kanser önemli bir sağlık problemi olup halen dünyadaki ölümlerin 1/8'inden sorumlu tutulur. Yapılan çalışmalarda 2020 yılında kadar kanser insidansının yaklaşık %55 oranında artacağı rapor edilmektedir [1, 23].

Kanser oldukça kompleks bir hastalıktır [24, 25]. Her hastalık için değişen oranlarda genetik temelin olduğu düşünülmektedir. Bu hastalıklar arasında kanserde 2010 Mayıs ayına kadar etkisi ispatlanmış gen sayısı 18,485 olarak belirlenmiştir [26]. Hücresel mekanizmalar genomik yapının korunması ve DNA'da oluşabilecek hasarın tamirinden sorumludur. Tamir mekanizmasında rol alan proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar tamir edilemediği zaman hücreye anormal genetik yapı kazandırır. Öte yandan; genomik yapıda oluşan her mutasyon kansere yol açmaz ama bazı genlerde meydana gelen mutasyonlar kanserle sonuçlanır [27].

Bazı kompleks kanser türlerinde yapılan genetik çalışmalar kanser genomunun oldukça karmaşık olduğunu ve her tümördeki somatik değişimlerin oranının kanser tipine bağlı olduğunu göstermiştir [28-31]. Bu karmaşıklığın gen değişimlerinin kendisinden ziyade biyolojik sinyal yolları tarafından önemli derecede azaltılacağı düşünülmektedir [32]. Bu durum sinyal yollarının karmaşık bağlantılarında değişimler önermektedir.

Kanser hücrelerinde meydana gelen somatik mutasyonlar genetik kararsızlığın bir sonucudur ve kanserin çok az bir kısmı germline mutasyonlardan oluşur [33]. Mutasyonların kanser hastalarının yaşamları boyunca kanser hücre genomunda biriktiği bulundu. Mutasyon oranları toksik kimyasallar, ultraviyole de dâhil çeşitli radyasyon formları gibi mutajenlere bağlı olarak artar. Bu maruz kalma durumu deri kanseri, akciğer ve karaciğer kanserleri gibi kanser türlerinin oranlarının artması ile ilişkilidir [34]. Ayrıca bu ajanlar inflamatuvar cevabı içeren inflamasyon, NF-κB ve kanser arasında güçlü bir bağlantı olduğunu göstermektedir [34-36].

Hücresel sinyal iletim yolları, normal doku gelişimi, homeostazi ve hücre fonksiyonları için kritik öneme sahiptir. Kritik patolojik durumlarda, hücre yaşamı ve ölümü arasındaki hassas dengenin regülasyonu bozulur. Regülasyonu bozulan hücrelerin ölmesi durumunda dejenerasyon, immün yetersizlik gibi rahatsızlıklar ortaya çıkarken, diğer taraftan daha az sayıda hücre ölümünün meydana gelmesi durumunda ise otoimmün hastalıklardan kansere kadar değişen farklı grup hastalıklar meydana gelebilmektedir [37]. Bu moleküler mekanizmalarda görev alan sinyal yollarının bozulması kanser gelişiminde etkin bir rol oynar [1].

Kanser hücreleri hücre proliferasyonunu sınırlandıran ve immün sağkalım cevabından kaçan apoptozis gibi mekanizmalardan kaçarak bir anjiogenik yanıt ortaya çıkarır. Bu özellikler normal hücrelerde yaşam, hareketlilik, hücre proliferasyonunun kontrolü NF- κ B sinyal yolağı gibi hücre sinyal yollarındaki değişiklikler aracılığıyla başlatılır [38].

NF- κ B ilk olarak hücrenin bağışıklık sisteminin bir parçası olarak tanımlanmış olmasına rağmen kanser, diyabet ve aterosklerozis gibi hastalıklarda da rol oynadığı belirlenmiştir. Bu durumun anlaşılmasının ardından NF- κ B sinyal kontrolü ve mekanizmasının keşfi üzerine yapılan çalışmalar ilgi odağı haline gelmiştir [34-36].

2.2 Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)

NF- κ B, ilk kez 1986 yılında Sen ve Baltimore tarafından B lenfositlerin gelişimini modüle eden transkripsiyon faktörlerinin araştırılması sırasında, immünglobulin kappa hafif zincir geninin regülatör DNA dizisine bağlanarak genin transkripsiyonunu artıran bir transkripsiyonel faktör olarak keşfedilmiştir [39]. Önceleri sadece B lenfositlere özgü bir transkripsiyonel faktör olarak düşünülse de, sonraları neredeyse bütün hayvan hücre tiplerinde bulunan bir transkripsiyonel faktör ailesi olduğu bulunmuştur [40].

NF- κ B; stres, sitokinler, serbest radikaller, UV radyasyon, okside LDL, bakteriyel ya da viral antijenler, mitojenler gibi çeşitli uyaranlara karşı ortaya çıkan hücresel yanıt, inflamasyon ve ilk savunma sistemi ile ilişkilendirilen, neredeyse bütün hayvan hücre tiplerinde bulunan, bir transkripsiyon faktörüdür [40]. Sitoplazmada inhibitör κ B (I κ B) protein ailesinin bir üyesi ile birlikte inaktif halde bulunur. I κ B aktivasyonu uyarıcılardan gelen sinyallere bağlı olarak kinazlar tarafından gerçekleştirilir.

Uyarıcıların İκB Kinaz (IKK) N terminalinden fosfatlayarak aktive etmesi sonucunda NF-κB sinyal yolağının aktivitesi tetiklenir. Aktive olan IKK, İκB'nin fosforilasyonuna ve ubiquitinasyonuna, sonrasında da yıkımına yol açar. İκB'den ayrılan NF-κB alt ünitesi nükleusa transloke olarak mRNA transkripsiyonunu teşvik eder [41, 42]. NF-κB bu mekanizma ile hücre proliferasyonu, anjiyogenez, metastaz, tümör gelişimi, inflamasyon ve apoptozun baskılanması gibi kanser gelişimine önemli katkı sağlayan çeşitli hücresel süreçlerle ilgili genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu düzenler [40, 43]. Buna ek olarak, NF-κB sinyal yolağının anormal şekilde düzenlenmesi pek çok kanser türünde gözlemlendiği için kansere karşı gelişen kemoterapi ile radyoterapiye dirençten sorumlu tutulmaktadır [41, 44].

2.2.1 NF-κB protein ailesi

Memelilerde, NF-κB ailesinin 5 üyesi vardır. Bunlar; Rel-A (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p50; öncülü p105) ve NF-κB2 (p52; öncülü p100)'dir. Bu proteinler homo- ve heterodimer kompleksler halinde bulunurlar (şekil 2.1) [40]. Rel/NF-κB transkripsiyon faktörlerinin tüm üyeleri, amino terminal uçlarında “kappa B” DNA bağlanma bölgesi ile dimerizasyondan sorumlu olan ve karboksi terminal uçlarındaki transkripsiyon aktifleyici bölgeleri için gerekli olan, yaklaşık 300 aminoasit uzunluğunda, spesifik, yüksek derecede korunmuş, ortak bir DNA bağlanma ve dimerizasyon bölgesi (Rel Homoloji Domain (RHD) taşır. Yapısal olarak önemli diğer bir bölge olan nükleer lokalizasyon dizisi (NLS) ise NF-κB dimerlerinin çekirdeğe geçişinden sorumludur.

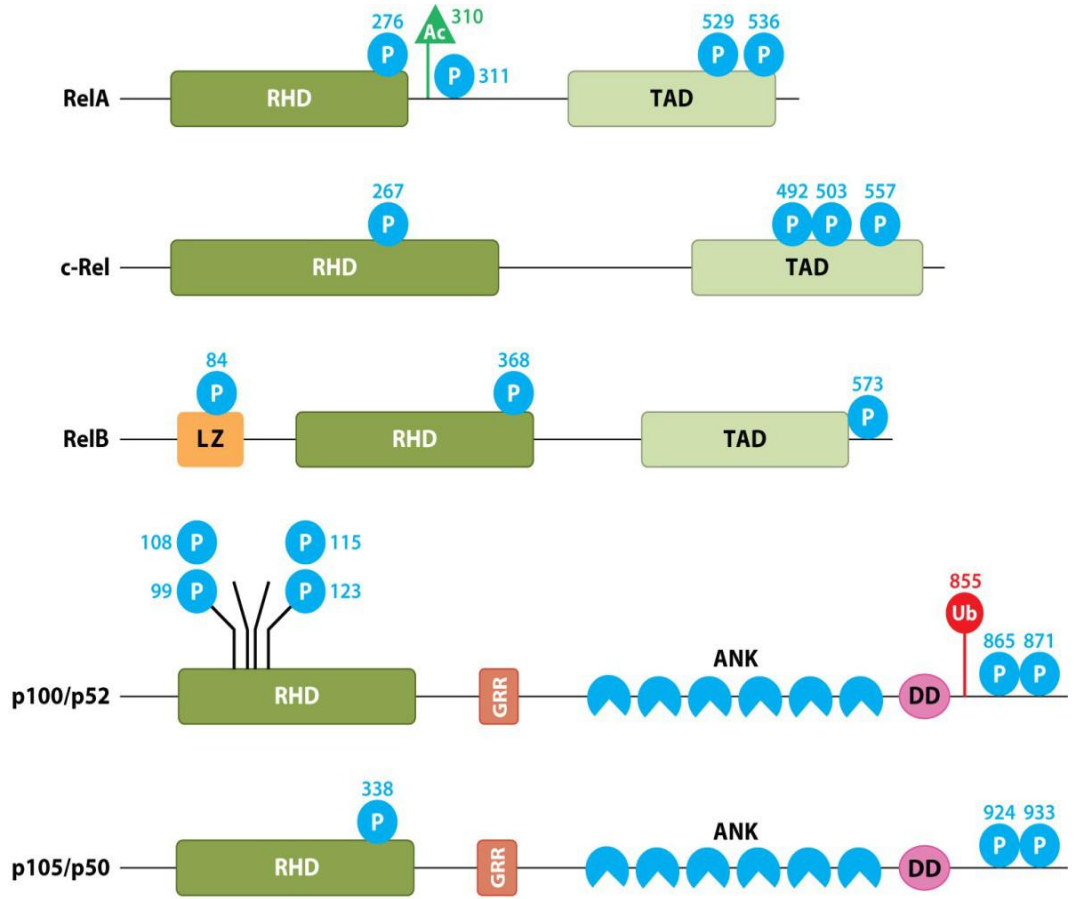
Çizelge 2.1: NF-κB gen/protein ailesinin sınıflandırılması [40].

	Sınıf I		Sınıf II		
Gen	NF-κB1	NF-κB2	REL-A	RELB	REL
Protein	NF-κB1(p50)	NF-κB2 (p52)	Rel-A (p65)	RelB	c-Rel
Diğer Adı	p105→ p50	p100→ p52	p65	IREL, I-REL	C-Rel
Lokusları	Chr.4 q24	Chr.10 q24	Chr.11 q13	Chr.19 q13.2-19 q13	Chr.2 p13-p12
Protein Boyutu	50 kDa	52 kDa	65 kDa	68 kDa	69 kDa
Aminoasit Sayısı	940 aa		551aa	582aa	587aa

Rel proteinleri, transaktivasyon özelliklerine ve sentezlenme şekillerine göre kendi içlerinde de temel olarak iki sınıfa ayrılırlar. Bunlardan ilki, Rel-A(p65), RelB ve c-REL proteinlerinden oluşur. Tüm omurgalılarda, Rel proteinleri homodimer veya heterodimer olarak görülebilen, RelB proteini yalnızca heterodimer formunda bulunur. NF- κ B proteinlerinin yapısında ortak olarak bulunan RHD dışında, sadece Rel-A, RelB ve c-Rel alt birimlerinin yapısında transkripsiyonal aktivasyon bölgesi (TAD) vardır (Şekil 2.1) [40, 45].

İkincisi ise NF- κ B1 (p105) ve NF- κ B2 (p105)'ten meydana gelir. Bu proteinler, büyük öncüller (p105 ve p100) olarak sentezlenir. Amino terminal uçlarında bulunan RHD'ye ilave olarak C terminal uçlarında "Ankrin Tekrar Dizileri" taşırlar. Ubikitin aracılı proteolitik süreçle bu bölgeler yıkıma uğrar ve olgun DNA bağlanma birimleri (p50 ve p52) oluşur. Bu yeni ürünler de RHD bölgeleri taşırlar ancak transkripsiyon aktifleyici bölgeleri yoktur [46]. p50 ve p52 alt birimlerinin yapısında TAD bulunmamaktadır. Bunun yerine, glisin amino asidi bakımından zengin (GRR) bir bölge vardır. Sadece p50 ve/veya p52 alt birimlerinden oluşan dimerler çekirdeğe geçip DNA'ya bağlanabilir; ancak hedef genlerinin ekspresyonunu uyarmak yerine transkripsiyonun baskılanmasına neden olur. Transkripsiyon aktivatörü olan NF- κ B dimeri oluşumunda, genellikle TAD içeren RelA, RelB ve c-Rel alt birimlerinden birinin olması gerekir [45].

Bunlara ek olarak, sadece RelB'nin amino-ucunda bir lösin fermuarı (LZ) motifi vardır. Bu bölge transkripsiyonun düzenlenmesinde önemli bir role sahip olup, fosforilasyon ve asetilasyonlar gibi post-translasyonel modifikasyonlar ile RelB'nin DNA'ya bağlanma ve transkripsiyonu düzenlemesinde görev alır (Şekil 2.1) [47].



Şekil 2.1: NF-κB alt birimlerinin genel yapısı: RHD, Rel homoloji bölgesi; TAD, transkripsiyonal aktivasyon bölgesi; LZ, lösin fermuarı motifi; GRR, glisin amino asidi bakımından zengin bölge; ANK, ankyrin tekrarları bölgesi; DD, dimerizasyon bölgesi. Translasyon sonrası meydana gelen modifikasyonlardan P, Fosforilasyon; Ac, Asetilasyon ve Ub, Ubikitinasyon [48].

2.3 NF-κB İnhibitörü/İnhibitör Kappa B (IκB) Protein Ailesi

Uyarılmamış hücrelerin sitoplazmasında NF-κB protein dimerleri, inhibitör protein ailesinin bir üyesine bağlı olarak inaktif formda tutulur. Bu bağlanma dimerlerin nükleusa geçerek transkripsiyonu düzenlemesini yapısal olarak engeller.

IκB protein ailesi; IκBα, IκBβ, IκBε, IκBδ, Bcl-3, IκBNS ve Rel proteinlerinin öncülü olan p105 ve p100 olmak üzere 8 üyeden oluşmaktadır (Şekil 2.2). Bu proteinler yapısal ve işlevsel özelliklerine göre klasik, NF-κB öncülü ve nükleer IκB proteinleri olarak üç sınıfa ayrılmaktadır [40, 45, 49].

2.3.1 Klasik IκB proteinleri

Klasik IκB proteinleri IκBα, IκBβ ve IκBε'dan oluşur. Bu proteinler yapılarında yaklaşık 33 amino asitten oluşan, arka arkaya dizilmiş, sarmal şeklinde tekrar motiflerinden oluşmuş ankrin tekrarlarını içerir (Şekil 2.2) [45]. Klasik IκB proteinlerinin fosforilasyonu yapılarındaki serin amino asitleri üzerinden gerçekleştirilir. Fosforilasyona uğramış bu bölge, ubiquitin ligaz (E3) reseptörü alt birimi olan β-TrCP (β-transdusin tekrarı içeren proteinler) tarafından tanınır. Bu durum IκB proteinlerinin ubiquitin-protein ligaz E3 tarafından poli-ubikitinlenmesine ve sonrasında 26S proteozomda yıkılmasına neden olur [50].

Klasik IκB proteinlerinin karboksil ucunda “PEST (P, prolin; E, glutamik asit; S, serin; T, treonin)” olarak adlandırılan bir bölge daha vardır. Esnek bir yapıya sahip olan bu bölge, birçok proteinde bulunmaktadır. Varlığı, hücre içindeki proteinlerin çok hızlı yapılıp yıkıldığına göstergesidir [51]. PEST bölgesi, aynı zamanda NF-κB:DNA komplekslerinin ayrılması için de gereklidir [52].

IκB proteinlerinin yapıları birbirine benzemektedir; ancak her birinin kendi bağlanma özellikleri ve NF-κB proteinleri tarafından farklı transkripsiyonel düzenlenmeleri vardır [53]. IκB'nin izoformları Rel proteinlerinin farklı kombinasyonlarına bağlanır. Örneğin IκBα ve IκBβ, öncelikli olarak p50:p65 ve p50:c-Rel heterodimerlerini tercih ederken IκBε, sadece p65 ve c-Rel hetero- ve homodimerleri ile etkileşimdedir; Bcl-3 ise p50 ve p52 homodimerlerine bağlanır [53-55]. Farklı kombinasyonları olan dimerler, DNA üzerinde farklı bölgelere bağlanarak farklı genlerin ekspresyonunu düzenler [56].

Klasik IκB proteinlerinin proteozom aracılığı ile yıkımı farklı kinetiklere sahiptir. IκBα, tümör nekrozis faktör-α (TNF-α) ve LPS gibi inflamasyon ile ilişkili uyaranlara çok hızlı cevap verip parçalanır ve NF-κB'ye bağımlı negatif geri bildirim döngüsü yoluyla yeniden sentezlenir. Yeni sentezlenen IκBα, çekirdeğe geçer ve orada bulunan asetillenmiş RelA:p50 heterodimerleri ile birleşerek onları sitoplâzmaya geri taşır [57]. Bu nedenle IκBα olmadığında, TNF-α veya LPS tarafından uyarımın ardından oluşan NF-κB aktivitesi sonlandırılmaz [58]. IκBβ ve IκBε'un yeniden sentez ve yıkım hızındaki farklılıklar, NF-κB proteinlerinin sitoplâzma ve çekirdekteki konsantrasyonlarına bağlı olarak aktivitelerinin düzenlendiği düşünülmektedir [48, 59].

2.3.2 NF- κ B öncülü olan I κ B proteinleri

I κ B proteinlerinin diğerk bir sınıfı, NF- κ B/Rel proteinlerinin öncülü olan p100 ve p105'ten oluşur (Şekil 2.2A) [60]. NF- κ B'nin inhibitörü olan bu iki protein, p52 ve p50 alt birimlerinin öncülüdür. p105 ve p100 moleküllerinin karboksil uçlarında, klasik I κ B proteinlerine benzer şekilde ankirin tekrarlarından oluşan bir bölge bulunur. Bu ankirin tekrarları bölgesi bazı çalışmalarda sırasıyla I κ B γ ve I κ B δ olarak ifade edilmektedir. TNF- α , IL-1 gibi sitokinler ile uyarı olduğunda proteozom aracılığı ile p105 molekülünün karboksil ucunun bir kısmı uzaklaştırılarak p50 alt birimi oluşturulur [61].

P100, p105 molekülünden farklı olarak, NF- κ B alt birimlerimden RelB ile direkt etkileşime girer. Klasik I κ B proteinleri olmadığında, p100'ün bol miktarda bulunması ayrıca NF- κ B'nin alt birimlerinin çoğunun sitoplâzmada olmasından dolayı p100'ün NF- κ B alt birimlerinin oluşturduğu dimerleri inhibe etmede görevli olduğu söylenebilir [62, 63]. Birçok farklı NF- κ B dimeri, p100 veya p105 alt birimlerine bağlanabilir. Bu nedenle, p100 ve p105 moleküllerinin bir sinyal aracılığı ile yıkılması sonucunda, farklı NF- κ B dimerleri serbest kalır. Ortaya çıkan bu farklı özellikteki ve çok sayıdaki dimer grubu, farklı birçok genin aktivitesinin düzenlenmesine aracılık eder [64].

2.3.3 Nükleer I κ B proteinleri

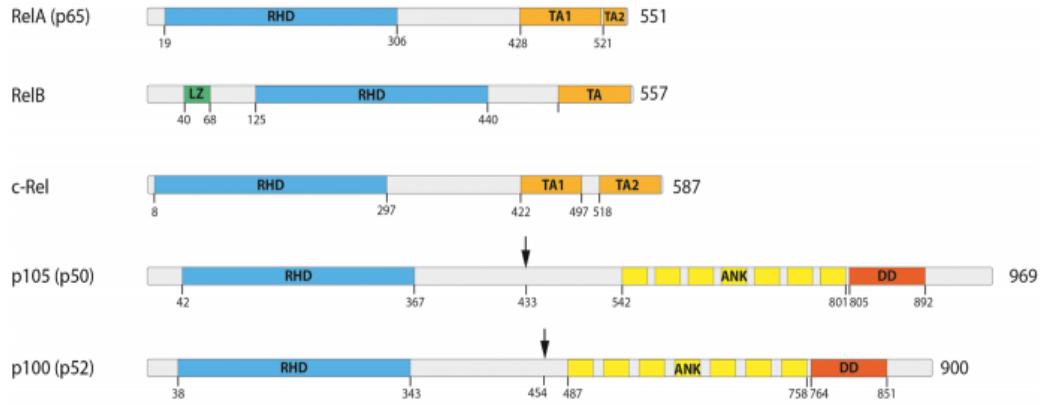
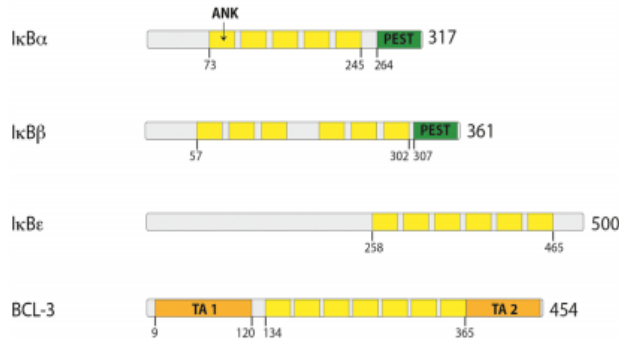
Klasik ve NF- κ B öncülü olan I κ B proteinlerinin yanında, üç tane daha ankirin tekrarı içeren polipeptidin, NF- κ B'nin aktivitesinin düzenlenmesinde yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 2.2B). Bu polipeptitler Bcl-3 (B cell CLL/lymphoma 3), I κ B δ (MAIL/INAP) ve I κ BNS olarak adlandırılır [65, 66].

Bu proteinler çekirdek içindeki derişimleri, NF- κ B alt birimlerine bağlanmaları ve yapılarında ankirin tekrarları bulunması nedeni ile “nükleer I κ B proteinleri” olarak sınıflandırılır. Bu proteinlerin çekirdekte kromatinlerin yeniden düzenlenmesinde, NF- κ B dimerlerinin değişiminde, NF- κ B hedef genlerinin ifade olmasında etkili olabilecekleri ileri sürülmektedir [67, 68]. Yapılarında klasik I κ B proteinlerine benzerlikler olmasına karşın, bu proteinler NF- κ B dimerlerine bağlanmada bazı farklılıklar gösterirler. Bcl-3, NF- κ B alt birimlerinden p50 ve p52'ye bağlanma özgülüğüne sahiptir.

TAD bölgesi bulunmadığı için transkripsiyonu baskılama görevi p50 ve p52'nin, Bcl-3 sayesinde DNA'dan uzaklaştırıldığı ileri sürülmektedir. Bu işlevi nedeniyle Bcl-3'ün, ankirin tekrarları bulundurmasına karşın, NF- κ B inhibitöründen çok transkripsiyon aktivatörü olduğu ileri sürülmektedir [69-71]. Ancak, Bcl-3'ün p50 homodimerlerini daha kararlı hale getirerek p50'nin baskılama işlevine yardım ettiği, transkripsiyonel olarak aktif komplekslerin, DNA'ya bağlanmasını önleyerek NF- κ B aktivasyonunu inhibe edebileceği fikirleri de ileri sürülmektedir [48, 72, 73]. Sonuç olarak Bcl-3'ün işleviyle ilgili farklı bulgular olduğundan, bu proteinin ya bir aktivatör, ya bir represör ya da bir inhibitör olabileceği ileri sürülmektedir [45, 74].

Son olarak tanımlanan I κ B proteinlerinden olan I κ B δ , diğer aile üyeleri ile zayıf bir homoloji gösterir. I κ B δ , p50 homodimerler ile etkileşir. Aynı zamanda, p65 içeren dimerlerin negatif olarak düzenlenmesinde etkili olduğu da gösterilmiştir. Bu işlevi nedeni ile Bcl-3'e benzediği iddia edilmektedir [70, 75].

I κ BNS hakkında yeterince bilgi mevcut değildir. Bu proteinlerin, T hücresi reseptörü (TCR) ile uyarılan NF- κ B aktivitesinin düzenlenmesi yanında, makrofaj ve dendritik hücrelerdeki bakteriyel LPS ile uyarılan NF- κ B aktivitesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir [76, 77].

A**B**

Şekil 2.2: NF-κB alt birimleri ve IκB proteinlerinin genel yapılarının şematik olarak gösterimi. ANK, Ankyrin tekrarları; S, Kinaz proteinlerinin fosforilasyon bölgeleri; K, Ubikitinasyon bölgesi; E, Çekirdekten çıkış dizisi; DimD, Dimerizasyon bölgesi; NTD, Amino ucu bölgesi; L, Nükleer lokalizasyon sinyali; G, Glisin amino asidi bakımından zengin bölge [45].

2.4 IKK (IκB Kinaz) Protein Ailesi

IκB proteinlerinin fosforilasyonundan sorumlu olan kinazlar hakkında uzun yıllar herhangi bir bilgi elde edilememiştir. Yoğun çalışmaların ardından 1996 yılında IκB kinaz (IKK) kompleksi tanımlanmıştır.

Protein saflaştırma, dizi analizi ve moleküler klonlama teknikleri birlikte kullanılarak, bu kompleksin IKKα/IKK1 ve IKKβ/IKK2 olmak üzere iki tane homolog kinaz alt birimi ve IKKγ/NEMO olarak adlandırılan düzenleyici bir bileşenden oluştuğu tespit edilmiştir [78, 79].

IKK-α ve IKK-β kompleksin iki katalitik alt ünitesidir. Alt üniteleri kodlayan genlerin ayrı ayrı inhibisyonuna ilişkin yapılmış çalışmalar sonucunda, IKK-β ve NEMO(IKK-γ)'nın özellikle klasik NF-κB yolağının aktivasyonu için gerekli olduğu ancak IKKα'nın bu yolda esansiyel bir rol oynamadığı belirlenmiştir.

Buna karşılık alternatif yolda RelB-p50 ve RelB-p52'nin aktivasyonu için kesinlikle IKK α 'ya ihtiyaç duyulduğu, ancak IKK- β ve NEMO(IKK- γ)'nın önemli bir rolünün olmadığı gösterilmiştir [49, 80].

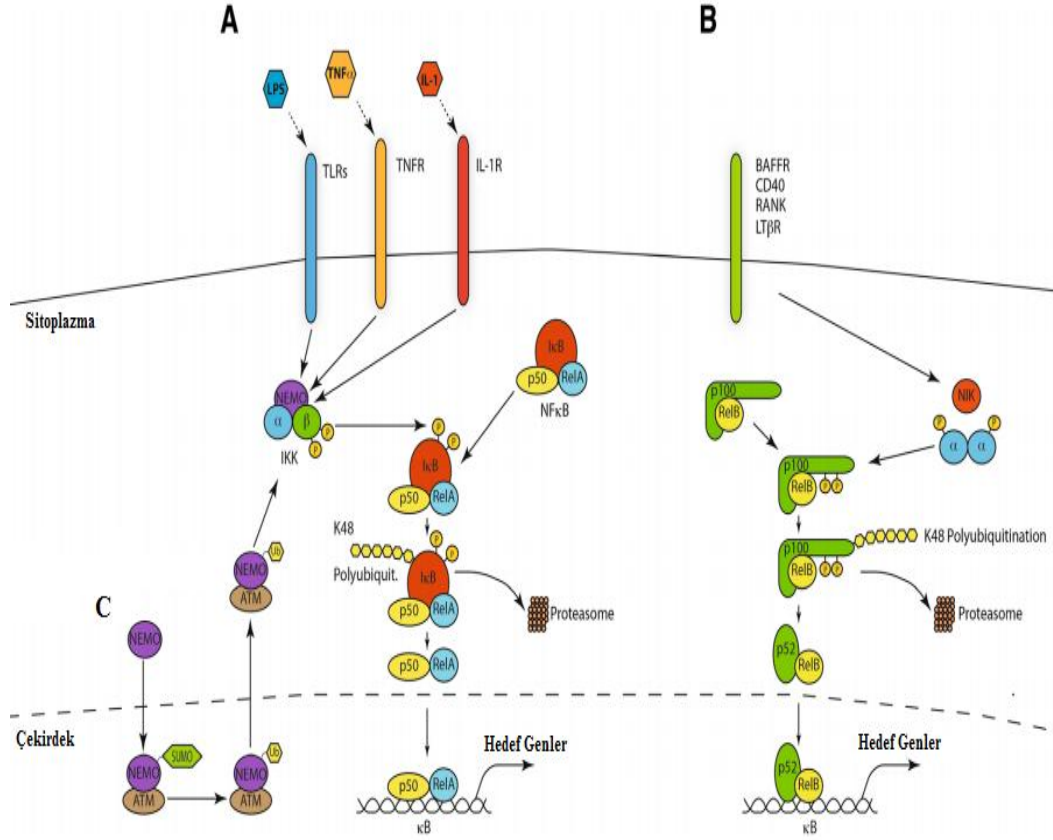
2.5 NF- κ B Sinyal Yolağı

2.5.1 NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonu

NF- κ B sinyal iletim yolu en basit şekliyle, bir dizi pozitif ve negatif düzenleyici elemandan oluşmaktadır. NF- κ B alt birimlerinin oluşturduğu dimerler, herhangi bir uyarı olmadığında I κ B proteinleri ile birlikte hücrelerin sitoplazmasında inaktif durumda bulunurlar. Uyarıyı takiben, büyük sinyal kompleksleri oluşturulmakta, bu kompleksler IKK proteinlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır.

IKK'nin katalitik alt birimlerinin aktivitesi ile I κ B proteinleri özel serin amino asitleri (genellikle Ser32 ve Ser36) üzerinden fosforilasyona uğramaktadır. Fosforilasyonu takiben I κ B proteinlerinin Lys21 ve Lys22 amino asitlerinden ubiquitinasyonu ve daha sonra 26S proteazom tarafından yıkımı gerçekleşmektedir. Serbest kalan NF- κ B dimerleri çekirdeğe geçerek hedef genlerin promotorundaki κ B bölgelerine bağlanmakta, transkripsiyonunun düzenlenmesine aracılık etmektedir [42, 81].

NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonu, uyarana ve IKK kompleksinin yapısında yer alan katalitik alt birimleri IKK α ve IKK β 'ya duyulan gereksinimine bağlı olarak üç ana yol üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4).



Şekil 2.3: NF-κB sinyal iletim yolu; A-Klasik yolak B-Alternatif yolak C-Atipik yolak [14].

2.5.2 Klasik aktivasyon yolu

Bu yolak genellikle TNF-α ve IL-1 gibi pro-inflamatuvar sitokinler ve bakteriyel LPS'ler tarafından uyarılır. Bu uyarıcılar hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlerine [IL-1R, TNFR1, TCR, B hücresi reseptörü (BCR) ve Toll benzeri reseptörler (TLR)] bağlanarak hücre içerisinde çok sayıda adaptör molekülün bir araya gelmesini ve sonuçta IKK kompleksinin aktif hale gelmesini sağlar.

Aktif hale gelen IKK kompleksin, IKKβ katalitik alt birimi sitoplazmada NF-κB heterodimerine bağlı IκBα proteinini fosforile ederek heterodimerin inhibitör proteinden ayrılmasına neden olur. Böylece serbest hale gelen heterodimerin transkripsiyonu başlatmasına imkân sağlanır. Bu yolda rol alan en yaygın heterodimer p65/p50 proteinlerinden oluşur. Bu şekildeki NF-κB aktivasyonu “klasik veya kanonik yol” olarak ifade edilmektedir (Şekil 2.4).

Klasik aktivasyon yolağı en iyi bilinen aktivasyon yolağı olup, diğer NF- κ B sinyal iletim yolaklarında olduğı gibi immün sistem, inflamasyon, proliferasyon, apoptozis, anjiogenez, invazyon ve metastazın dâhil olduğı birçok önemli fizyolojik süreçlerde rol alan genlerin transkripsiyonun düzenler[82, 83].

2.5.3 Alternatif aktivasyon yolu

Alternatif (kanonik olmayan) yolak, CD40 ligand (CD40L), limfotoksin beta reseptör (LT- β) ve B lenfosit aktive edici reseptör (BAFF) gibi birkaç uyaran tarafından aktive olur. Bu yolakta uyarıcıların hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanması sitoplazmik taraftaki NF- κ B'yi indükleyen kinazı (NIK) aktif hale getirir. NIK kinaz, IKK α homodimerini aktifleştirir ve sonuçta p100 karboksil ucundaki serin amino asidi üzerinden fosforile edilir (Şekil 2.4). Bu durum p100'ün karboksil ucuna çok sayıda ubiquitin eklenmesine ve proteazomal yıkımına neden olur. p100'ün yıkım sonrası ürünü olan p52'nin RelB ile yaptığı heterodimer alternatif sinyal iletim yolunun temel NF- κ B dimeridir [45, 82, 84].

NF- κ B sinyal yolağının, IKK β ve NEMO'ya bağımlı klasik yolu, IKK α bağımlı alternatif yola göre daha hızlı gerçekleşir. Klasik NF- κ B aktivasyonu dakikalar içinde meydana gelirken, IKK α 'ya bağımlı p100'ün işlenmesi süreci birkaç saatte meydana gelmektedir [62, 84]. Sonuç olarak, her iki aktivasyon yolu da hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını düzenlemektedir. Alternatif yol, klasik yolağın farklı olarak prematüre B hücrelerinin sağkalımı ve ikincil lenfoid organların gelişiminde de rol alır [42, 82, 85].

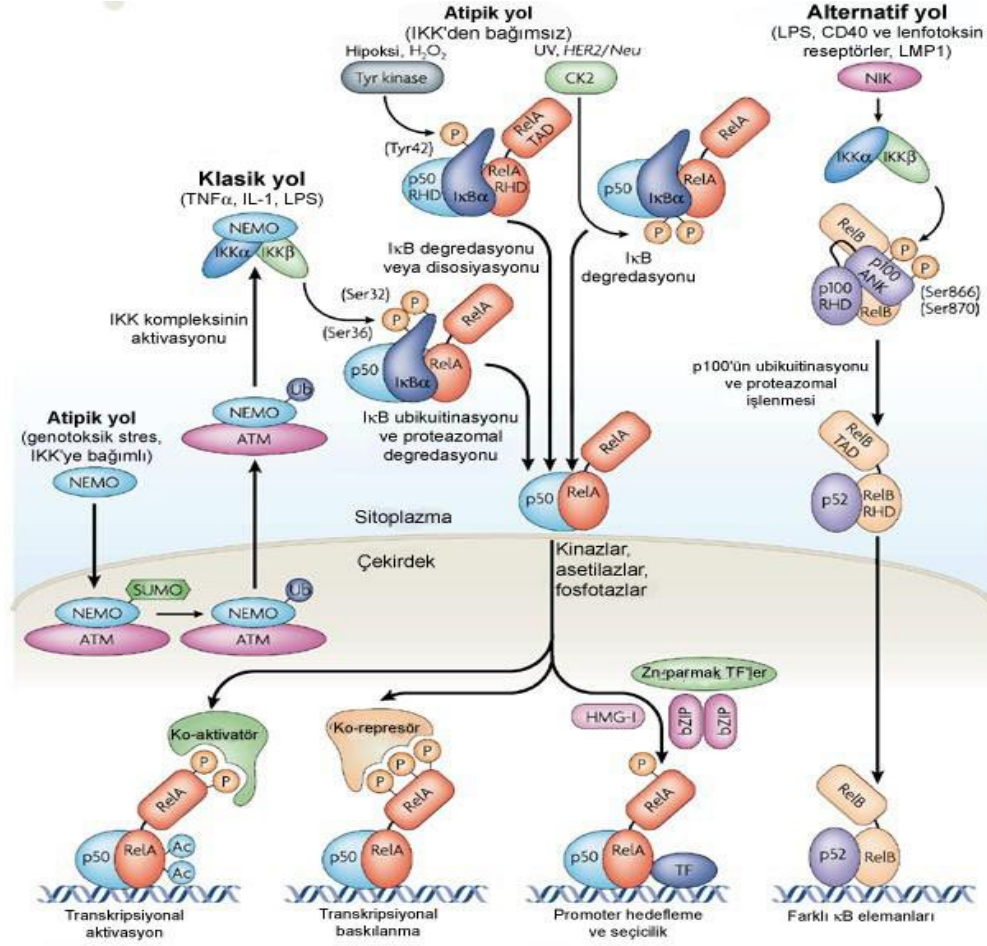
2.5.4 Atipik aktivasyon yolları

NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonu klasik ve alternatif yol olarak ikiye ayrılamayacak kadar karmaşıktır. Atipik aktivasyon yolları özellikle DNA hasarına neden olan genotoksik ajanlar, birçok kemoterapötik ilaç ve hipoksi gibi hücrel stres koşullarında aktive olur. Şekil 2.4'da görüldüğü gibi atipik yolak, NEMO ve ATM (Ataxia telangiectasia mutated) kinaz bağımlıdır.

ATM, DNA hasarına yanıtta önemli rol oynayan fosfatidilinositol 3-kinaz ailesinin bir üyesidir [5]. ATM'nin bilinen klasik fonksiyonu, çift zincir DNA kırıkları oluştuğunda kırıkları tanınması ve DNA onarım mekanizmalarını devreye sokmasıdır. Atipik NF- κ B aktivasyonunda ATM, sitoplazmadan çekirdeğe geçen ve çekirdekte sümolasyon ve ubiquitinle modifiye olmuş NEMO ile kompleks yapar.

Bu kompleks tekrar sitoplazmaya geçerek klasik aktivasyon yolağındaki IKK β aktivasyonunu başlatır [86].

Diğer bir atipik aktivasyon yolu, hipoksi ve ultraviyole radyasyon uygulaması sonucunda tespit edilmiştir (Şekil 2.4). Bu yolda, inhibitör proteinler IKK kompleksi yerine kazein kinaz 2 tarafından fosforillenir [87].



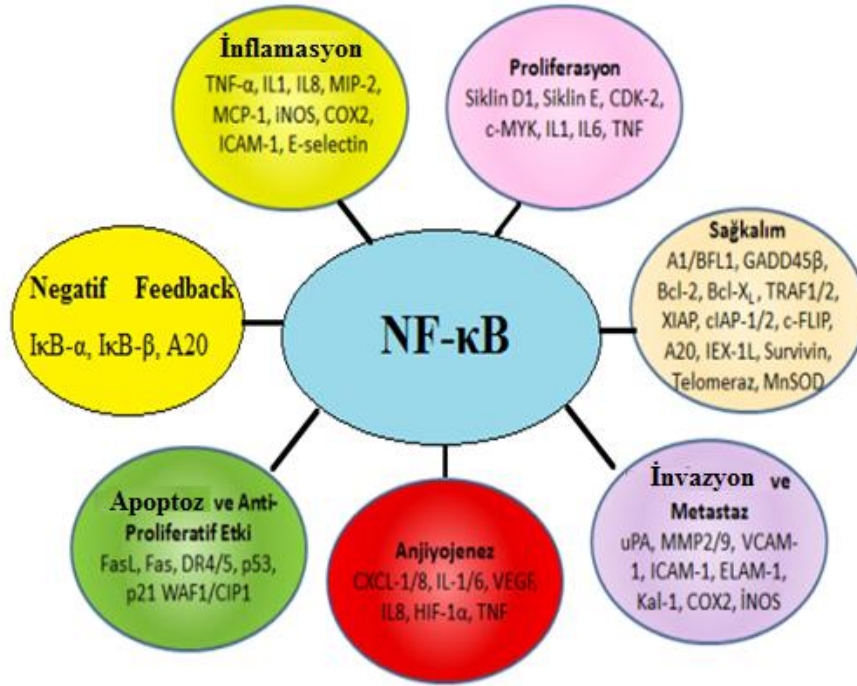
Şekil 2.4: NF- κ B sinyal iletim yolunun aktivasyonu. P, Fosforilasyon; Ub, Ubikuitinyasyon; Ac, Asetilasyon; bZIP, Lösin fermuarı içeren transkripsiyon faktörü; LMP1, Latent membran proteini 1; TF, Transkripsiyon faktörü; ATM [86].

2.6 NF- κ B Sinyal Yolağıının Aktivatörleri ve Hedef Genleri

NF- κ B aktivasyonunun temel fonksiyonu bağışıklık sistemi ve hücreyi stres koşullarına karşı korumaktır. Şu ana kadar oldukça farklı ve çok sayıda uyararı olduğu bulunmuştur. Hücreyi hasara karşı koruyan ilk savunma sisteminden birisidir. [40]. NF- κ B sinyal yolağıının uyarıcıları aşağıda listelenmiştir.

- Proinflatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1, vs)
- T ve B hücre mitojenleri (büyüme faktörleri ve hormonlar, vs)
- Viral ve bakteriyel ürünler (LPS, vs)
- Hücrel stres koşulları (DNA hasarı ve hipoksi vs)
- Fiziksel stres koşulları (UV vs)

NF- κ B sinyal yolağının kompleksliliği ve oldukça çeşitli olan bu uyarıcılara karşı hücrelerin verdiği farklı cevaplardan kaynaklanmaktadır. NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonu ile verilen cevap uyarana bağlı olduğu kadar hücre tipine ve NF- κ B dimerlerinin kombinasyonuna bağlı olarak da değişebilmektedir. Bugün NF- κ B sinyal yolağının 500'den fazla hedef geni olduğu rapor edilmiştir (Şekil 2.5) [88, 89].



Şekil 2.5: NF- κ B'nin hedef genleri [41].

Şekil 2.5'de görüldüğü gibi NF- κ B sinyal yolağı immün cevap ve tümörögenesis ile doğrudan ilişkili proliferasyon, sağkalım, invazyon, metastaz, anjiyogenez, apoptoz ve hücre savunma sisteminin bir parçası olan inflamasyonda görev olan genleri regüle eder. Bu önemli biyolojik fonksiyonlara ek olarak kendi aktivitesini de geri dönüşümlü olarak kontrol eder (Negatif feedback).

Sağlıklı hücrelerde, NF- κ B aktivasyonu oldukça hızlı ve geçicidir. Başka bir deyişle uyarana karşı cevaptan hemen sonra NF- κ B aktivasyonunun sonlandırılması gerekir [49].

NF- κ B aktivitesinin sonlandırılmasıyla ilgili en iyi bilinen mekanizma, aktif NF- κ B dimerlerinin I κ B proteinlerini transkribe etmesiyle gerçekleştirilir. Bu mekanizmada yeni sentezlenen I κ B α , çekirdeğe geçerek NF- κ B'yi DNA'dan uzaklaştırır ve sitozole taşır. Öncül moleküller olan p100 ve p105 gibi, c-Rel ve RelB genleri de NF- κ B tarafından indüklenebilir ve aktivasyonun sonlandırılmasında görev alabilir. [62, 70, 90]. Son yıllarda, NF- κ B dimerlerinin translasyon sonrası modifikasyonları ile ortaya çıkan ve doğrudan DNA'ya bağlı aktif NF- κ B dimerlerinin transkripsiyonel aktivitesini etkileyen yeni inhibisyon mekanizmaları tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar, NF- κ B dimerlerinin yıkımına, hücresel yerleşiminin değişmesine aracılık ederek veya kofaktörlerin bağlanmasını önleyerek NF- κ B cevabının sonlandırılmasına yardım ederler. Son yıllarda, özellikle NF- κ B'nin p65 alt biriminin asetilasyonunun, DNA'ya bağlanma afinitesini negatif olarak etkilediği rapor edilmiştir [91].

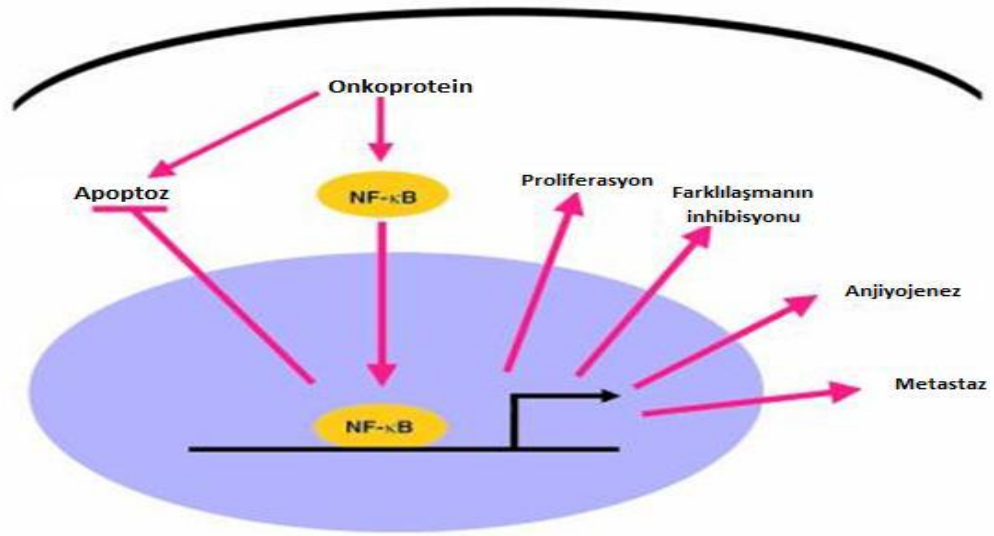
2.7 NF- κ B ve Kanser

NF- κ B aktivasyonu; proliferasyon, apoptoza direnç, inflamasyon, anjiyogenez, invazyon ve metastazda görev alan genlerin transkripsiyonunu etkilediği için tümör gelişimi ile doğrudan ilişkilidir (Şekil 2.5) [41, 92]. Günümüzde anormal NF- κ B regülasyonu büyük oranda hem solid hem de hematolojik (Hodgkin lenfoma, multipl myelom, primer mediastinal B-hücreli lenfoma, tedaviye dirençli diffüz büyük B-hücreli lenfoma, çocukluk dönemi akut lenfoblastik lösemi, göğüs, prostat, akciğer, kolon, böbrek ve beyin kanseri gibi) pek çok kanser türünde gözlemlendiği için aydınlatılması gereken önemli bir araştırma konusudur [3].

Kanser hücrelerinde NF- κ B ya daima aktif ya da regülasyonu bozulmuştur. Kanserli hücrelerdeki onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve NF- κ B'nin kendi genlerindeki mutasyonlar NF- κ B sinyal yolağının bozulmasına neden olur.

Tümör hücreleri üzerinde yapılan pek çok deney, yapısal olarak IKK aktivasyonu, mutant kısa ömürlü I κ B α , TNF- α ve IL-1 gibi uyarıcılara bağlı olarak NF- κ B'nin devamlı olarak aktive halde olduğunu göstermektedir [40]. Bu durum T lenfoma hücrelerinde apoptoza direnç ile bağlantılıdır.

Birçok hücre tipinde NF- κ B'nin daimi aktivasyonundan sorumlu olan uyarıcılar anlaşılamamıştır. Daimi NF- κ B aktivitesi olan hücreler çeşitli kimyasal ajanlara dirençlidir. Ancak tümör hücrelerindeki NF- κ B'nin bu yapısal aktivasyonun nedeni hala tamamen anlaşılamamıştır. Bununla birlikte yapısal NF- κ B yolağını yöneten sinyal kaskadlarının da bir tümör çeşidinden diğerine farklılık gösterebildiği bilinmektedir [3]. Regülasyonu bozulmuş NF- κ B devamlı olarak proliferasyon ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu sağlar (Şekil 2.6). Tüm bu gerekçeler, özellikle kanser sürecinde bu denli aktif rol aldığı bilinen NF- κ B sinyal yolağının daha iyi aydınlatılmasına olan gereksinimi açık şekilde göstermektedir.



Şekil 2.6: NF- κ B'nin etkilediği mekanizmalar: NF- κ B'nin aktivasyonu apoptozu bloke eder, hücre proliferasyonunu uyarır, potansiyel olarak farklılaşmayı bloke eder ve hücreyi metastaza götürür [93].

2.7.1 NF- κ B ve proliferasyon

NF- κ B, hücre proliferasyonunu uyararak IL-2, GM-CSF ve CD40L gibi büyüme faktörleri ve sitokinleri kodlayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlayarak hücre çoğalmasına neden olur. Bu moleküllerin aralıksız üretilmesi, otokrin veya parakrin yolla hücre proliferasyonunu uyarır.

NF- κ B, aynı zamanda hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçmesini sağlayan siklin D1'in transkripsiyonunu uyararak hücre proliferasyonuna doğrudan etki edebilir. Bu durum, meme epitel hücrelerinde siklin D1'in promotör bölgesinde κ B bölgesinin gösterilmesiyle doğrulanmıştır [94].

Buna ek olarak, fare kolorektal karsinomunda TNF- α ile uyarılan NF- κ B'nin, siklin D1 ve diğer hücre döngüsü genlerinin indüklenmesinde de rol aldığı rapor edilmiştir [12, 42]. Ayrıca NF- κ B aktivasyonunun onkogenik c-myc ekspresyonu aracılığıyla hücre proliferasyonunu indüklerken, Apoptoz protein inhibitörleri (IAP) aracılığıyla apoptotik yanıtı baskılaması, NF- κ B'nin proliferasyon ile doğrudan ilişkisini göstermektedir [95].

2.7.2 NF- κ B anjiyogenez ve metastaz

Anjiyogenez, mevcut damar yapılarından yeni kan damarlarının oluşması anlamına gelir [96]. Fizyolojik durumlarda; menstrüel siklus boyunca endometriyumda, yara iyileşmesi boyunca doku rejenerasyonu ya da onarımında, embriyogenez sırasında farklılaşma ve organ gelişimi için anjiyogenez limitli bir turn-over ile devam eder [97]. Fizyolojik durumlarda izlenen anjiyogenez organizmanın bütünlüğünün korunması ve dengenin devam etmesi açısından önem taşırken, tümörlerde izlenen anjiyogenez hastalığın ilerlemesi ve vücuda yayılmasında önemli rol oynar [98].

Yapılan çalışmalarda NF- κ B'nin hedef genlerinden birisi olan IL-8'in tümör hücrelerinde anjiyogenezi uyardığı gösterilmiştir [99]. Buna ek olarak, NF- κ B aktivasyonunun VEGF ekspresyonunu uyararak anjiyogenezin artmasına neden olduğu da rapor edilmiştir [100].

Hücrelerin migrasyonunu uyaran moleküllerde NF- κ B'nin hedefi olan genlerin ürünüdür. NF- κ B aktivitesi artmış olan hücrelerde kemokin üretimi düzenlenemediği için migrasyon artar. NF- κ B'nin kanser hücrelerindeki aktivasyonu, hücreler arası matriks yapısının bozulmasına da aracılık etmektedir. Bu durum özellikle, çevre dokulara tümörün yayılmasına aracılık eden proteolitik enzimler olan matriks metalloproteinaz (MMP) genlerinin promoter kısımlarında κ B bölgelerinin tanımlanmış olması ile de doğrulanmıştır [101].

2.8 Apoptozis ve NF- κ B

2.8.1 Apoptozis

Programlanmış hücre ölümü ya da apoptozis doku homeostazisini korumak, tüm çok hücreli organizmalarda hücre proliferasyonunu kontrol etmek bunun yanı sıra bir organizmadaki zararlı hücreleri ayırmak için hayati bir mekanizmadır. Apoptozis mekanizmasındaki hatalar kanserinde dâhil olduğu birçok hastalığın oluşmasına neden olur [102].

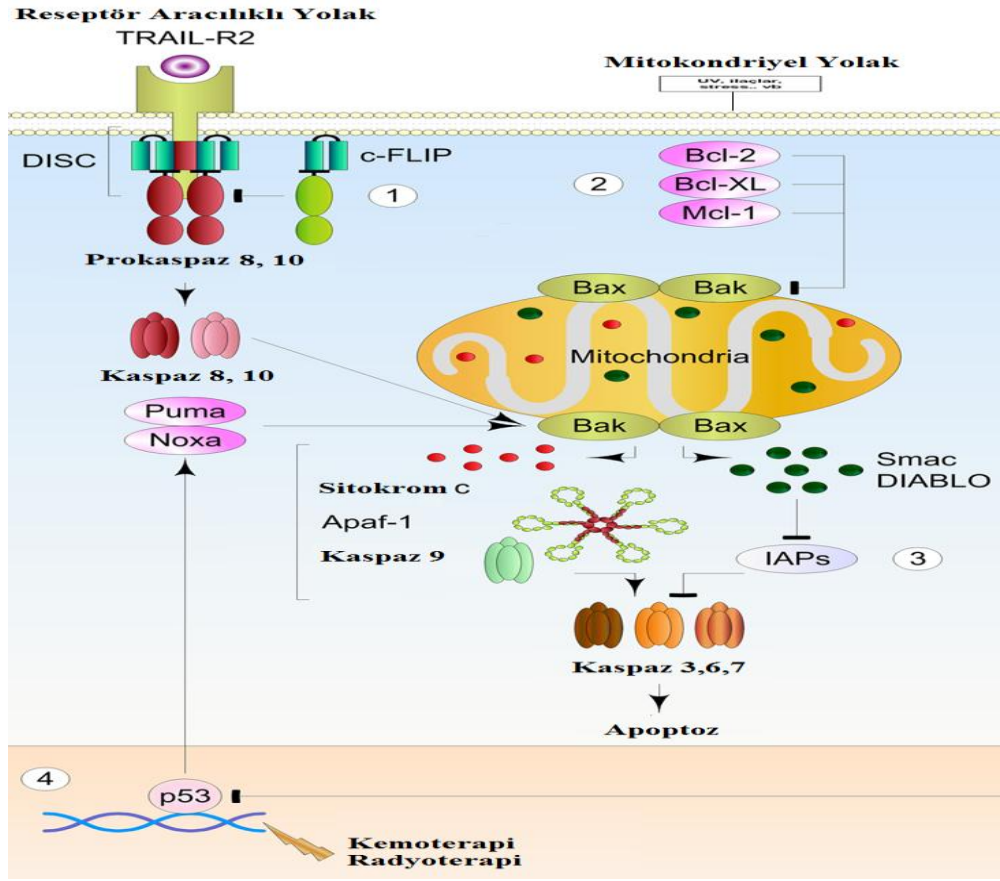
Apoptotik hücre ölümü, embriyoda morfogenez esnasında, yetişkin bireylerde ise doku yenilenmesi ve immün yanıt sırasında olması gereken bir mekanizmadır [103]. Gelişim sırasında görülen bu programlanmış hücre ölümü, doku ile organların şeklini ve özelliğini almasına yardım eder [104]. Bu nedenlerle apoptoz, çok hücreli organizmaların yaşamının önemli bir parçasıdır [105].

Apoptozis, fizyolojik olaylarda önemli olduğu kadar kanser gibi patolojik olaylarda da etkin rol oynamaktadır. Yetişkin bireylerde apoptozis fiziksel ya da biyolojik ajanlar tarafından hasara uğramış hücrelerin ortadan kaldırılmasının bir yolu olarak hizmet eder. Bu yüzden apoptozis, virüs ile enfekte olmuş ya da kanserli hücreleri yok etmek için bir mekanizmadır. Bu nedenle birçok tümör hücresi geç aşamalarda kanserden kaçma yeteneğine sahip olabilmektedir. Örneğin, hatalı ya da hasarlı DNA'nın apoptozis ile yok edilememesi sonucunda kromozom sayısının korunumunda devamlılık sağlanmaz ve anöploidi gibi istenmeyen durumlar oluşur [106].

Kanserli hücrelerde genellikle apoptozis baskılanmıştır. Bunun sonucu olarak tümör dokusu sürekli büyüme eğilimindedir. Apoptotik bir hücrede saptanan erken değişim membranın dış yüzeyinin içinden fosfatidil serin molekülünün translokasyonudur. Bu durum DNA fragmentasyonu ve organel parçalanması ile karakterizedir. Bu değişimler spesifik aspartik asit kalıntılarının subsratlarından ayrılmasını sağlayan proteazın bir ailesi olan kaspazlar tarafından başlatılır.

Apoptoza uğrayan hücre büzülerek yoğunlaşır, hücre iskeleti parçalanır, çekirdek zarı dağılır ve DNA'sı parçalara ayrılır. Ayrıca hücre yüzeyinin değişmesi ile ölmekte olan hücrelerin bileşenleri dış ortama salınmadan fagositoz ile ortadan kaldırılır [107, 108]. Böylece çevre dokularda bir inflamatuvar yanıtın oluşması engellenmiş olur. Kaspazlar inaktif öncül bir molekül olarak sentezlenir. Kaspaz kaskatlarının hedef proteinleri komşu hücrelere yapışan adhezyon molekülleri, nükleer membran proteinleri ve de DNA bağımlı protein kinazlardır [108].

Apoptoz genel olarak iki yolla uyarılır [109]. Bu yollardan biri reseptör aracılı yolak olarak adlandırılır. Reseptör aracılıklı yolakta, hücre ölümünü başlatan sinyal hücre dışından gelir ve apoptozun başlaması hücre zarındaki reseptör aracılığı ile olur [103]. Apoptozu başlatan ikinci yolak ise mitokondriyal yolaktır. Bu yolak ise hücre içinde oluşan sinyallerle başlar (Şekil 2.7) [110].



Şekil 2.7: Apoptozisde etkili olan iki yolak [111, 112].

Reseptör aracılıklı yolak; sitotoksik T lenfositler ve doğal öldürücü lenfositlerin yüzeyindeki FasL ve TRAIL gibi uygun ligandların hedef hücre (genellikle enfekte olmuş hücreler) yüzeyindeki Fas reseptöre (FasR) bağlanması ile aktive olur. Reseptör-ligand etkileşimi hedef hücrede reseptör oligomerizasyonuna yol açarak apoptozu başlatır [113, 114]. Reseptör oligomerizasyonu FADD gibi adaptör proteinlerin reseptöre bağlanması ile sonuçlanır ki bu bağlanma da kaspaz 8'in bağlanmasına, dimerizasyonuna ve aktivasyonuna olanak sağlar [115, 116]. Kaspaz 8 aktifleştğinde sitoplazmaya salınır ve kaspaz 3 gibi efektör kaspaz molekülünü aktive ederek hücre ölümüne neden olur (Şekil 2.7) [116-118].

Mitokondriyal yolak; apoptotik sinyallerin hücre içinde oluşmasına neden olan fiziksel ve kimyasal hasarlar (UV radyasyonu, ısı şoku, osmotik şok ve hipoksi), hücrel onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ifadesindeki değişiklikler (c-Myc, c-FOS, p53, PTEN), hücre iskelet yapısının bozulması, DNA hasarı (mutajenik ve sitotoksik ajanlar, antimetabolitler), büyüme faktörü ve sitokin yetersizliği, nükleotid ve ATP yetersizliği, hatalı katlanmış proteinlerin birikimi ve oksidatif stres gibi faktörler tarafından aktive olur [119, 120].

Bu faktörlerin varlığında oluşan apoptotik uyarıda, mitokondriden sitoplâzmaya sitokrom c'nin salınması ile kaspaz kaskatı başlatılır [121]. Sitokrom c normalde mitokondrinin iç ve dış zarları arasında yer alır [122]. Sitozole salınan sitokrom c molekülü, apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ve prokaspaz-9' a bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturur. Bu kompleks içinde prokaspaz-9 kesilerek aktif kaspaz-9 molekülü oluşur ve kaspaz-3'ün kesilerek aktifleşmesini sağlar. (Şekil 2.7) [121].

Her iki apoptotik yolda, kaspaz-3 aktivasyonuna neden olarak diğer proteazların ve nükleazların aktifleşmesine yol açar. Bunun sonucunda, programlanmış hücre ölümünün son aşamaları olan hücrenin düzenleyici ve yapısal moleküllerinin parçalanması ile sonuçlanan apoptoz mekanizması gerçekleşir [119, 123].

2.8.2 Apoptozun düzenlenmesi

Apoptoz fizyolojik olarak hassas bir şekilde kontrol edilmekte ve dengede tutulmaktadır. Bu kontroldeki başarısızlık gelişimsel kusurlar, otoimmün hastalıklar, nörodejenerasyon ve kanser gibi çeşitli patolojik sonuçlara neden olur [55]. Moleküler açıdan apoptoz, çok sayıda pozitif ve negatif geri besleme kontrol noktası olan ve diğer hücrel sinyal yolları ile birlikte çalışan karmaşık olaylar serisidir.

Apoptozisin moleküller düzenleyicilerinden birisi B hücresi lenfoma geni 2 (Bcl-2) protein ailesinin üyelerinden oluşur [116]. Bcl-2 ailesi hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik proteinleri içerir ve bunların göreceli seviyelerinin hücre kaderini yaşam ve ölüm açısından belirleyeceği kabul edilmektedir. Bu protein ailesinin 20'den fazla üyesi tanımlanmıştır [124]. Bcl-2 ailesine üye olan proteinlerden Bcl-2 ve Bcl-xL gibi pro-apoptotik proteinler apoptozu inhibe ederken, Bax, Bak, Bim ve Bad gibi proteinler ise apoptozu aktive eder [125]. Apoptozisin diğer bir moleküller düzenleyici ise apoptozis inhibitör proteinleridir (IAP).

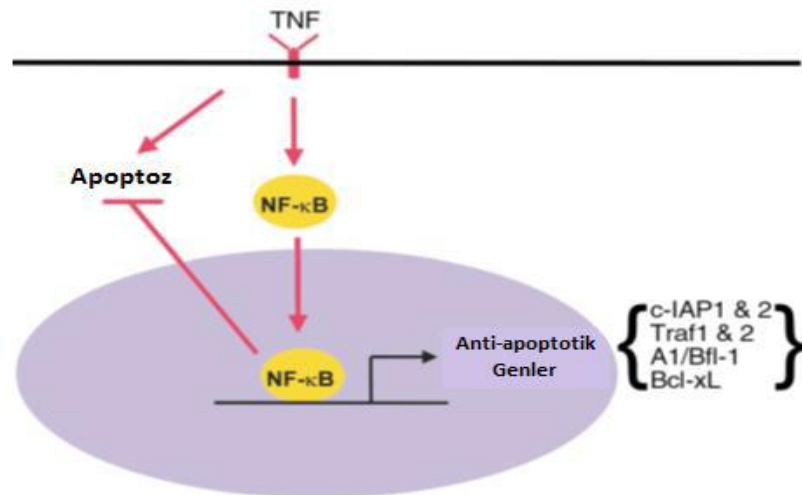
Bu proteinler c-IAP1, c-IAP2, XIAP, cFLIP ve survivin gibi genlerin ürünleridir. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri ve IAP'lar direkt kaspazlara bağlanarak ya da apoptozisin diğer aktivatör, inhibitör veya mediyatörleri ile çoklu etkileşime girerek apoptozisi inhibe ederler. Örneğin XIAP, cIAP1, cIAP2 direkt kaspaz 9 ve kaspaz 3'e bağlanarak, cFLIP direkt kaspaz 8'e bağlanarak, bcl-XL ise mitokondriden sitokrom c salınımını engelleyerek apoptozisi inhibe eder [116].

2.8.3 NF-κB ve Apoptozis ilişkisi

Apoptoz fizyolojik olarak hassas bir şekilde kontrol edilmekte ve dengede tutulmaktadır. Bu kontroldeki başarısızlık gelişimsel kusurlar, otoimmün hastalıklar, nörodejenerasyon ve kanser gibi çeşitli patolojik kusurlara neden olur [55]. Apoptozis ve NF-κB arasındaki en önemli ilişki; NF-κB'nin anti-apoptotik genlerin transkripsiyonel aktivatörü olmasından kaynaklanmaktadır. Bu durum, kanserin karakteristik özelliği olan apoptozise direnç mekanizmasında NF-κB'nin doğrudan rol almasını sağlarken aynı zamanda tümöröjenezis ile de doğrudan ilişkilendirir [45].

NF-κB aktivasyonunun hücre ölüm yolağını baskılayabilme özelliğine sahip olduğu, NF-κB'nin hatalı ya da eksik olduğu hücrelerde TNF-α ile uyarılan apoptozis mekanizmasının incelendiği çalışmalardan elde edilmiştir. TNF-α, sadece protein veya RNA sentezi inhibe olduğunda veya NF-κB'nin eksik olduğu hücrelerde apoptozu uyarabilmiştir. Yapılan birçok farklı çalışmada NF-κB'nin apoptozisi bu baskılama yeteneğinin, anti-apoptotik genlerin transkripsiyonu sağlayarak gerekçelediği rapor edilmiştir (Şekil 2.8).

Uyarılan anti-apoptotik genlerin bir kısmı bcl-2 protein ailesine ait iken (A1/Bfl1 ve Bcl-XL gibi), diğerleri hücrelerin sağ kalımını sağlayan IAP ailesine ait (IAPs, FLIP, XIAP, TRAF1, TRAF2, vs) üyelerdir [42, 82].



Şekil 2.8: NF-κB uyarılması: Uyarıcılar tarafından gerçekleşen NF-κB aktivasyonunun apoptozu baskılayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu yönetmesi [41].

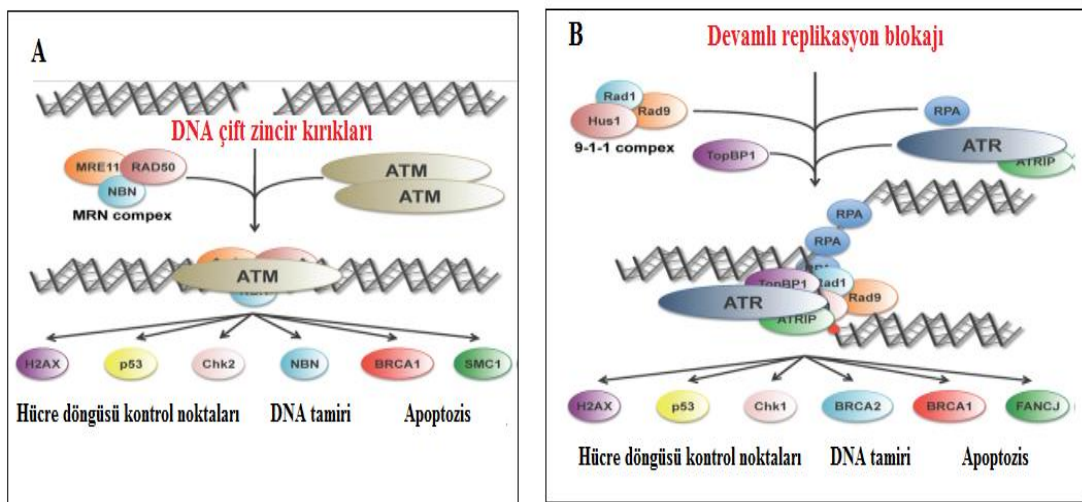
2.9 NF-κB ve DNA Hasarı

Apoptozis sağlıklı bireylerin hücrelerinde strese neden olan koşullara karşı oluşan bir savunma mekanizmasıdır. Özellikle genotoksik ajanların DNA'da oluşturduğu hasar onarılmayacak kadar büyük ise genomun devamlılığı ve kararlılığı için apoptozise gidilmesi gerekmektedir. Ökaryotik hücrelerde DNA hasarına karşı oluşan cevapta aktif hale gelen iki önemli kinaz enzimi tanımlanmıştır. Bunlar fosfotidil inozitol-3 kinaz ailesinin üyesi olan ATM (Ataxia telangiectasia mutated) ve ATR (ATM ve Rad3-İlişkili)'dir.

ATM doğrudan DNA çift zincir kırıkları ya da replikasyonun bloke edilmesi ile aktive olurken [126, 127], ATR DNA replikasyon çatalının durmasına yanıt olarak aktive olur. İyonize Radyasyon (IR), metilasyon ajanları, cisplatin ve DNA replikasyonunu bloke eden ajanların neden olduğu DNA hasarları ATR'yi aktive edebilir [127-129]. ATM ve ATR, DNA çift zincir kırıklarının onarımını uyarması, hücre döngüsü kontrol noktalarını aktive etmesi ve apoptoz sinyallerini uyarması bakımından hayati önem taşımaktadır.

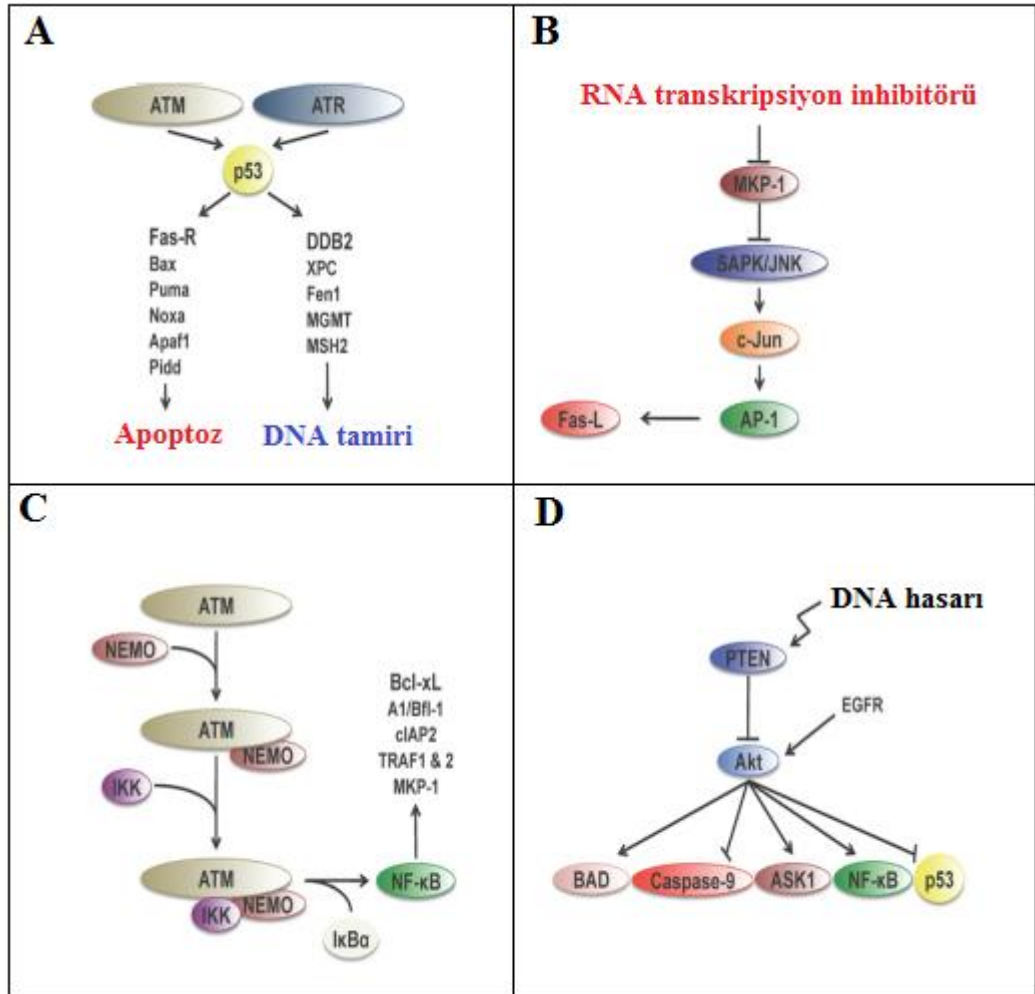
Başka bir deyişle ATM ve ATR genotoksik ajanlara maruz kalan hücrenin yaşam ve ölüm arasındaki kararında anahtar rol oynar (Şekil 2.9) [130].

ATM ve ATR birbirinden bağımsız çalışmazlar. DNA çift zincir kırıkları oluştuğunda ATM, ATR aktivasyonuna aracılık ederken [131], replikasyon çatalı durduğunda ise ATR, ATM'yi aktive eder [132].



Şekil 2.9: DNA hasarına yanıt esnasında ATM ve ATR'nin aktivasyonu. A) ATM DNA çift zincir kırıkları tarafından aktive edilir. B) ATR DNA replikasyon çatalındaki gecikme nedeniyle aktive olur [130].

ATM ve ATR'nin önemli fosforilasyon hedeflerinden birisi tümör baskılayıcı p53 proteindir [163, 165]. p53'ün fosforillenmesi onun nükleer lokalizasyonu ve DNA bağlanma aktivitesi artırır [133]. Bu durum p53'ün hedef genlerini transkripsiyonel olarak uyarmasını sağlar. p53, DNA onarım mekanizmasını başlatması ve apoptozisi tetiklemesi bakımından hücreyi tümör oluşumuna karşı koruyucu bir role sahiptir [130]. Şekil 2.10'da görüldüğü gibi p53'ün bu koruyucu rolü NF- κ B'nin anti-apoptotik rolü ile tamamen zıttır.



Şekil 2.10: DNA hasarının yanı sıra apoptoz mekanizması.

Günümüzde, tümör baskılayıcı p53 proteini ile NF- κ B'nin antagonistik özellikte ve birbirine bağımlı rolleri olduğu farklı çalışmalarla açıklanmıştır. NF- κ B genellikle hücre sağ kalımını uyarma, apoptozu inhibe etme ve hücre çoğalmasını artırma gibi konularda p53 gibi tümör baskılayıcılara antagonist olarak çalışır. Ancak bazı araştırmacılar, bunun aksine p53 ile uyarılan apoptozun NF- κ B'nin aktivasyonu ile bir ilişkisi olabileceğini öne sürmüştür [134-136].

Başka bir deyişle NF- κ B'nin yaygın kabul edilen anti-apoptotik rolünün aksine apoptozu indükleyici pro-apoptotik özelliği olabileceğini göstermişlerdir [46]. Örneğin yapılan bir çalışmada, TNF- α ile uyarılan apoptotik yolda NF- κ B anti-apoptotik özellik sergilemektedir. Fakat p53 ile uyarılan apoptozda NF- κ B'nin pro-apoptotik özellik sergilediği bulunmuştur. Bir diğer çalışmada, T hücre aktivasyon sinyallerine veya kemoterapik ajanlara karşı NF- κ B'nin pro-apoptotik Fas Ligand (FasL) proteinini indüklediği savunulmuştur. Buna bağlı olarak, NF- κ B aracılığıyla regülasyonları artan FasL proteinlerinin T hücrelerini uyarabileceği ve bir kemoterapik ajan olan etoposide karşı apoptozun gelişebileceği belirtilmiştir [95, 137].

Birçok çalışma iyi tanımlanmış ve onkogenezi teşvik eden NF- κ B'nin siklin D1 ve c-myc gibi büyümeyi teşvik eden genlerin, c-IAP-1, c-IAP-2 ya da XIAP gibi anti-apoptotik genleri uyarabilme kabiliyeti vardır. Bu yüzden, kemoterapi yada radyoterapi ile tedavi edilen kanser hücrelerinde NF- κ B'nin aktivasyonu sıklıkla apoptoza karşı direnç ile ilişkilidir. Bu durum etkili kanser tedavisini geciktiren önemli bir olay olarak ortaya çıkmaktadır. NF- κ B sinyal yolağının (proteozom inhibitörleri gibi) inhibitörleri kemoterapik kombinasyonunda kansere karşı tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca NF- κ B aktivitesi VEGF, IL-8 ve MMP-9 gibi pro-anjiogenik genlerin aktivasyonu ile tümörojenik olabilir. NF- κ B aktivitesinin negatif etkisi, bazı durumlarda NF- κ B bir tümör baskılayıcı olarak ve apoptozu uyarabileceği önerildi. Örneğin; insan epidermal hücrelerinde NF- κ B aktivasyonu hücre döngüsünün durdurulmasını uyarır. Ryan ve arkadaşları, p53 bağlantılı programlanmış hücre ölümünde NF- κ B'nin rolünü tanımladılar. Tümör supresör p53 hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun aktivasyonu aracılığıyla hücre büyümesini inhibe eder. p53 ile uyarılan apoptozda teröpatik yanıtla azalabilen tümörde NF- κ B'nin inhibe olduğu gösterildi. p53'in kaybı p53 aracılığıyla uyarılan apoptozis farklı ajanlara karşı direnç sebep olabilir. Buna ek olarak, NF- κ B'nin aktivasyonu doksorubisin ve analoglarının sitotoksik etkisi için gereklidir. Bu ikili etki için birçok hipotez öne sürülmüştür. Genel tartışma, NF- κ B aktivitesinin son çıktısı hücre tipine ve uyarana bağlıdır. NF- κ B'nin bu zıt aktivitesi kanser tedavisi için NF- κ B'nin inhibitörlerinin sistemik kullanımını karmaşılaştırır ve bu durum NF- κ B'nin pro-apoptotik aktivitesinin başlatılması için daha iyi teröpatiklerin tasarlanmasını gerektirmektedir.

Bu zıt etki şu şekilde açıklanmıştır. Apoptozun inhibisyonu söz konusu olduğunda NF-κB'nin transkripsiyonel koaktivatörler için, yarışma halinde olduğu düşünölen p53'ün fonksiyonuna zıt etki edebileceği belirtilmiştir [136]. Ancak buna zıt olarak, p53'ün bazı olaylarda NF-κB aracılığıyla apoptozu uyurabileceği de gösterilmiştir [135].

Sonuç olarak, farklı NF-κB komplekslerinin büyüme ve farklılaşmayı kontrol edebildiği, bu olaylarda ise NF-κB'nin farklı alt ünitelerinin farklı hücre tiplerine veya farklı uyaranlara göre pro-apoptotik veya anti-apoptotik olarak farklı roller gösterebileceği fikri ortaya atılmıştır [46].

2.10 NF-κB İnhibisyonu ile Kanser Tedavisi

Enflamasyon ve kanser arasındaki düzenlenme mekanizmalarının merkezinde yer alan NF-κB sinyal iletim yolu, diğer bazı sinyal iletim yollarıyla da etkileşim içindedir. Bu nedenle NF-κB sinyal iletim yolunun inhibisyonu, etkileşimde olduğu diğer yolların veya proteinlerin aktivitelerini de etkileyecektir [138].

Bunların yanında, NF-κB'nin epitele özgü inhibisyonunun karaciğer ve deri kanserlerinde artışlara neden olduğuna dair bulgular mevcuttur. Enflamatuvar hücrelerde de önemli işlevleri olan bu transkripsiyon faktörlerinin yokluğu halinde immün yetmezlik gelişmesi olasıdır [12].

Bu nedenlerle, NF-κB sinyal iletim yolunun inhibisyonu konusu dikkatle gözden geçirilmelidir. İnhibisyonun hangi molekül üzerinden olacağı ve bunun sonuçları ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmelidir. NF-κB'nin aktivitesinin uzun süreli ve yüksek dozlarda inhibitörler kullanılarak durdurulması gerekebilmektedir. NF-κB inhibitörü olarak geliştirilecek moleküllerin kanser tedavisinde kullanılabilmesi için, bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olmayacak şekilde kısa sürelerle ve aralıklı olarak uygulandığında etkinlik sağlayabilecek özellikte olması önemli olacaktır [12].

Bazı durumlarda NF-κB'nin inhibisyonunun tümör gelişimine neden olduğu gösterilmiş olsa da, bu inhibisyonun etkisi çoğunlukla kanser hücrelerinde apoptozun uyarılması şeklinde olacaktır. Bazı durumlarda, NF-κB'nin tek başına inhibisyonu kemoterapi veya radyoterapi olmadan apoptotik cevabın oluşmasında yetersiz kalabilir. Bu nedenle, NF-κB inhibitörleri diğer kanser tedavi yöntemleri ile birlikte kullanılabilir [12].

NF- κ B'nin inhibisyonu için farklı stratejiler önerilmektedir. Reseptörlerin inhibisyonundan, adaptör moleküllere, IKK ve I κ B proteinlere kadar sinyal iletim yolunun birçok basamakta inhibisyonu olasıdır. Bunun yanında, NF- κ B alt birimlerinin çekirdeğe geçişini veya DNA'ya bağlanmasını önlemek de mümkündür [139].

I κ B α süper-represör (I κ B α SR) aracılığıyla olduğu gibi gen transferleri veya mutasyonlarla, antioksidanlarla, anti-enflamatuvar ve immün sistemi baskılayan ilaçlarla, p53 aktivasyonu ile da inhibisyon sağlanabilir.

NF- κ B'nin DNA'ya bağlanması veya transkripsiyonal aktivitesini engellemek için κ B bölgeleri veya analogları yardımıyla hedef genlerinden başka bölgelere bağlanması sağlanarak aktivitenin inhibisyonu mümkündür. NF- κ B'nin aktivasyon sürecinde inhibisyonunun daha başarılı olabileceği düşünülmektedir [140]. 26S proteazom inhibitörlerinin, I κ B'nin yıkımını ve NF- κ B'nin çekirdeğe geçişini engellediği gösterilmiştir [141].

Sayısız çalışmada, NF- κ B'nin daimi aktivasyonu bazen NF- κ B ve I κ B proteinlerinin gen kodlarındaki genetik değişimler, büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığıyla ya da sinyal moleküllerinin anormal aktivasyonundan dolayı birçok insan kanserinde yaygın olduğu gösterilmiştir. NF- κ B'nin daimi aktivasyonu spesifik insan malignitelerinde halen tartışılmaktadır [142] Hedef genlerdeki spesifik DNA dizilerine bağlanan aktif NF- κ B κ B elementleri olarak dizayn edilir ve 500 farklı genin transkripsiyonunu düzenler. NF- κ B ile regüle edilen önemli genlerin birçoğu immün regülasyon, apoptozis, inflamasyon, metastaz, invazyon, angiogenezis, hayatta kalma ve tümör hücre proliferasyonunu içerir [42]. Bu durum NF- κ B sinyal yolağını terapi için yeni bir hedef yapmaktadır. Regülasyonun çeşitli seviyelerinden dolayı, NF- κ B sinyal yolağı kinazlar, fosfatazlar, ubiquitinasyon, nükleer translokasyon, DNA bağlanması, protein asetil transferaz ve metil transferazlarda dâhil çeşitli seviyelerde potansiyel olarak hedeflenebilir [42]. Kanser ilerlemesi ve gelişmesinde aktif NF- κ B'nin esas rolü kanser tedavisi ve önlenmesine yardım etmede NF- κ B bloke edilmesi stratejileri üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. NF- κ B inhibitörü etkisi ile birçok bileşen translasyonel ve klinik çalışmalarda test edilmekte ve geliştirilmektedir [143].

Günümüzde anormal NF- κ B regülasyonu büyük oranda hem solid hem de hematopoetik malign özellikteki (Hodgkin lenfoma, multiple myelom, primer mediastinal B-hücreli lenfoma, tedaviye dirençli diffüz büyük B-hücreli lenfoma, çocukluk dönemi akut lenfoblastik lösemi, göğüs, prostat, over, akciğer, kolon, böbrek ve beyin kanseri gibi) pek çok kanser türüyle ilişkili tutulduğu için aydınlatılması gereken önemli bir araştırma konusu olarak görülmektedir.

Bununla birlikte yapısal NF- κ B yolağını yöneten sinyal kaskadlarının da bir tümör çeşidinden diğerine farklılık gösterebildiği bilinmektedir. Tüm bu gerekçeler, özellikle kanser sürecinde bu denli aktif rol aldığı bilinen NF- κ B sinyal yolağının daha iyi aydınlatılmasına olan gereksinimi açık şekilde göstermektedir.

NF- κ B'nin düzenlenme mekanizmasının anlaşılması ile ilgili göz alıcı bir ilerleme elde edilmiş olmasına karşın, hala keşfedilmeyi bekleyen noktaların varlığı, bu sinyal iletim yolunu araştırmacılar için ilgi çekici bir hedef haline getirmektedir. Bu sinyal iletim yolunun ilişkili olduğu fizyolojik bozukluklarda ve özellikle tedavi amaçlı yaklaşımlarda, bu sinyal iletim yolunun genel olarak inhibisyonu sonucu ortaya çıkabilecek istenmeyen yan etkilerinin ortadan kaldırılabilmesi için, düzenlenme mekanizmasının tam olarak aydınlatılabilmesi son derece yararlı olacaktır [144].

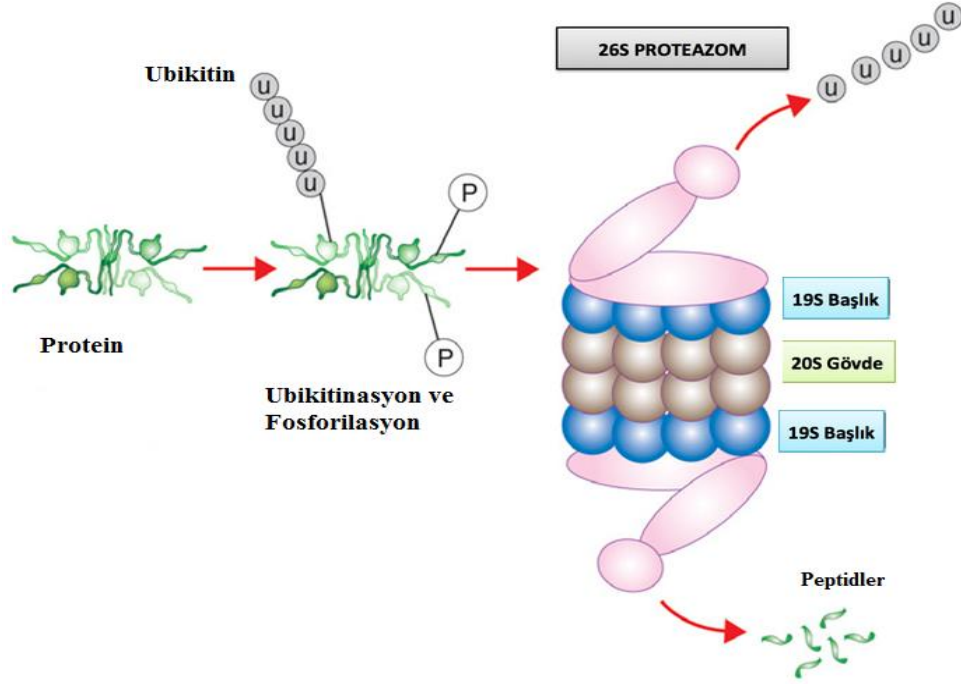
Ubikitin-proteozom yolu, NF- κ B sinyal iletim yolunda önemli bir role sahiptir. Ubikitinasyon, NF- κ B sinyal iletim yolundaki en az üç farklı basamakta düzenlenmeye aracılık etmektedir. Bu basamaklar: I κ B proteinlerinin yıkımı, öncül proteinlerin işlemde geçirilmesi ile olgun NF- κ B proteinlerinin oluşturulması ve IKK kompleksinin aktivasyonudur [86].

Sonuç olarak, NF- κ B sinyal yolağının bloke edilmesinin çoğu tümör hücrelerinin anti tümör ajanların aktivasyonuna daha duyarlı hale gelmesine ve/veya hücre proliferasyonunun azalmasına neden olacağı fikri günümüzde kabul görmüştür [49]. Dolayısı ile NF- κ B aktivasyonunu baskılama kapasitesine sahip ajanlar çeşitli yan etkilerine rağmen kanseri inhibe etme potansiyeline de sahip olarak düşünülmekte ve bu konuda umut vermektedir [40].

2.10.1 Proteozom İnhibitörü Bortezomib

Proteozom intrasellüler proteinlerin birçoğunun degradasyonundan sorumlu bir multikatalitik proteinaz kompleksidir. Bu işlem birincil olarak ubikitin-proteozom yolağında gerçekleşir.

Proteozom 20S proteolitik çekirdek ve 19S düzenleyici subünitesinden oluşur ve tüm ökaryotik hücrelerin hem çekirdek hem de sitoplazmasında bulunur. Bu sistem içerisinde çoklu enzim işlemesine uğrayan proteinler öncelikle 19S subünitesi tarafından tanınabilmesi için poliubikitin zinciri ile işaretlenir. Poliubikitin işaretli proteinler proteolitik 20S çekirdeğine sunulur ve 3-23 aminoasitlik küçük peptit parçalarına bölünür (Şekil 2.11) [145].



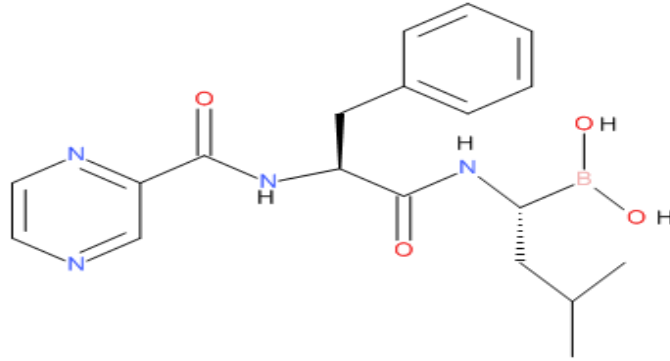
Şekil 2.11: Ubikitin-proteozom yıkım yolu.

Proteozom, hücre döngüsü, endositoz, transkripsiyon, organel biyogenezi, spermatogenez, anjiyogenez, apoptozis ve protein sentezi gibi çok sayıda hücrel olayda görevli olan proteinleri yıkımını ya da işlenmesini sağlayarak bu hücrel mekanizmalara doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla ubiquitin/proteozom yolağının inhibisyonu kanser terapide önem arz etmektedir.

Bortezomib (Bort/PS-341/Velcade) proteozom inhibitörleri adı verilen yeni bir ilaç sınıfının ilk üyesidir (Şekil 2.12). Daha önce PS-341 olarak anılan Bort 2003'te bir proteozom inhibitörü olarak velcade ismiyle FDA (Amerika, Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından Multiple Myeloma tedavisinde kullanılmaya başlanmış olup 2009 yılında ise lenfoma hastalarında tedaviye yanıt verdiği rapor edilmiştir. Birçok tümör çeşidine (multiple myeloma, lymphoma, prostat gibi) karşı etkili olduğu yapılan çalışma ile gözlenmiştir [146].

Bort anti-tümör özelliğe sahip bir proteozom inhibitörüdür ve daha önce uygulanan tedavilere karşı dirençli hale gelmiş hastalar için de önemli bir tedavi seçeneğidir. Bort proteozomları inhibe etmesi, hücre döngüsünün durmasına, apoptozu ve anjiyogenezi inhibe eden çeşitli sinyal iletim yollarının bozulmasına neden olur. Bort'in apoptozu indüklemesi ve proliferasyonu baskılaması hücrelerin kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapiye karşı duyarlılıklarının artmasına da sebep olmaktadır.

Bort daha önce uygulanan kemoterapik tedavilere karşı dirençli hale gelmiş hastalar içinde önemli bir tedavi seçeneğidir. Yapılan çalışmalarda, Bort'in bu etkinliği transkripsiyonel faktör NF- κ B'nin aktivasyonunu inhibe etmesinden kaynaklandığı rapor edilmiştir [19]. Bort sadece multiple myelomanın tedavisinde değil diğer solid ve hematolojik malignitelerin tedavilerinde ya tek başına ya da kombine terapinin bir parçası olarak çalışlabilmektedir. Fakat Bort tedavisi ile ilişkili bazı toksik etkileride gözlenmiştir. Buna ek olarak, Bort'in solid ve hematolojik tümörlerin tedavisinde minimal etki gösterdiği bu nedenle kombine tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir.



Şekil 2.12: Bortezomib'in moleküler yapısı (MA=384,24 g/mol).

2.11 Topoizomeraz İnhibitörleri

Hücrenin replikasyon ve transkripsiyon gibi önemli yaşamsal fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için DNA sarmalının açılması ve üzerindeki bilginin gerekli enzimler tarafından okunması gerekmektedir. Fakat sarmal yapıda olan zincirin açılması sırasında açılan bölgenin her iki ucunda süper sarmallardan dolayı oluşan stres zincirin açılmasını engeller. Topoizomerazlar prokaryotlarda, ökaryotlarda, viral sistemlerde ve mitokondri ve kloroplast gibi hücre organellerinde varlığı gösterilen, DNA moleküllerini bir topolojik formdan diğer bir forma dönüştürerek, replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve transpozisyon gibi birçok önemli hücresel süreçte önemli görevlere sahip enzim grubudur.

Topoizomerazlar, reaksiyon mekanizmalarındaki farklılıktan dolayı Tip I ve Tip II olmak üzere iki gruba ayrılır. Tip I topoizomerazlar DNA çift sarmalını tek iplikten kırarak, Tip II topoizomerazlar ise her iki zincirde kırıklar oluşturarak topolojik stressi ortadan kaldırırlar [20, 147, 148].

Topoizomeraz enzimleri kanser gibi sınırsız bölünme yeteneğine sahip hücreler için oldukça önemlidir. Son yıllarda, kanser tedavisi için topoizomeraz enzimlerin inhibe edilmesinin de önemli olacağı düşüncesi artmaktadır. Bu nedenle, ökaryotik topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonunu sağlayan çeşitli kimyasal ajanlar kullanılmaya başlanmıştır [183-185].

Ökaryotik topoizomeraz I, Camptothecin (CPT) ve analogları, indolokarbazoller (indolocarbazoles) ve indenoizokinolonlar (indenoisoquinolines) tarafından hedeflenir. Topoizomeraz II, etoposid (Eto), flurokinolonlar (fluorochinolones) ve antrasiklinler tarafından hedeflenmektedir [149]. CPT topoizomeraz I enzimini DNA'ya bağlanmadan inhibe etmektedir. FDA tarafından onaylanan CPT solid tümörlerde, kolan kanseri gibi kanserlerin tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. CPT ile DNA replikasyon mekanizması sırasında DNA kırıkları oluşturur ve CPT ile muamele edilen hücrelerde kromozomal kırılmalarda artışa sebep olur. Bu durumda DNA replikasyonunda ve transkripsiyonda hücre için öldürücü bir unsur olabilecek gecikmeler oluşacaktır [148, 149]. Bu nedenle CPT kullanımı DNA hasarına ve hücrelerde sitotoksik etkinin artmasına neden olmaktadır.

Tip II topoizomerazları hedefleyen bileşikler, onkolojide ve hematolojide kullanılan en eski anti kanser ajanlarıdır. Klinik kullanımda çok etkili olup anti kanser tedavisinde, tedavi önceliği hastalığın stabilitesi ve ilerlemesinin durdurulması yerine tümörün hızlıca geriletilmesi olduğunda topoizomeraz II hedefleyen ilaçlar kullanılmaktadır [150]. Topoizomeraz II zehirleri replikasyon ve transkripsiyonu durdururlar ve hücre apoptoza sürüklenir. FDA tarafından onkoloji ve hematolojide kullanımı onaylanan Eto hücrelerde topoizomeraz II'yi inhibe ederek hücreleri apoptoza sürüklemektedir. Kanser hücrelerinde Eto kullanımı DNA'da çift zincir kırıkları oluşturduğu gibi düşük dozlarında bile DNA'da tek zincir kırıkları oluşturabilmektedir [151].

Eto ve CPT, NF- κ B'nin DNA bağlanma aktivitesini ve transkripsiyonunu etkilemektedir. Bu bilgilerin ışığında topoizomera I ve II inhibitörlerinin NF- κ B'yi tamamen farklı mekanizmalar kullanarak inhibe edebilecekleri düşünülmektedir [152]. Bu nedenle topoizomera inhibitörleri ile kombine kullanılabilecek potansiyel kimyasalların kullanılması, kanser tedavisinde alternatif tedaviler geliştirmek için kritik bir konudur [153-155].

2.12 Hematolojik Maligniteler

Hematolojik maligniteler immün fonksiyonu olan reseptör aksesuarları yada bazı büyüme faktör reseptörleri, B hücre antijen reseptör, T hücre antijen reseptör tarafından aktive edilen hücre içi sinyal yollarına ait olan moleküllerin değişen sinyalleri tarafından karakterizedir. Bu maligniteler gelişimin farklı basamaklarında olan ve NF- κ B sinyaline güçlü ya da zayıf bir şekilde dayanan öncü hücrelerden kaynaklanmaktadır [111]. Bu hücrenin geçirdiği genetik değişiklikler veya mutasyonlar kötü huylu değişim ile sonuçlanır. Değişime uğramış olan hücreler hızla çoğalabilir ya da apoptoza direnç gösterebilir. Bu hücrelerin farklılaşması erken aşamada durmuştur [156].

Akut premyeloid lösemi hücre hattı (HL-60), 1977 yılında 36 yaşındaki AML hastası bir kadının periferik beyaz kan hücrelerinden geliştirilmiştir [157]. HL-60 hücreleri insan myeloid lösemi hücrelerinin uzun süreli pasajlanabilen ilk elde edilen hücreleri arasındadır. Büyüklüğü 9-25 um civarında olan hücrelerin geniş bir çekirdekleri vardır. Nadirinde olsa 2-4 çekirdekli olabilirler. Tümör hücrelerinin özelliklerini sergileyen HL-60 hücreleri çeşitli onkogenleri ifade etmektedir. HL-60 hücrelerinin c-myc geninde amplifikasyon olduğu ve buna bağlı olarak c-myc mRNA'sının düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca HL-60 hücreleri N-ras ve p53 genlerinde de mutasyon taşımaktadır [158].

Kronik myeloid lösemi (KML), diferansiyasyonun her basamağındaki myeloid elemanların proliferasyonu ve yapışkan özelliklerinin kaybı ile karakterize klonal bir hematopoetik kök hücre malignitesidir. İlk olarak 19. yüzyılda tanımlanmıştır ve 3 farklı klinik evre ile karakterizedir: birinci evre (kronik) olgunlaşma gösteren myeloid hücrelerin artışıdır, zamanla myeloid farklılaşma azalarak blastik krize geçiş gözlenir [159]. K562 hücreleri kronik myeloid löseminin blastik kriz evresinden kaynaklanan myeloid seri hücre dizileridir [160].

Glutasyon sistemi, oksidatif stres, eritroid farklılaşma ve anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [161, 162]. Elektron mikroskopunda bakıldığında K562 hücreleri kolay bağıntılı, düzgün şekilli, kısa mikrovillüslü, farklılaşmış lösemik hücrelerine benzer şekilde görülebilir. Kronik myeloid lösemi'nin hücresel markerlarından biri olan Philadelphia kromozomu, hücrelerin granülositik serilerinde bulunur [159].

K562 hücre dizilerinde, B hücrelere ait immunoglobulinler, Epstein-Barr virüs (EBV) genomu ve nükleer antijenine karşı reseptörler yoktur K562 lösemi hücreleri kendini yenileme özelliklerine sahiptir ve bu özellikleriyle hemotopoetik pluripotent hücrelere benzerler [163]. K562 hücre soyu lenfositik karaktere sahip değildir. Diğer taraftan T antijeni mevcut olmayan K562, yüksek radyasyon hassasiyetine sahiptir ve timidin tarafından büyümesinin engellenmesi de söz konusudur [164]. Myeloid lösemi hücreleri normal hücrelere göre daha yavaş proliferasyon ve büyüme hızına sahiptir. Lösemi hücreleri olgunlaşmadıkları sürece bölünmezler. Olgunlaşma ve proliferasyon birbirlerine bağlı olaylardır [161]. Kültür ortamında süspansiyon olarak büyüyen K562 hücrelerinin ikiye katlanma süreleri ortalama 12 saattir [165, 166]. K562 hücrelerinde, normal kromozom sayısının yaklaşık 1,5 katı kromozom bulunur. Bu hücre serisinin, abl/bcr füzyon genindeki aşırı ekspresyon nedeniyle apoptozise karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir [167]. K562 hücreleri, gen ekspresyonu ve hematopoetik düzenlemenin anlaşılması için yapılan çok sayıda çalışmada kullanılmıştır. K562 hücre soyu granülosit soyunun erken farklılaşma evresini temsil eder [161, 168]. Normal hücrelerin uzun süre kültürde tutulması oldukça zordur. Bu nedenle hücre kültüründe kolayca çoğaltılabilen K562 hücrelerinin sitotoksite ve apoptozis çalışmaları için kullanımı yaygındır. Kültürde spontane olarak apoptozise gitmeyen K562 hücrelerinde farklı maddeler uygulanarak apoptozisi indüklemek amacıyla yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir [160].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Bortezomib (VELCADE™ 3.5mg), Etoposid (Etoposide 100mg/5mL) ve Camptothecin (Tekamen 100mg/5mL) ilaçları kullanıldı. L-Glutamine içeren RPMI-1640 besiyeri, Penisilin/Streptomisin (10.000 U/mL penisilin, 10.000 µg/mL streptomisin), Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), %0.4 tripan mavisi Gibco'dan, dimetilsülfoksit (DMSO) Santa Cruz' dan, PureLink® RNA Mini Kit Ambion-Life Technologies'den ve MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Serva'dan temin edilmiştir. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, TaqMan Gene Expression Master Mix, Beta Actin (VIC-MBG Probe), p50 (FAM-MBG Probe), p65 (FAM-MBG Probe), p53 (FAM-MBG Probe), ATM (FAM-MBG Probe), ATR (FAM-MBG Probe), CASP3 (FAM-MBG Probe), Bax (FAM-MBG Probe), Bcl-2 (FAM-MBG Probe) Life Technologies'den temin edilmiştir.

3.2 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Dondurulması

Bu tez çalışmasında, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünden temin edilen Kronik Myeloid Lösemi (K562) ve Akut Promyelositik Lösemi (HL-60) hücre hatları kullanıldı.

Hücreler %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri içinde süspanse edilerek total hacim 15 mL olacak şekilde 75 cm²'lik flasklar içine aktarıldı. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂ ve %95 nem varlığında CO₂ etüvde çoğaltıldı. Çoğalan hücrelerin canlılığı ve kontaminasyon riski rutin olarak her gün mikroskop altında kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyi tamamen kapladıkları görüldüğü zaman hücreler pasajlanarak çoğaltıldı. Hücrelerin bir kısmı daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu.

Hücrelerin dondurulması için %20 besiyeri, %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %70 FBS içeren donma medyası içerisinde hücre süspansiyonu hazırlandı. Daha sonra bu karışım cryovial tüplere dağıtılarak aşamalı dondurma işlemi gerçekleştirildi.

Bu amaçla tüpler öncelikle -80 °C' de 24 saat bekletildi ardından sıvı azot tankına alınarak aşamalı donma işlemi gerçekleştirildi. Hücreler tekrar kullanılmak istendiğinde; sıvı azot tankından çıkartılıp, hızlı bir şekilde 37 °C' deki su banyosu içinde çözünmesi sağlandı. Ortamdaki DMSO'nun uzaklaştırılması için 5ml fosfat tamponu (PBS) eklenip oda sıcaklığında 400 g' de 5 dk santrifüj edildi. Son aşamada hücreler uygun besiyeri ile süspanse edilip CO₂ etüve kaldırıldı.

3.3 Hücre Canlılığının Saptanması

Hücrelerin üretilmesi esnasında rutin hücre canlılığı tripan mavisi kullanılarak saptandı. Tripan mavisi sadece ölü hücrelerin zarından geçebilen bir boya olduğu için ölü hücreler ile canlı hücreler inverted mikroskop altında kantitatif olarak ayrılabilirdi [169]. Bu basamak için ilk olarak çoğalan hücreler PBS ile yıkandı ve ardından uygun hacimde besiyeri ile süspanse hale getirildi. Süspanse hücrelerden 10 µL alınarak üzerine % 0.4 tripan mavisinden 10 µL eklendi. 3-5 dk inkübasyondan sonra thoma lamı kullanılarak inverted mikroskop altında mL' deki canlı hücre sayımı yapıldı. Canlı hücre sayısını belirlemek için aşağıdaki eşitlik kullanıldı (Eşitlik 3.1). % Canlılığı belirlemek amacıyla eşitlik 3.2 kullanıldı [170]

$$\text{Toplam Canlı Hücre Sayısı} = \text{HS} \times \text{SF} \times 10^4 \quad (3.1)$$

HS: Ortalama Canlı Hücre Sayısı

SF: Sulandırma Faktörü

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Canlı Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı}) \times 100 \quad (3.2)$$

3.4 Sitotoksikite Tayini: MTT Test

Test edilen ilaçların tek başına ve kombine in vitro sitotoksik etkileri MTT test kullanılarak saptandı. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür), canlı hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik bir tetrazolyum tuzudur. Bu test, canlı hücrelerin mitokondrisinde yer alan süksinat-dehidrogenaz enziminin, sarı renkli MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayarak suda çözünmeyen mor renkli formazan kristalleri oluşturma prensibine dayanır. Formazan kristalleri HCl-İzopropanol ya da DMSO ile çözüldükten sonra oluşan renk mikropate okuyucusunda okunur.

MTT yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen değer, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve bu değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbands değeride artış gösterir.

MTT yönteminde ilk olarak, uygun besiyeri içindeki hücreler kuyucuk başına $5-7 \times 10^3$ hücre/100 μL olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrotelatlere dağıtıldı ve gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün hücreler üzerine farklı konsantrasyonda ilaç eklenerek total hacim besiyeri ile 200 μL ' ye tamamlandı. İlaç uygulanmış hücreler 37 °C' de, %5 CO_2 ve % 95 nem varlığında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 20 μL MTT solüsyonu eklenerek plateler CO_2 etüvde 4 saat bekletildi. Sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek her bir kuyucuğa 100 μL DMSO eklendi ve 37°C'de 10 dk inkübe edildi. Açığa çıkan renk ELISA okuyucuda 480 nm dalga boyunda okundu.

3.5 K562 ve HL-60 Hücre Sayılarının Optimizasyonu

Bortezomib, camptothecin ve etoposidin, K562 ve HL-60 hücrelerindeki % canlılığa etkileri MTT test kullanılarak saptandı. Bu test ile ilaçların hücre canlılığını % 50 inhibe ettiği konsantrasyonlar (IC_{50}) belirlendi.

Bu tez çalışmasında kullanılan K562 ve HL-60 hücre hatlarının ikiye katlanma süreleri farklı olduğu bilinmektedir [191]. Bu nedenle, MTT testte kullanılacak olan kuyucuk başına düşen ideal hücre sayısını belirlemek amacıyla hücre sayısı optimizasyonu yapıldı. Her iki hücre hattı için en az üç farklı deneyden elde edilen % canlılıkların ortalaması alınarak ideal hücre sayısı belirlendi.

3.6 K562 ve HL-60 Hücre Hatlarına İlaç Uygulanması

Bortezomib, camptothecin ve etoposidin K562 ve HL-60 hücre hatlarındaki IC_{50} değerinin belirlenmesi amacıyla MTT test yapıldı. Hücre sayısı optimizasyon deneylerinden elde edilen sayılara göre MTT test için K562 hücre hattından μL ' de 50 hücre, HL-60 hücre hatlarından μL ' de 75 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu mikrotelatlere hazırlandı. Hücreler gece boyu inkübe edildikten sonra aşağıdaki şekilde seri sulandırılma hazırlanmış olan ilaç konsantrasyonları hücreler üzerine eklenerek 24 saat inkübe edildi ve MTT test gerçekleştirildi.

Bortezomib 0.1 nM - 2000 nM aralığında

Etoposid 50 µM - 1000 µM aralığında

Camptothecin 10 µM - 1000 µM aralığında

Her bir konsantrasyondan 8 kuyu çalışıldı. Ayrıca farklı gün ve zamanlarda olacak şekilde deneyler en az 3 defa tekrarlandı. Tüm deneylerden elde edilen verilerin ortalaması alınarak IC₅₀ değeri belirlendi. IC₅₀ değerinin belirlenmesi için her konsantrasyonun % canlılık üzerine etkisi kontrol kuyucuğu referans alınarak hesaplandı.

3.7 Kombine İlaç Uygulamaları

IC₅₀ değerleri belirlenen bortezomib, etoposid ve camptothecin ilaçları kullanılarak kombine ilaç uygulaması yapıldı. Kuyucuk başına 1x10⁶/mL hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plateler hazırlandı. Gece boyu inkübasyonun ardından uygun konsantrasyonlar belirlenerek kombine ilaç uygulamasına geçildi.

Kombinasyon uygulaması için, bir ilacın IC₅₀ değeri sabit, diğer ilaç ise farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde hücrelere uygulandı. Plateler 37 °C'de %5 CO₂ ve % 95 nem varlığında 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.8 RNA İzolasyonu Yapılması

RT-PCR yöntemi için tek başına ve kombine ilaç uygulanmış K562 ve HL-60 hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu Ambion PureLink® mini RNA izolasyon kiti kullanılarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

- ✓ Kuyucuklarda bulunan hücreler 15 mL' lik RNase-free tüplere aktararak 2000 g' de 4 °C' de 5 dk santrifüj edildi. Üst faz atıldı.
- ✓ Her tüpe %1' lik 2-merkaptetanol içeren "Lizis Buffer" dan 0.6 mL eklendi. Hücre peleti dağılana kadar karıştırıldı.
- ✓ Hücre homojenatının üstüne 1:1 hacimde %70' lik etil alkol eklendi.
- ✓ Örneklerden 700 µL alınarak koleksiyon tüplerine dağıtıldı.
- ✓ Koleksiyon tüpüne aktarılan örnekler oda sıcaklığında 12.000 g' de 15 sn. santrifüj edildi.
- ✓ Her koleksiyon tüpüne %96-100' lük etanol içeren "Wash Buffer I" den 700 µL ilave edildi.

- ✓ Örnekler oda sıcaklığında 12.000 g' de 15 sn. santrifüj edildi.
- ✓ Yeni koleksiyon tüplerine aktarılan örneklerin üzerine 500 µL Wash Buffer II eklendi.
- ✓ Örnekler oda sıcaklığında 12.000 g' de 15 sn. santrifüj edildi.
- ✓ Koleksiyon tüpündeki örnekler oda sıcaklığında 12.000 g' de 2 dk santrifüj edilerek RNA' nın membrana bağlanması sağlandı. Daha sonra koleksiyon tüpleri toplama tüplerine aktarıldı.
- ✓ Tüpün merkezine gelecek şekilde RNase-Free sudan 50 µL eklendi.
- ✓ Oda sıcaklığında 1 dk inkübasyon yapıldı. Örnekler oda sıcaklığında 13.000 g' de 2 dk santrifüj edildi. Ve bu işlem 2 defa tekrarlandı.

İzolasyonu yapılan RNA' ların kontrolü, miktarı ve saflığının belirlenmesinin ardından RNA' lar daha sonra yapılacak olan gen ifadesi çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C' de saklandı.

3.9 RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

Total RNA izolasyonunun miktarının ve saflığının belirlenmesi için 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında absorbans ölçümü yapılır. 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçüm sırasıyla nükleik asit ve protein değerlerini verir. 230 nm dalga boyunda yapılan absorbans ölçümü ise RNA izolasyonunda organik moleküllerin kontaminasyonunu belirlemektedir. RNA örneklerinin saflığı 260 nm' deki absorbansın diğerlerine bölünmesi ile bulunur. Optimum 260/280 ve 260/230 oranları sırasıyla yaklaşık olarak 2.0 ve 1.8 değerindedir. İyi bir RNA izolasyonunda 260/280 absorbans değeri 2.0 civarında olmalıdır.

RNA' nın saflığı ve miktarı Nanodrop 2000 (Thermo) cihazı kullanılarak belirlendi. Her bir örnekteki RNA miktarı eşitlik 3.3 de verildiği gibi hesaplandı.

$$\text{RNA } (\mu\text{g/mL}) = A_{260 \text{ nm}} \times \text{SF} \times 40 \mu\text{g/mL} \quad (3.3)$$

A₂₆₀ = 260 nm' deki Absorbans Değeri

SF = Sulandırma Faktörü

40 µg/mL = RNA' nın Ortalama katsayısı

RNA izolasyonundan sonra izolasyonun kontrolü %1' lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak yapıldı. Elektroforez için 1X Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu kullanıldı. Etidyum bromür ile boyanmış olan örnekler jel görüntüleme cihazı (UVITEC Cambridge) ile görüntülenerek fotoğrafı çekildi.

3.10 Real Time RT-PCR Yöntemi ile Gen İfade Düzeylerinin Saptanması

Tek başına ve kombine ilaç uygulanmış tüm hücre örneklerinde, NF- κ B sinyal yolağının p65 ve p50 genlerinin, DNA onarım mekanizmasında görev alan ATM, ATR ve p53 genlerinin ve doğrudan apoptozis ile ilişkili Bcl-2, Bax ve kaspaz 3 genlerinin mRNA düzeyindeki artış ya da azalma şeklindeki değişimler kantitatif RT-PCR reaksiyonu ile saptanmıştır (real time RT-PCR). Bu yöntemde ilk olarak izole edilen her RNA örneğinden komplementer DNA sentezinin yapılması gerekmektedir.

3.10.1 Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA (cDNA) sentezlemek için RNase-free ve Nükleaz-free ekipmanlar kullanıldı. İzolasyonu yapılan total RNA'lardan 1 μ g/mL kullanılarak High-Capacity (Life Tech) revers transkriptaz enzimi tarafından cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA'ları elde edilen tüm genlerden rastgele cDNA primer kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. 0.5 mL' lik PCR tüpünde 20 μ L' lik bir reaksiyon için 1 μ g/mL RNA son hacim 10 μ L olacak şekilde nükleaz-free su içinde karıştırıldı. Sonra, üzerine önceden hazırlanan 2 μ L reaksiyon tamponu, 0.8 μ L dNTP mix, 2 μ L 10X random primer, 1 μ L enzim ve 4.2 μ L nükleaz-free su içeren reaksiyon karışımından 10 μ L her tüpe ilave edildi. Daha sonra çizelge 3.1 de gösterilen PCR programı kullanılarak cDNA' lar elde edildi. Elde edilen cDNA'lar -20 °C' de saklandı.

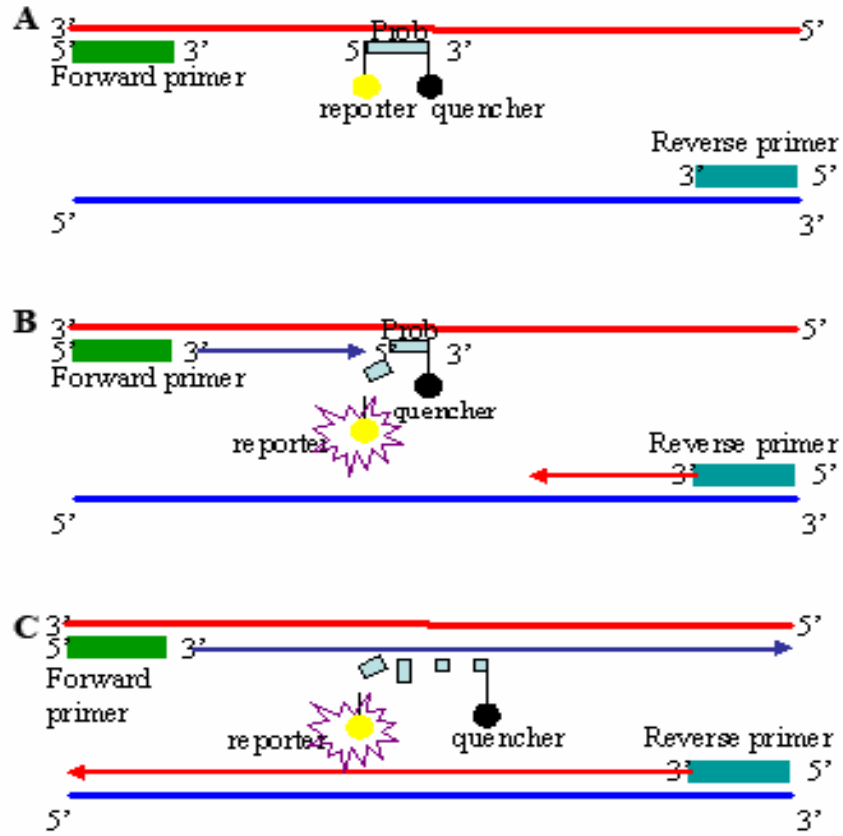
	1. Adım	2.Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞

Çizelge 3.1: cDNA sentez için gerekli PCR programı.

3.10.2 Kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

Çalışmanın bu basamağında gen ifade düzeylerini saptamak için gene özgü TaqMan probolar kullanıldı. TaqMan problemleri ile yapılan qRT-PCR'da bir çift primer setinin yanı sıra her iki ucu floresans boyalarla işaretli 8–9 nükleotitlik bir prob kullanılmaktadır. Probun 5' ucunda bir floresan boya (reporter), 3' ucunda ise reporter'ın yaptığı ışığı engelleyecek bir başka floresans yapı (quencher) bulunur.

Şekil 3.1’de görüldüğü gibi, PCR reaksiyonu esnasında DNA denatürasyonunu takiben hem primerler hem de prob hedef DNA üzerindeki özgün bölgelerine bağlanırlar. Bu esnada prob herhangi bir ışımaya vermemektedir. Reaksiyonun uzama fazında Taq DNA polimeraz probun olduğu yere geldiğinde, probun 5’ ucundaki reporter boyayı 5’→3’ nükleaz aktivitesi ile kırarak serbest hale getirir. Serbest hale gelen reporter boya ise ışımaya oluşturur. Başka bir deyişle TaqMan prob yalnızca özgün ürün oluşursa ışımaya vermektedir.

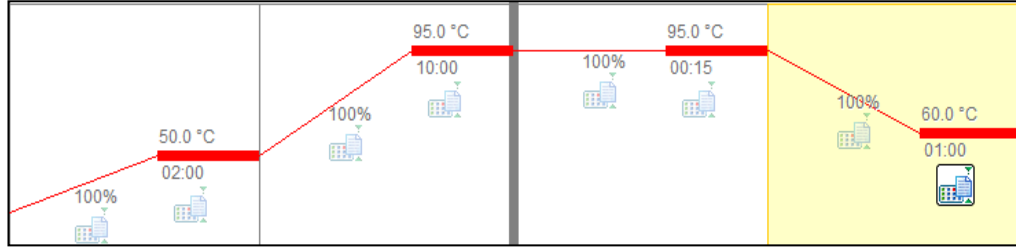


Şekil 3.1: TaqMan probun çalışma prensibi.

Çalışmamızın tüm örneklerinde Rel-A, NF-κB1, ATM, ATR, Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 ve p53 genlerine ilaveten endojen kontrol olarak β-actin geni için TaqMan problemleri kullanıldı. Tüm cDNA'lardan gen ekspresyonu çalışması ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Her örnek 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı. Negatif kontrol olarak cDNA içermeyen reaksiyon karışımı kullanıldı. qRT-PCR için reaksiyon koşulları çizelge 3.2' de ayrıca qRT-PCR için amplifikasyon basamakları şekil 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2: qRT-PCR reaksiyon koşulları.

Gen	1 µL
Master Mix	10 µL
RNase Free Su	7 µL
cDNA	2 µL
Total Hacim	20 µL



Şekil 3.2: qRT-PCR'in amplifikasyon basamakları.

3.10.3 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Yöntemi kullanılarak qRT-PCR ürünlerinin miktarının hesaplanması

Gen ekspresyonunda göreceli miktar tayini $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak gerçekleştirildi [171]. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodunda gen ekspresyonundaki göreceli değişiklik kontrole göre kat-değişimi olarak ifade edilir. Kat-değişimleri bir kalibratör (örn; Tedavi edilmeyen referans örnek) ile deneysel örneklerin (örn; İlaç tedavisi yapılan örnek) karşılaştırılması ve iç kontroldeki miktar verilerinin normalleştirilmesiyle elde edilebilir. Gen ekspresyonunun kat-değişimleri eşitlik 3.4' de verildiği şekilde saptandı.

$$\Delta C_t \text{ Tedavi Edilen} = C_t (\text{Hedef A-Tedavi Edilen}) - C_t (\text{Referans B-Tedavi Edilen})$$

$$\Delta C_t \text{ Kontrol} = C_t (\text{Hedef A-Kontrol}) - C_t (\text{Referans B-Kontrol})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Tedavi Edilen} - \Delta C_t \text{ Kontrol}$$

$$\text{Normal Hedef Gen Ekspresyon Seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (3.4)$$

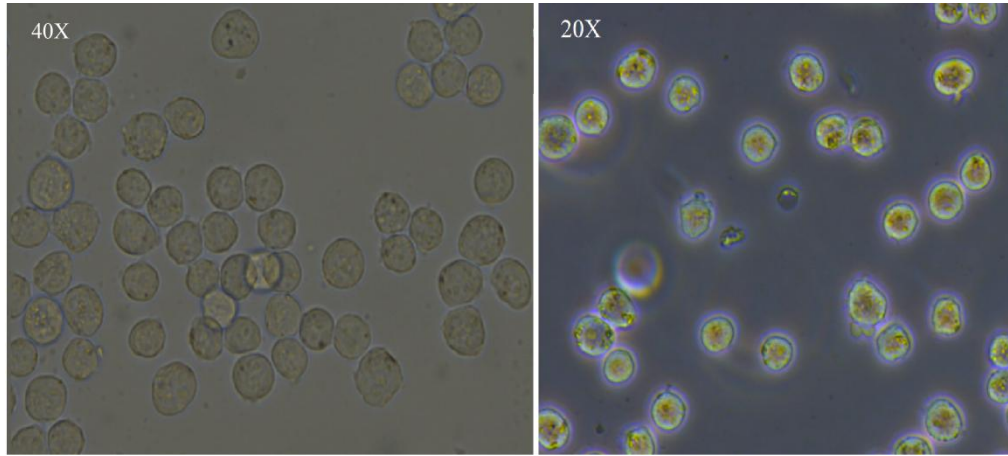
3.11 İstatistiksel Değerlendirme

Tüm deneysel veriler arasındaki anlamlı farklılıkları tespit etmek için One-way ANOVA testi GraphPad Prism 6.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Ayrıca gruplara arasındaki anlamlılık ve farklılıklar Tukey Multi-Comparison Pot istatistik testi yapılarak p değerleri hesaplandı. Gruplar arasında anlamlı farklılıklar için $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

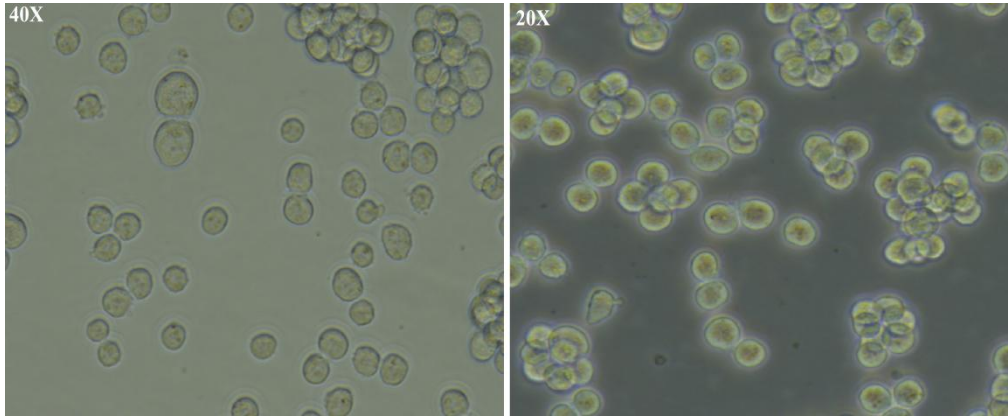
4. BULGULAR

4.1 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Canlılığı

K562 ve HL-60 hücre hatları %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri kullanılarak 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem varlığında üretildi. Hücre hatları kontaminasyon riskine karşı her gün Leica inverted mikroskop altında incelendi. Ayrıca besiyeri ortamının renk değişimleri de günlük olarak takip edildi. Flask içi hücre yoğunluğu %85-90 olduğunda hücreler pasajlandı. Şekil 4.1'de K562 hücre hattı, şekil 4.2'de ise HL-60 hücre hattına ait 40X ve 20X objektiflerde çekilen fotoğraflar görülmektedir.



Şekil 4.1: K562 hücre hattının 40X ve 20X objektiflerdeki görüntüsü.



Şekil 4.2: HL-60 hücre hattının 40X ve 20X objektiflerdeki görüntüsü.

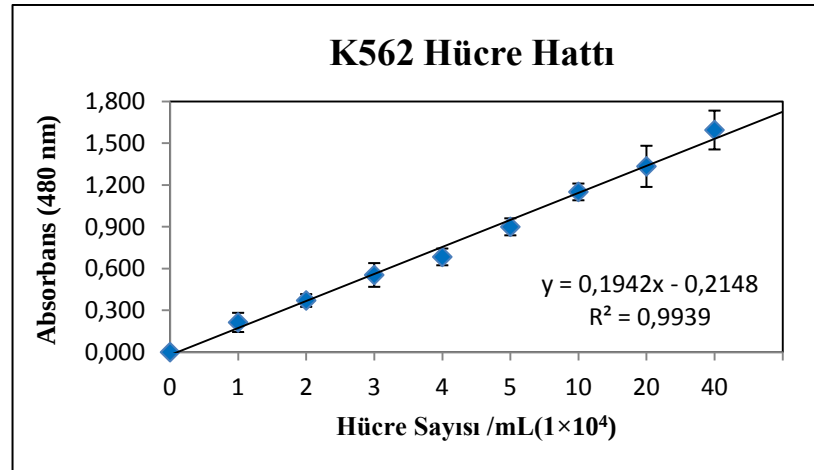
K562 ve HL-60 hücre hatlarının canlılığı ve sayımını yapmak için tripan mavisi kullanıldı. Tripan mavisi ile PBS içinde sulandırılmış hücre hattı 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı. Süspansiyon 3-5 dk bekletildikten sonra thoma lamına aktararak hücre sayımı yapıldı. Tripan mavisi ile sadece ölü hücreler boyadığından mikroskop altında boya maddesini içine almayan hücreler sayıldı.

4.2 Hücre Sayısı Optimizasyonu Çalışmaları

Çalışmamızda ikiye katlanma süreleri farklı olan K562 ve HL-60 hücre hatları kullanıldı [172-174]. Bu nedenle MTT yapılmadan önce K562 ve HL-60 hücre hatlarında kuyucuk başına düşen hücre sayısı belirlemek için hücre sayısı optimizasyonu deneyleri yapıldı.

Uygun hücre sayısını belirlemek amacıyla K562 hücre hattı için kuyucuk başına μL 'de 10 ile 400 arasında değişen sayıda hücre konularak MTT testi yapıldı. Her değer 8 kuyucuk olacak şekilde farklı gün ve zamanlarda deneyler tekrarlandı. Tüm deney verilerinin ortalamaları alınarak standart eğri grafiği oluşturuldu.

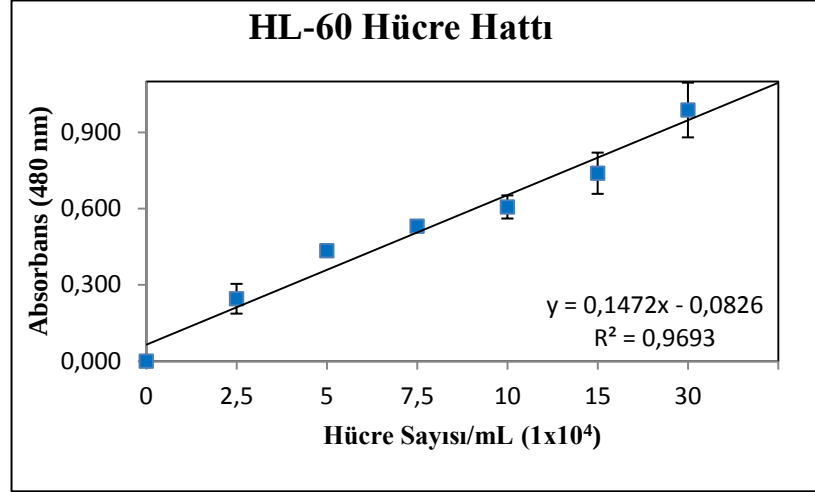
Optimizasyon çalışmalarının ardından K562 hücre hattı için 4 deneyin veri ortalamaları alınarak absorbans-hücre sayısı grafiği ve standart eğri grafiği oluşturuldu. Elde edilen veriler sonucunda MTT testinde kullanılacak K562 hücre hattı μL 'de 50 hücre olacak şekilde optimize edildi. Şekil 4.3'de K562 hücre hattı için hücre sayısı optimizasyonu ve standart eğri grafiği görülmektedir.



Şekil 4.3: K562 hücre hattı için absorbans-hücre sayısı ve standart eğri grafiği.

HL-60 hücre hattında uygun hücre sayısını belirlemek amacıyla kuyucuk başına μL 'de 25 ile 300 arasında değişen sayıda hücre konularak MTT testi yapıldı.

Farklı gün ve zamanlarda 3 deney yapıldı ve her değerden 8 kuyucuk olacak şekilde çalışmalar gerçekleştirildi. HL-60 hücre hattı için yapılan 3 deney veri ortalamaları alınarak absorbans-hücre sayısı ve standart eğri grafiği oluşturuldu. Elde edilen veriler ışığında MTT testlerinde kullanılacak HL-60 hücre hattı μL 'de 75 hücre olacak şekilde optimize edildi. Şekil 4.4'de HL-60 hücre hattı için absorbans-hücre sayısı ve standart eğri grafiği görülmektedir.



Şekil 4.4: HL-60 hücre hattı için hücre sayısı optimizasyon grafiği ve standart eğri grafiği.

4.3 İlaçların Sitotoksik Değerleri

Çalışmamızda bortezomib (Bort), camptothecin (CPT) ve etoposid (Eto) ilaçlarının K562 ve HL-60 hücre hatlarında % canlılığa etkisi MTT test yapılarak belirlendi. MTT test sonuçlarının ölçümleri Chromate Eliza cihazında, 480 nm dalga boyunda yapıldı. Her deneyde kontrol grubunun canlılığı %100 olacak şekilde hesaplandı. Tüm konsantrasyonların % canlılık değeri kontrole göre hesaplandı. Farklı gün ve zamanlarda yapılan deney verilerinin ortalamaları alınarak her bir ilaç için IC_{50} değeri belirlendi.

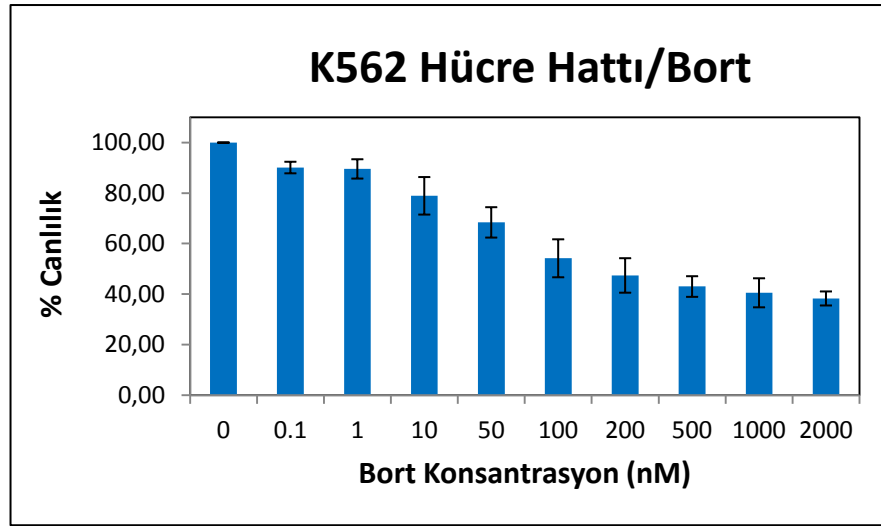
4.3.1 Hücre hatlarına Bortezomib uygulaması

Bort'in K562 ve HL-60 hücre hatlarındaki IC_{50} değerini belirlemek için Bort'in 0.1nM-2000 nM arasında belirlenen konsantrasyonları uygulandı. Farklı gün ve zamanlarda yapılan deneylerde her bir konsantrasyondan 8 tekrar olacak şekilde çalışmalar yapıldı. Deneyler sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları alınarak Bort'un IC_{50} değeri belirlendi.

K562 hücre hattında Bort' in IC_{50} değeri farklı zaman aralıklarında yapılan 6 deney sonucunda belirlendi. Deneyler sonucunda elde edilen % canlılık değerlerinin ortalamaları alınarak Bort'in IC_{50} değeri hesaplandı. K562 hücre hattı için IC_{50} Bort değeri 200 nM olarak belirlendi. Çizelge 4.1'de Bort konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri verilmektedir. Şekil 4.5'de ise Bort'in K562 hücre hattındaki % canlılık üzerine etki grafiği görülmektedir.

Çizelge 4.1: Bort konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri.

Bort (μ M)	0	0.0001	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2
% Canlılık	100,0	90,1	89,6	78,9	68,4	54,2	47,4	43,0	40,6	38,3
Standart Sapma	0,0	2,3	3,8	7,4	6,0	7,5	6,8	4,1	5,7	2,8

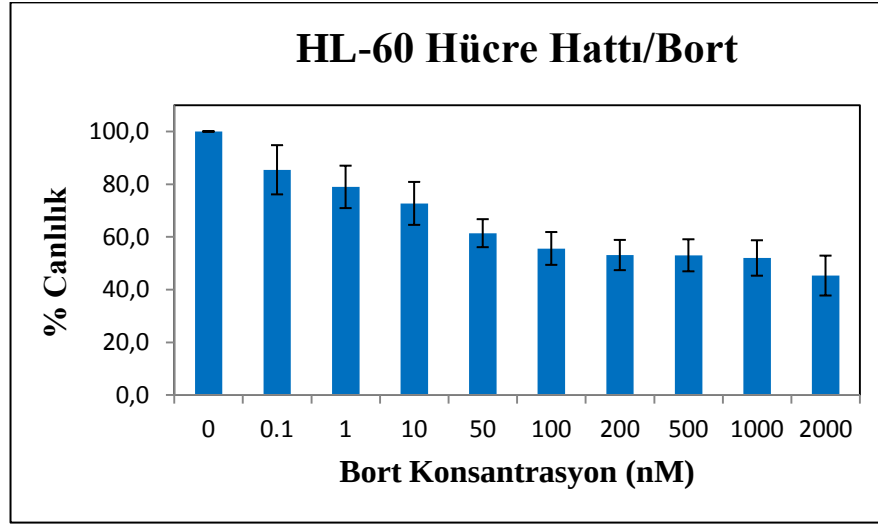


Şekil 4.5: Bort konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık üzerine etkisini gösteren grafik.

Bort'in HL-60 hücre hattı için IC_{50} değeri farklı gün ve zamanlarda yapılan 5 ayrı deneyden elde edilen verilerin ortalamasından hesaplandı. Deneyler sonucunda HL-60 hücre hattı için IC_{50} Bort değeri çizelge 4.2 ve şekil 4.6'da görüldüğü gibi 100 nM olarak belirlendi.

Çizelge 4.2: HL-60 hücre hattında Bort konsantrasyonlarının % canlılık ve standart sapma değerleri.

Bort (μM)	0	0.0001	0.001	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2
% Canlılık	100,0	85,5	79,0	72,7	61,4	55,6	53,1	53,0	52,0	45,3
Standart Sapma	0,0	9,3	8,1	8,2	5,3	6,2	5,7	6,1	6,7	7,6



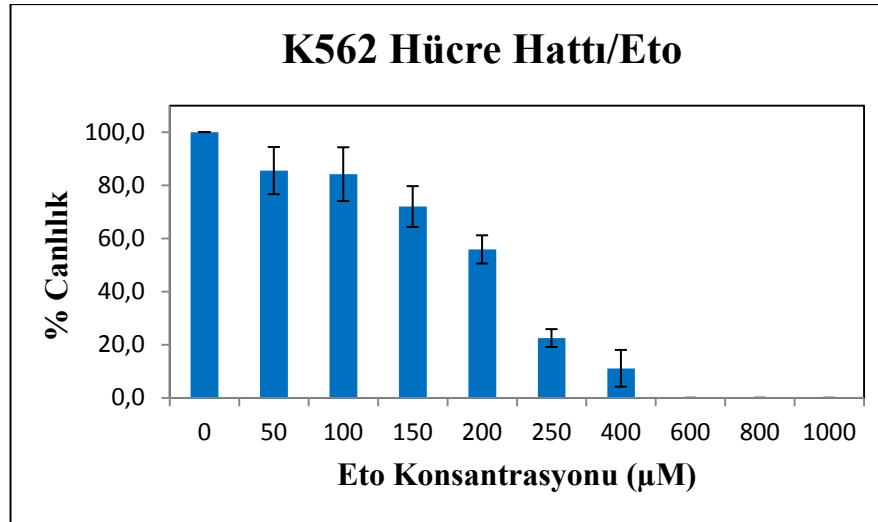
Şekil 4.6: Bort konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık üzerine etkisini gösteren grafik.

4.3.2 Hücre hatlarına Etoposid uygulanması

Eto'nun K562 hücre hatlarındaki IC_{50} değerini belirlemek için 50 μM -1000 μM arasında belirlenen konsantrasyonları uygulandı. Farklı gün ve zamanlarda yapılan 3 deneyde her bir konsantrasyon 8 tekrar olacak şekilde çalışıldı. Deneyler sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları alınarak Eto' nun IC_{50} değeri 200 μM olarak belirlendi. Çizelge 4.3'de Eto konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri verilmektedir. Şekil 4.7'de ise Eto konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık grafiği görülmektedir.

Çizelge 4.3: K562 hücre hattındaki Eto konsantrasyonlarının % canlılık ve standart sapma değerleri.

Eto (μM)	0	50	100	150	200	250	400	600	800	1000
% Canlılık	100,0	85,5	84,2	72,0	55,9	22,5	11,1	0,0	0,0	0,0
Standart Sapma	0,0	8,9	10,1	7,7	5,3	3,4	6,9	0,0	0,0	0,0

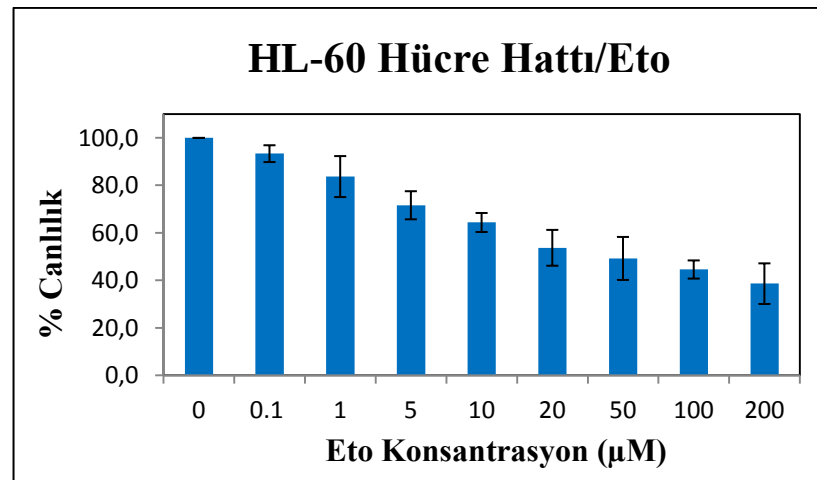


Şekil 4.7: Eto konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık üzerine etkisini gösteren grafik.

Eto'nun HL-60 hücre hattındaki IC₅₀ değerini belirlemek için ise 0.1 µM - 200 µM arasında belirlenen konsantrasyonlar uygulandı. Farklı gün ve zamanlarda yapılan 5 ayrı deneyden elde edilen verilerin ortalaması ve standart sapması çizelge 4.4'de verildi. Şekil 4.8'de de görüldüğü gibi etoposidin IC₅₀ değeri 50 µM olarak belirlendi.

Çizelge 4.4: Eto konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri.

Eto (µM)	0	0.1	1	5	10	20	50	100	200
% Canlılık	100,0	93,4	83,7	71,6	64,4	53,7	49,2	44,6	38,6
Standart Sapma	0,0	3,5	8,6	5,9	4,0	7,5	9,1	3,8	8,6



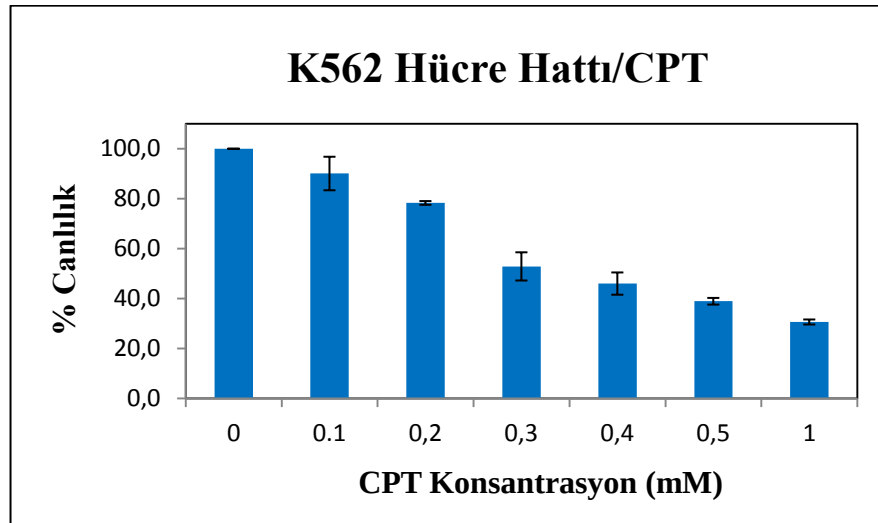
Şekil 4.8: Eto konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık üzerine etkisini gösteren grafik.

4.3.3 Hücre hatlarına CPT uygulanması

CPT'nin K562 hücre hatlarındaki IC₅₀ değerini belirlemek için CPT' nin 100 µM-1000 µM arasında belirlenen konsantrasyonları çalışıldı. Farklı gün ve zamanlarda yapılan 8 deneyde her bir konsantrasyon 8 tekrar olacak şekilde çalışıldı. Tüm deney verilerinin ortalaması alındığında CPT' nin IC₅₀ değeri 300 µM olarak belirlendi. Çizelge 4.5'de CPT konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri verilmektedir. Şekil 4.9'de ise CPT konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık grafiği görülmektedir.

Çizelge 4.5: CPT konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri.

CPT (µM)	0	100	200	300	400	500	1000
% Canlılık	100,0	90,1	78,3	52,9	46,0	38,9	30,6
Standart Sapma	0,0	6,7	0,7	5,6	4,5	1,3	1,0

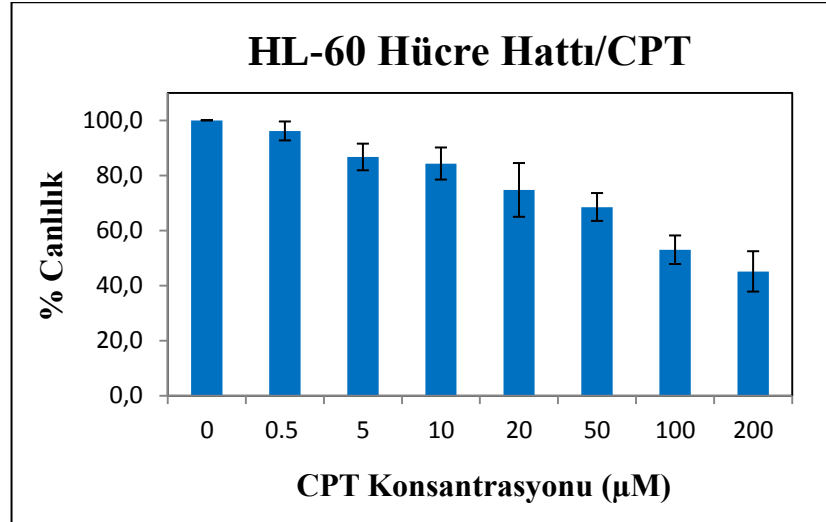


Şekil 4.9: CPT konsantrasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık üzerine etki grafiği.

CPT'nin HL-60 hücre hattındaki IC₅₀ değerini belirlemek için ise 0.5 µM-200 µM aralığındaki konsantrasyonlar çalışıldı. Farklı gün ve zamanlarda yapılan 5 ayrı deneyden elde edilen verilerin ortalaması alınarak % canlılık değerleri hesaplandı. Deneyler sonucunda CPT'in IC₅₀ değeri çizelge 4.6 ve Şekil 4.10'da görüldüğü gibi 100 µM olarak belirlendi.

Çizelge 4.6: CPT konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık ve standart sapma değerleri.

CPT (μM)	0	0.5	5	10	20	50	100	200
% Canlılık	100,0	96,1	86,7	84,3	74,7	68,5	53,0	45,1
Standart Sapma	0,0	3,4	4,8	5,8	9,8	5,1	5,2	7,3



Şekil 4.10: CPT konsantrasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık üzerine etki grafiği.

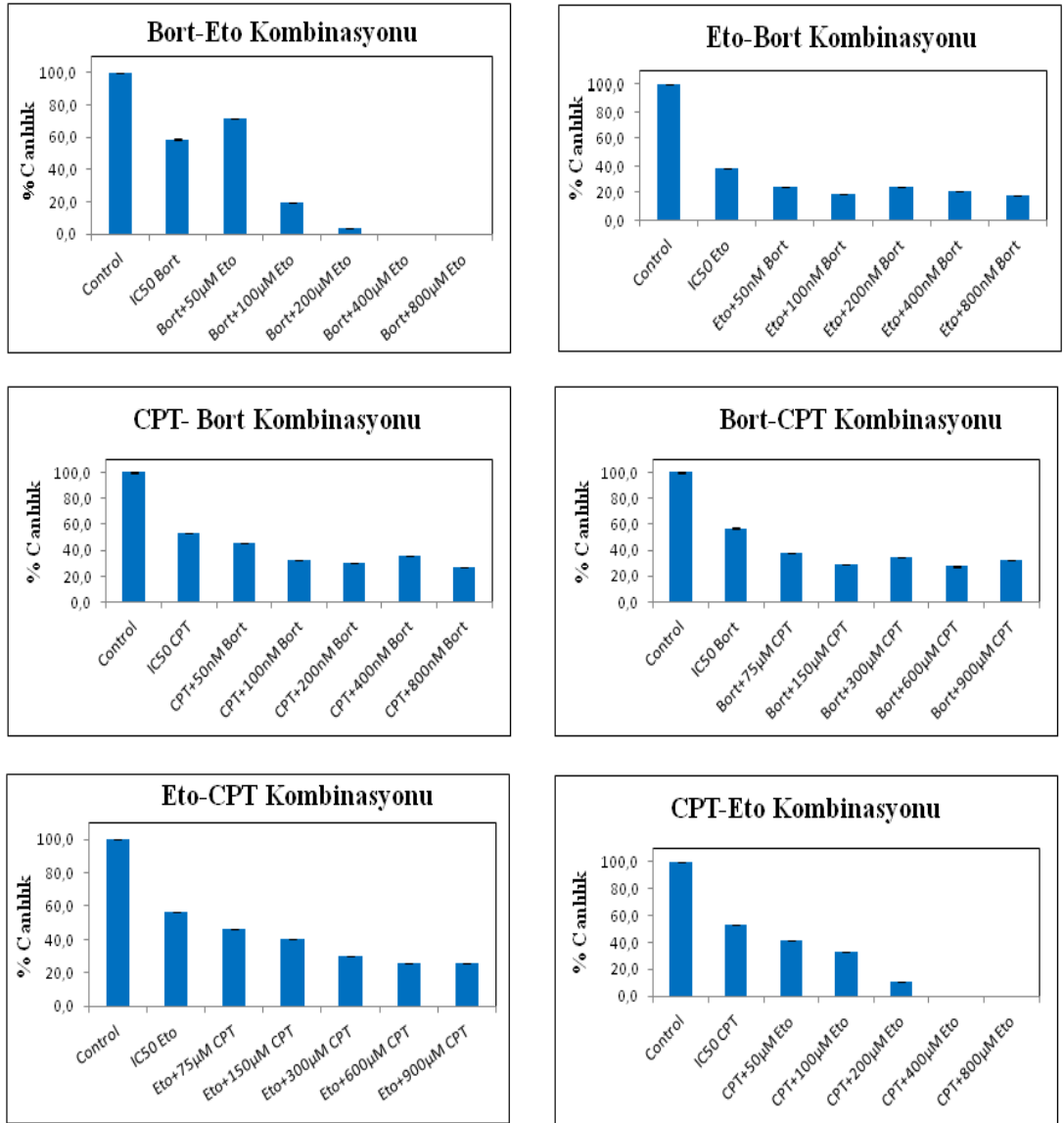
4.4 Kombine İlaç Uygulamasının K562 ve HL-60 Hücre Hatlarında % Canlılığa Etkisi

IC_{50} dozları saptanan Bort, Eto ve CPT'in farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ikili kombinasyonlarının K562 ve HL-60 hücrelerindeki % canlılığa kombine etkileri çalışıldı. Çalışmanın bu basmağında ilaçları birlikte kullanmanın kemoterapötik tedavinin etkinliğini nasıl değiştireceği saptanmak istendi. Başka bir deyişle ilaçların birlikte kullanılması ile açığa çıkacak olan sinerjistik, antagonist ya da aditif etkinin saptanması amaçlandı. Bu etkilerin saptanabilmesi için genellikle bir ilacın IC_{50} dozu ile diğer ilacın farklı konsantrasyonlarının birlikte kullanılması önerilmektedir [175]. Çizelge 4.7' de verilen IC_{50} dozlarından birisi sabit tutulup diğer ilacın farklı konsantrasyonlarını içeren karışımlar K562 ve HL-60 hücre hatlarına uygulandı. 24 saat sonra kombine ilaçların % canlılığa etkileri MTT test kullanılarak saptandı.

Çizelge 4.7: İlaçların K562 ve HL-60 hücre hattındaki IC₅₀ dozları.

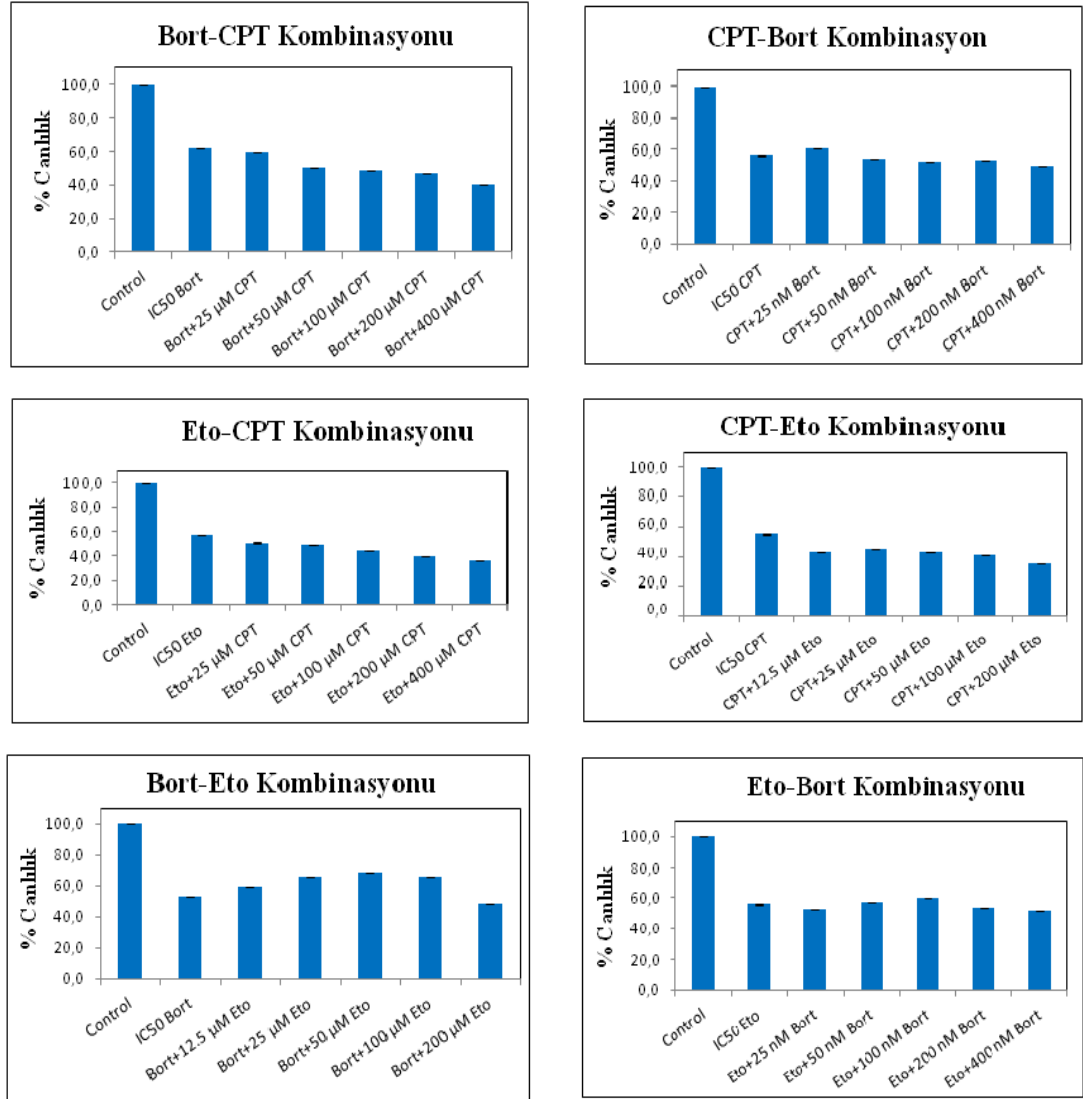
	K562	HL-60
IC ₅₀ Bort (nM)	200	100
IC ₅₀ Eto (μM)	200	50
IC ₅₀ CPT (μM)	300	100

Tüm ikili ilaç kombinasyonlarının K562 hücrelerindeki % canlılığa etkileri şekil 4.11’de görülmektedir.



Şekil 4.11: Tüm ikili ilaç kombinasyonlarının K562 hücre hattındaki % canlılık etki grafikleri (3 ayrı deneyden elde edilen 24 verinin ortalaması ± SD’nı içerir).

Tüm ikili ilaç kombinasyonlarının HL-60 hücrelerindeki % canlılığa etkileri şekil 4.12’de görülmektedir.

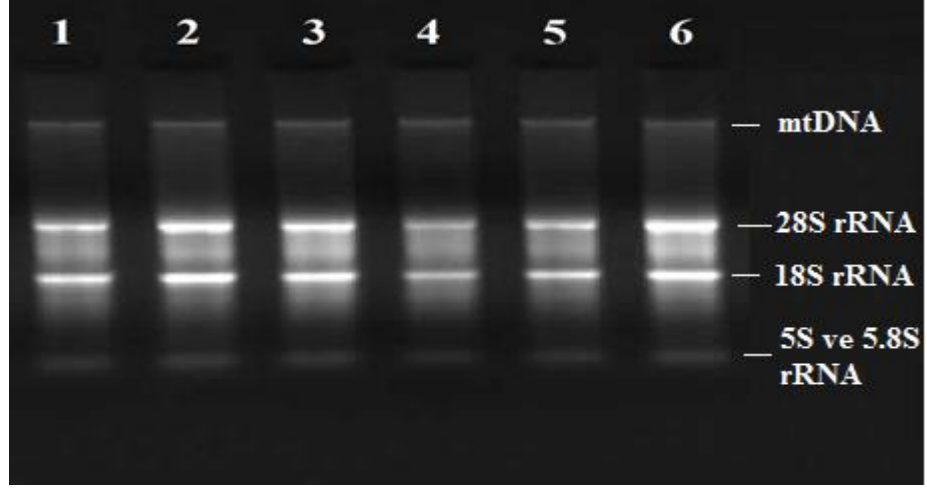


Şekil 4.12: Tüm ikili ilaç kombinasyonlarının HL-60 hücre hattındaki % canlılık etki grafikleri (3 ayrı deneyden elde edilen 24 verinin ortalaması $\pm$ SD’nı içerir).

4.5 İzole Edilen RNA’ların Saflığının Kontrolü ve Konsantrasyon Tayini

Kombine etkinin NF- κ B sinyal yolağına etkisini gen ekspresyonu düzeyinde incelemek için canlılık testi MTT ile aynı şartlar altında RNA izolasyonu yapıldı. Bu amaçla 6 kuyucuklu plate'in her kuyusuna mL’de 5×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve ilaçlarla muamele edildi. 24 saat sonra PureLink® RNA Mini Kit (Ambion-Life Technologies) protokolü kullanılarak total RNA izolasyonları yapıldı.

İzolasyonun ardından RNA' ların saflığı ve miktarı Nanodrop 2000 (Thermo) cihazı kullanılarak belirlendi. Şekil 4.13'de Bort/Eto kombinasyonunun uygulandığı K562 hücre hattındaki RNA izolasyonunun %1' lik agaroz jel görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.13: Total RNA' ların %1'lik agaroz jel görüntüsü.

4.6 Gen İfade Düzeyleri

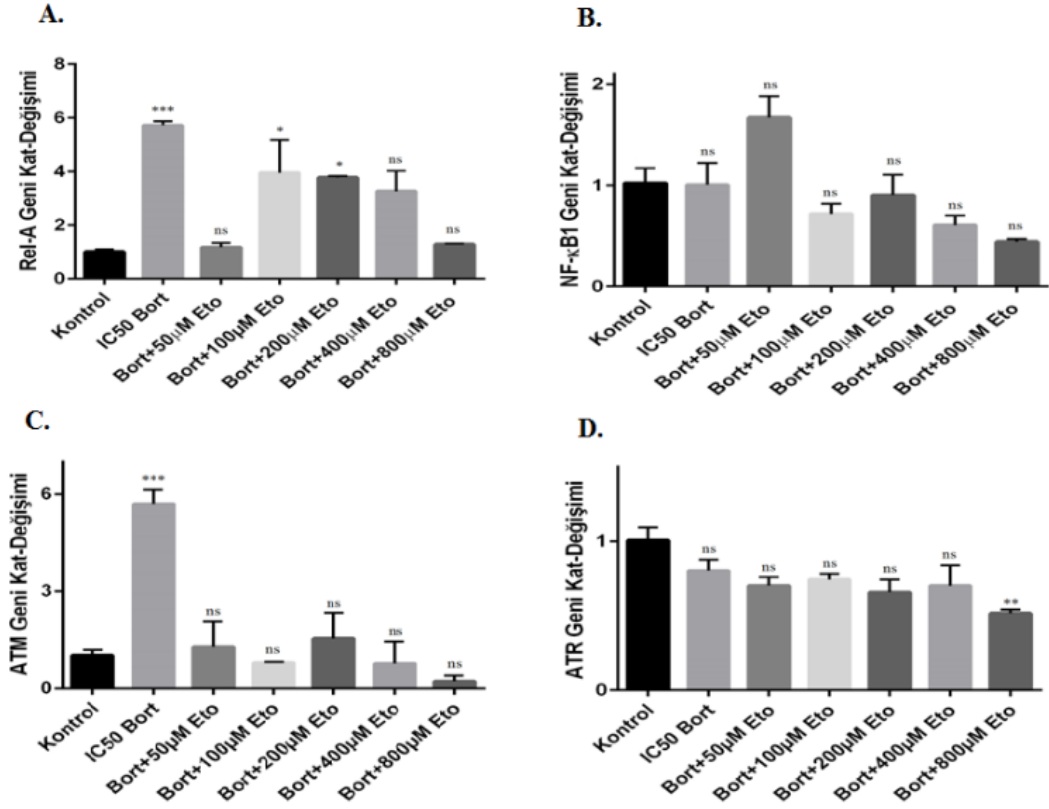
Gen ekspresyonu çalışmalarını yapmak amacıyla ABI 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystem) cihazı kullanıldı. Ayrıca ekspresyon reaksiyonları (Life Tech firmasından temin edilen) TaqMan prob kullanılarak gerçekleştirildi. Gen ekspresyonu çalışmalarında tüm hücre hatlarında daimi olarak ifade edilen β -actin geni referans gen olarak kullanıldı. Tüm genler β -actin referans geni ile birlikte aynı reaksiyon ortamında çalışılarak çoklu PCR yöntemi kullanıldı. Genlerin mRNA düzeylerindeki değişiklik $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemi ile hesaplanıp kat-değişimi olarak ifade edildi. Tüm gen ekspresyon verilerine GraphPad Prism 6.0 istatistik programı kullanılarak One-way ANOVA analizi yapıldı. Gruplar arasındaki verilerin kontrol verilerine göre anlamlı değişiklikleri ve Tukey Multi-Comparison istatistik testi uygulanarak belirlendi. Tüm bu istatistiksel çalışmalarda $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

İkili kombine ilaç uygulamasının, hücrelerde Rel-A, NF- κ B1, ATR, ATM, p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin mRNA düzeylerindeki değişimlere etkisi real time qRT-PCR yöntemi kullanılarak saptandı ve her gen için kat-değişim grafikleri çizildi. Elde edilen kat-değişim verileri ışığında her deney grubunun kendi kontrol grubuna göre anlamlılıkları istatistiksel olarak belirlendi.

4.6.1 Bortezomib-Etoposid kombinasyonun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

Farklı konsantrasyonlardaki Bort-Eto kombinasyonunun K562 hücre hattında Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin mRNA düzeyindeki değişiklik Şekil 4.14'de, bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve p53 genlerinin mRNA düzeyindeki değişiklik ise Şekil 4.15'de görülmektedir.

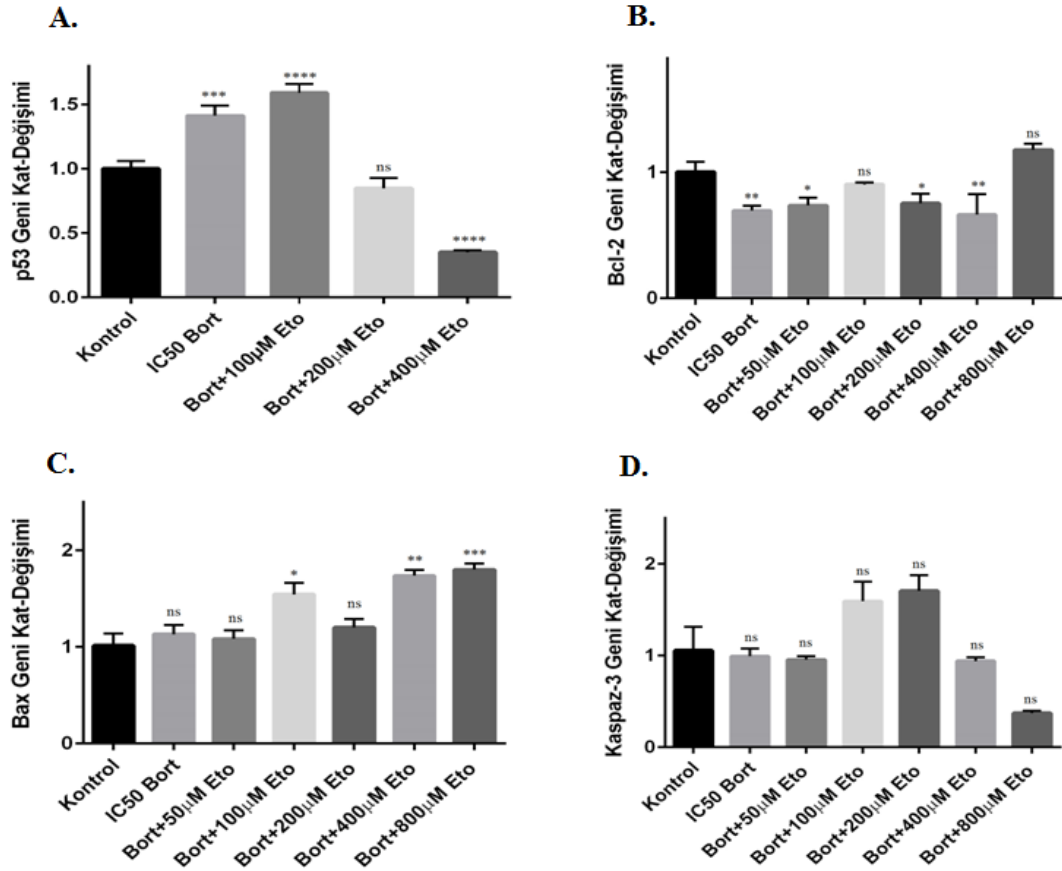
Şekil 4.14A incelendiğinde, Bort tek başına 200 nM'lık konsantrasyonunu K562 hücrelerindeki Rel-A gen ifadesini kontrole göre anlamlı bir şekilde arttırdığı görülmektedir ($p=0.0003$). Ayrıca, IC_{50} Bort üzerine 100 μ M ve 200 μ M Eto ilavesinin Rel-A gen ifadesini anlamlı bir şekilde artırdığı görülmektedir ve p değerleri sırası ile $p=0.01$ ve $p=0.03$ 'dir. Eto konsantrasyonu daha da artıkça Rel-A gen ifadesinde kontrole göre anlamlı bir artış saptanamamıştır. Buna ek olarak NF- κ B1 gen ifadesinin tüm Bort-Eto kombinasyonlarında kontrole göre anlamlı bir fark göstermediği bulunmuştur (Şekil 4.14B). ATM gen ifadesine bakıldığında ise sadece 200 nM Bort (IC_{50}) konsantrasyonunda kontrole göre oldukça anlamlı bir artışa neden olduğu ($p=0.0003$) görülmektedir (Şekil 4.14C). Son olarak Şekil 4.24D'de ATR gen ifadesinin sadece en yüksek kombinasyon dozlarında (200 nM Bort +800 μ M Eto) kontrole göre anlamlı bir artışa azalmaya neden olduğu saptanmıştır ($p=0.009$).



Şekil 4.14: Bort-Eto kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF-κB1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

Şekil 4.15A incelendiğinde, tek başına 200 nM Bort uygulamasıyla beraber 200 nM Bort üzerine 100 µM Eto ve 400 µM Eto uygulamasının K562 hücre hattında p53 gen ekspresyonu uyardığı ve bu ekspresyonun kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı değişim olduğu görüldü (p değerleri sırası ile $p=0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$ olarak belirlendi.). Şekil 4.15B'de tek başına IC₅₀ Bort ile Eto kombinasyon uygulamasının Bcl-2 geninde kontrole göre anlamlı bir azalmaya neden olduğu anlaşıldı (p değerleri sırası ile $p=0.0054$, $p=0.016$, $p=0.027$ ve $p=0.0023$ olarak bulundu). Fakat 200 nM Bort ile 100 µM Eto ve 800 µM Eto kombine etkileşiminin Bcl-2 geninde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik sergilemediği bulundu. Şekil 4.15C'de 200 nM Bort ile beraber 100 µM Eto, 400 µM Eto ve 800 µM Eto eklenmesi ile oluşan kombinasyonun Bax gen ekspresyonunun anlamlı bir şekilde artırdığı görüldü (p değerleri sırası ile $p=0.017$, $p=0.0013$, $p=0.0006$ olarak bulundu).

Şekil 4.15D' de Bort-Eto kombinasyonunun K562 hücre hattındaki Kaspaz-3 gen ifadesinde anlamlı bir değişim gözlenmedi.



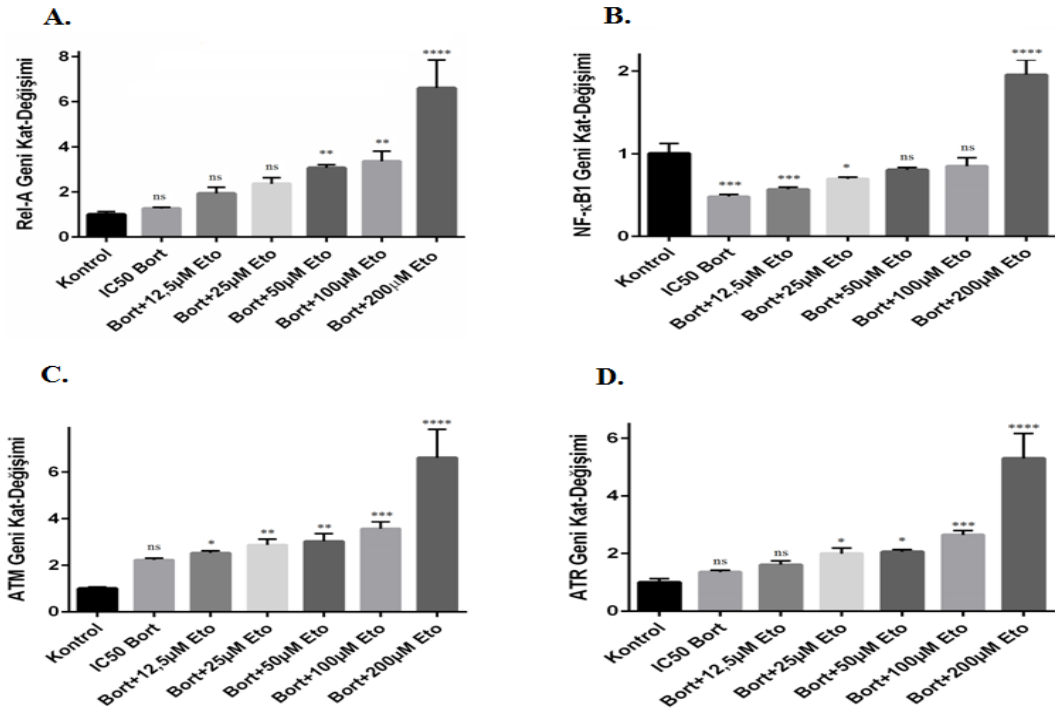
Şekil 4.15: Bort-Eto kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği, C; Bax geni kat-değişim grafiği, D; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p < 0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p < 0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p < 0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p < 0.05$.

4.6.2 Bortezomib-Etoposid kombinasyonun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

Farklı konsantrasyonlardaki Bort-Eto kombinasyonunun HL-60 hücre hattında Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin mRNA düzeyindeki değişiklik Şekil 4.16'de, bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve p53 genlerinin mRNA düzeyindeki değişiklik ise Şekil 4.17'de görülmektedir.

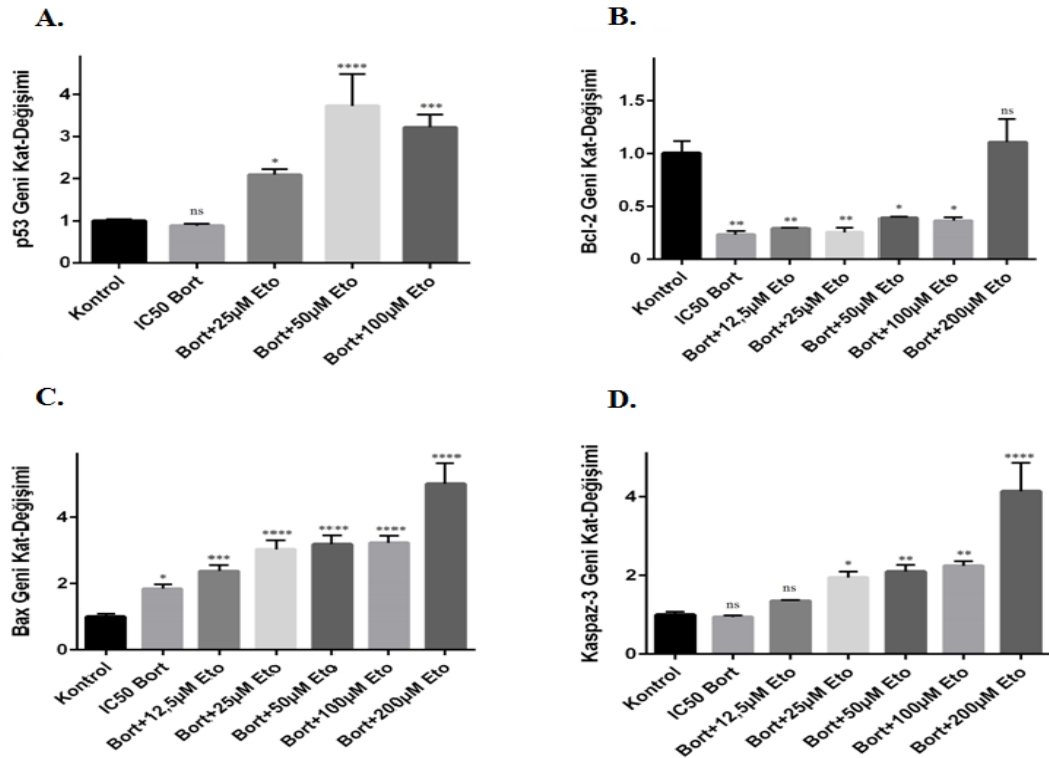
Şekil 4.16A incelendiğinde, 100 nM Bort üzerine 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M eklendiği durumlarda ise kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık bulundu ve p değerleri sırası ile $p=0.003$, $p=0.001$, $p<0.0001$ olarak hesaplandı.

Buna ek olarak 50 μ M'dan itibaren artan Eto konsantrasyonunun Rel-A gen ekspresyonunu artırdığı görülmektedir. Ayrıca, Şekil 4.16B'de NF- κ B1 geninde 100 nM Bort üzerine 12.5 μ M, 25 μ M'da azalma, 200 μ M Eto eklendiğinde ise artma gözlemlendi (p değerlerinin sırasıyla p=0.0007, p=0.013, p<0.0001 olduğu belirlendi). Şekil 4.16C'de gösterilen HL-60 hücre hattındaki Bort-Eto uygulamasında da, 100 nM Bort üzerine artan konsantrasyonlarda 12.5 μ M'dan 200 μ M'a kadar ilave edilen Eto ile beraber HL-60 hücrelerinde ATM gen ekspresyonunda kontrole göre anlamlı bir değişiklik meydana geldiği görülmektedir. Artan Eto dozu ATM gen ekspresyonunu artırdığı belirlendi (p değerleri sırası ile p=0.03, p=0.006, p=0.0033, p=0.0003, p<0.0001 olarak belirlendi). Şekil 4.16D'de 100 nM Bort üzerine 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M Eto ilavesinin ATR gen ekspresyonunda giderek artan bir şekilde anlamlı sonuçlar verdiği görüldü (p değerleri sırası ile p=0.044, p=0.029, p=0.0008 ve p<0.0001 olarak hesaplandı).



Şekil 4.16: Bort-Eto kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF- κ B1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık p<0.0001; (***) Kontrol göre anlamlılık p<0.001; (**) Kontrol göre anlamlılık p<0.01; (*) Kontrol göre anlamlılık p<0.05.

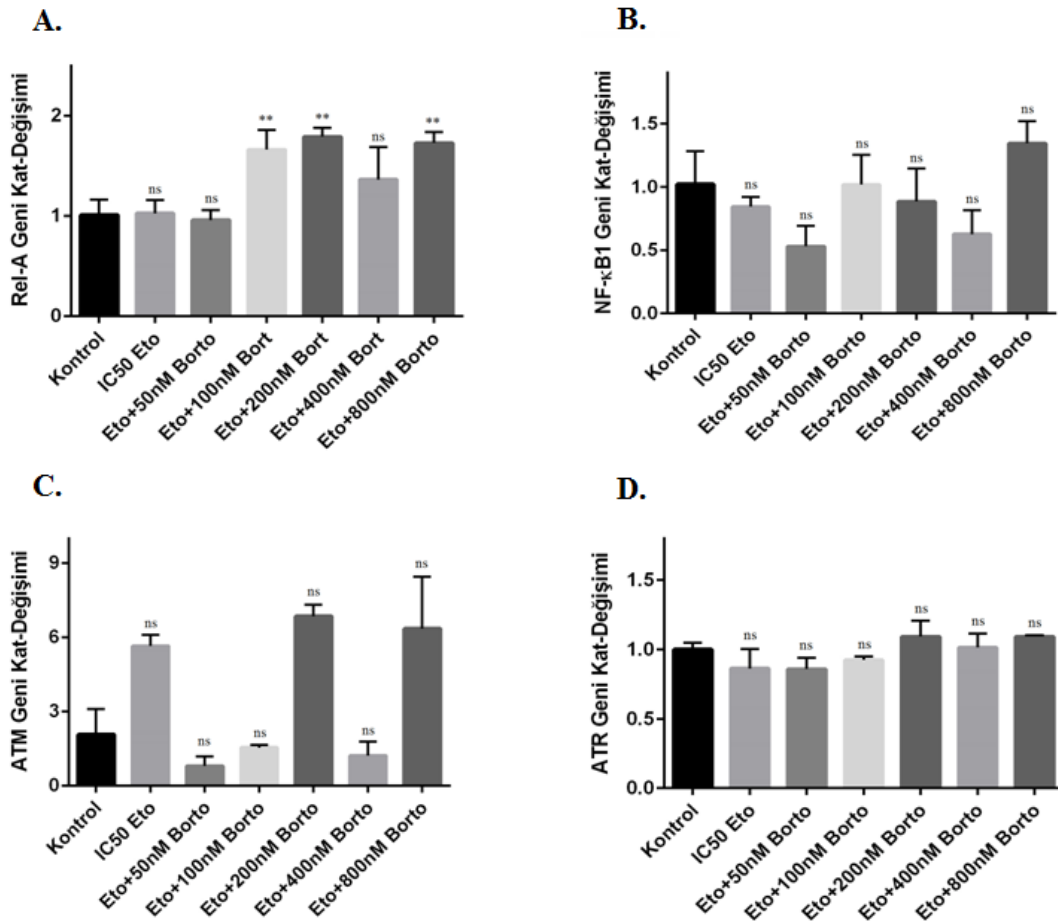
Şekil 4.17A'da 25 μ M Eto, 50 μ M Eto, 100 μ M Eto olacak şekilde artan Eto konsantrasyonunun HL-60 hücre hattında p53 gen ekspresyonuna katkıda bulunduğu ve ekspresyonu artırdığı görüldü (p değerleri sırası ile $p=0.0309$, $p<0.0001$, $p=0.0002$ olarak belirlendi). Şekil 4.17B'de gösterildiği gibi tek başına 100 nM Bort ile beraber IC_{50} Bort üzerine 12.5 μ M Eto, 25 μ M Eto, 50 μ M Eto ve 100 μ M Eto ilavesinin Bcl-2 gen ekspresyonunu azalttığı görüldü (p değerlerinin sırası ile $p=0.0032$, $p=0.0064$, $p=0.0041$, $p=0.020$ ve $p=0.014$ olarak hesaplandı). Şekil 4.17C'de Bort-Eto kombinasyonunun HL-60 hücre hattındaki Bax gen ekspresyonunu anlamlı bir şekilde doz bağımlı olarak artırdığı belirlendi (p değerleri sıra ile $p=0.048$, $p=0.001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.17D'de Bort-Eto kombinasyonunun Kaspaz-3 geninde 100 nM Bort üzerine 25 μ M Eto, 50 μ M Eto, 100 μ M Eto ve 200 μ M Eto eklendiğinde kontrole göre anlamlı bir artış sergilediği görüldü (p değerleri sırası ile $p=0.018$, $p=0.005$, $p=0.002$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı).



Şekil 4.17: Bort-Eto kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği, C; Bax geni kat-değişim grafiği, D; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

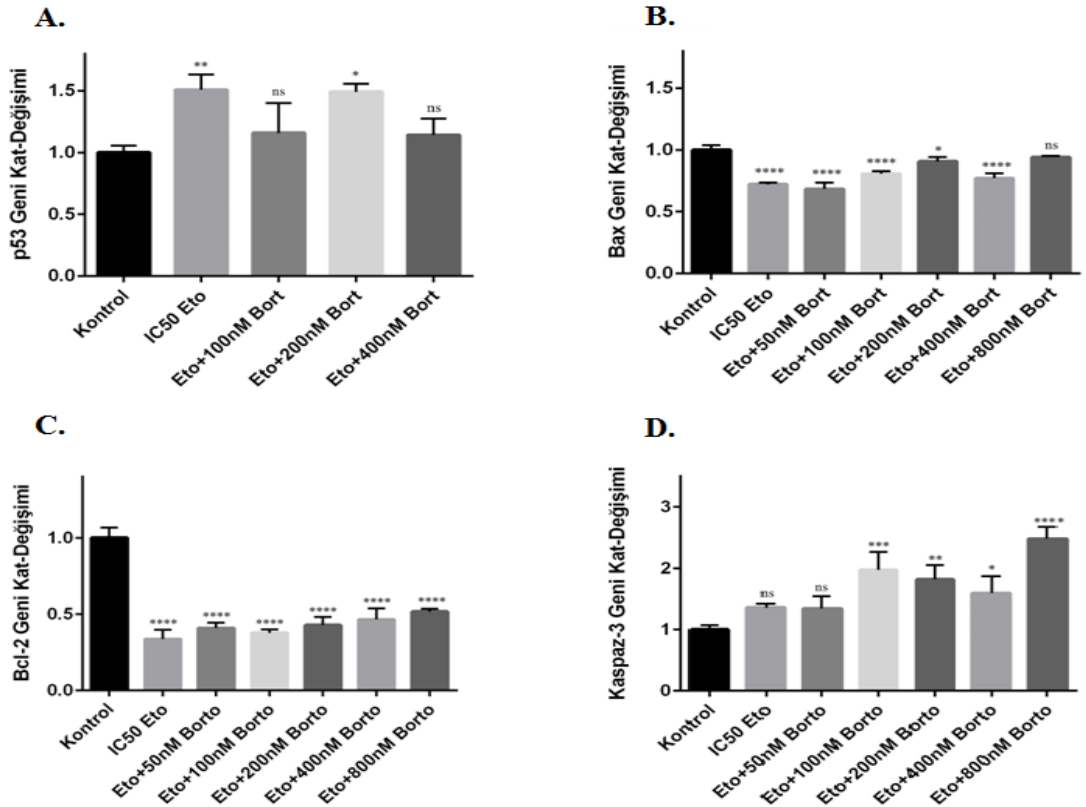
4.6.3 Etoposid-Bortezomib kombinasyonun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

Şekil 4.18A incelendiğinde, 200 µM Eto üzerine 100 nM, 200 nM ve 800 nM Bort eklenerek gerçekleştirilen kombine etkileşimin Rel-A geni için kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gerçekleştirdiği belirlendi (p değerleri sırası ile p=0.0065, p=0.0013 ve p=0.0028'dir). Şekil 4.18B'de gösterilen ve ilaç etkileşimi yapılan grupların kontrol grubuna göre NF-κB1 gen ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Şekil 4.18C'de ATM gen ekspresyonunun kontrol grubunun ATM gen ekspresyonuna göre anlamlı değişiklik görüldü. Şekil 4.18D'de gösterilen ve ilaç uygulaması yapılan grupların p değeri p>0.05 olduğu için ATR geninin ifadenmesinde meydana gelen değişikliklerin anlamlı olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.18: Eto-Bort kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF-κB1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık p<0.0001; (***) Kontrol göre anlamlılık p<0.001; (**) Kontrol göre anlamlılık p<0.01; (*) Kontrol göre anlamlılık p<0.05.

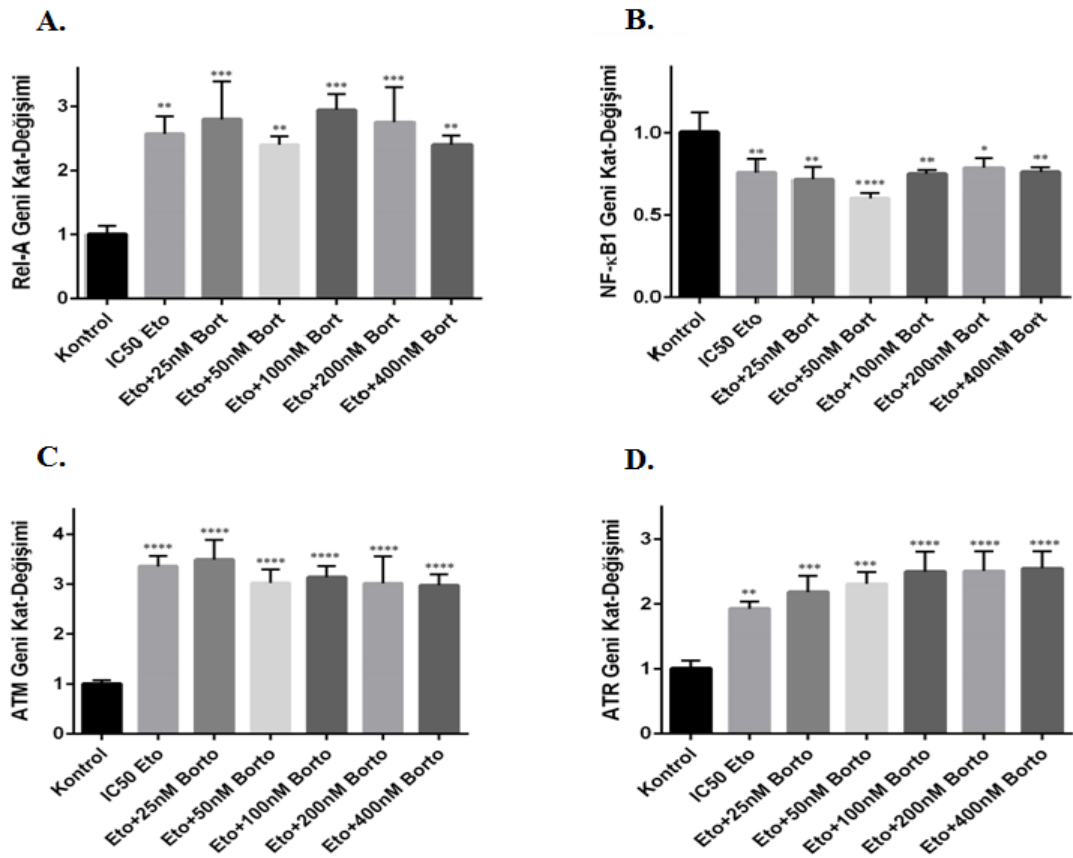
Şekil 4.19A'da ilaç etkileşimi yapılan grupların kontrol grubuna göre karşılaştırmalı anlamlılık testi sonucunda; tek başına 200 μ M Eto uygulaması ile 200 μ M Eto üzerine 200 nM Bort ilavesinin p53 gen ekspresyonunu artırdığı görüldü (p değerleri sırası ile $p=0.0089$ ve $p=0.01$ olarak hesaplandı). Şekil 4.19B'de gösterilen grupların kontrol grubuna göre Bax gen ekspresyonu değişiminin karşılaştırmalı analizinde 200 μ M Eto üzerine 200 nM Bort ve 800 nM Bort ilavesi yapılan kombine etkileşim hariç diğer grupların Bax gen ekspresyonu değişiminde anlamlı bir azalma sergilediği gösterildi (p değerleri $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.19C'de görülen ve ilaç uygulanan grupların Bcl-2 gen ekspresyonunu azalttığı bulundu ($p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.19D'de 200 μ M Eto üzerine 100 nM, 200 nM, 400 nM ve 800 nM Bort ilavesinin Kaspaz-3 gen ekspresyonunu arttırdığı ve bu artışında istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna varıldı (p değerleri sırası ile $p=0.0008$, $p=0.004$, $p=0.044$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı).



Şekil 4.19: Eto-Bort kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği, D; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

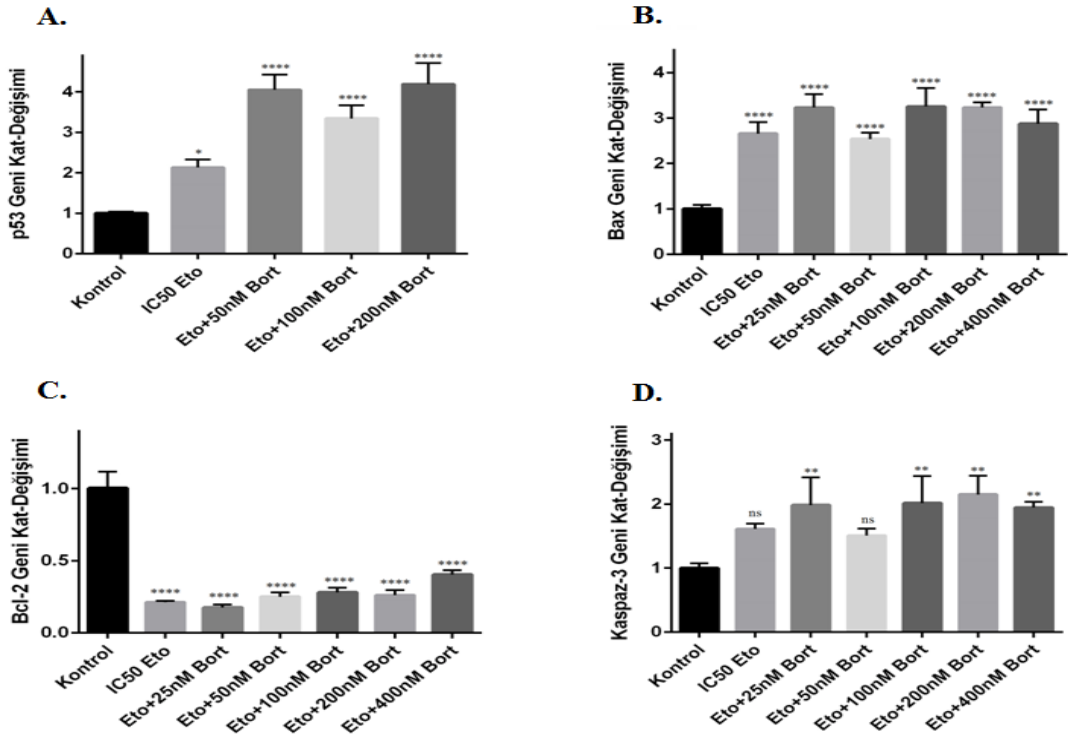
4.6.4 Etoposid-Bortezomib kombinasyonun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

Şekil 4.20 incelendiğinde, Eto-Bort kombine etkileşimi yapılan tüm grupların Rel-A gen ekspresyonunu artırdığı görüldü (p değerleri şekil 4.20A'da verilen sıra ile $p=0.0011$, $p=0.0003$, $p=0.0032$, $p=0.0001$, $p=0.0004$ ve $p=0.0032$ olarak hesaplandı). Şekil 4.20B'de gösterilen ve ilaç etkileşimi yapılan grupların NF- κ B1 gen ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya neden olduğu görüldü (p değerleri şekil 4.30B'de gösterilen şekli ile solda-sağa $p=0.008$, $p=0.0021$, $p<0.0001$, $p=0.0062$, $p=0.0206$ ve $p=0.0093$ olarak hesaplandı). Şekil 4.20C'de tüm grupların ATM geninde anlamlı bir şekilde artışa neden olduğu görüldü ($p<0.0001$). Şekil 4.20D'de gösterilen ve ilaç uygulaması yapılan grupların ATR gen ekspresyonunu artırdığı belirlendi (p değerleri sırası ile $p=0.003$, $p=0.0004$, $p=0.0001$ olarak hesaplandı).



Şekil 4.20: Eto-Bort kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF- κ B1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

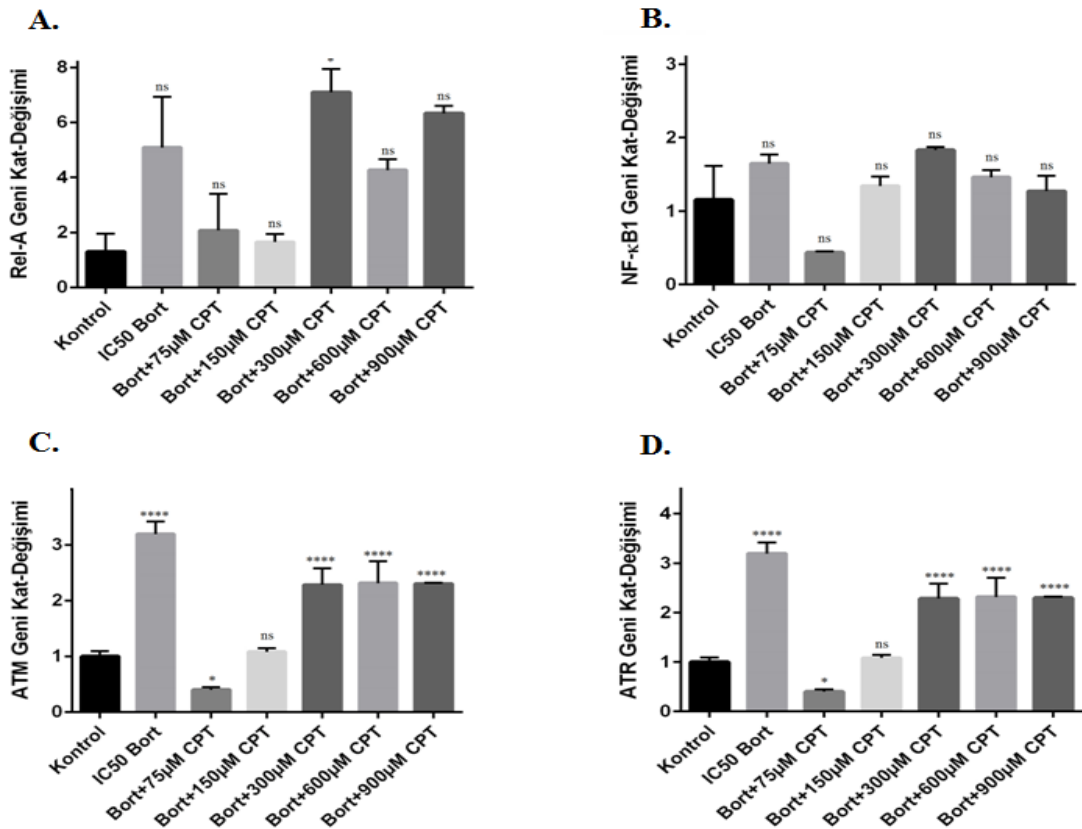
Şekil 4.21A'da gösterilen Eto-Bort kombinasyonu yapılan tüm grupların p53 gen ekspresyonunu ciddi şekilde artırdığı sonucuna varıldı ($p<0.0001$). Şekil 4.21B'de Eto-Bort kombinasyon gruplarının Bax gen ekspresyonunu artırdığı görüldü ($p<0.0001$). Şekil 4.21C'de gösterilen ve ilaç etkileşimi olan gruplarda Bcl-2 gen ekspresyonu olduğu ve bu ekspresyon seviyesinin kontrole göre daha düşük bir seviyede kaldığı görülmüştür ($p<0.0001$). Şekil 4.21D'de tek başına 50 μ M Eto'nun ve 50 μ M Eto üzerine 50 nM Bort ilavesi ile yapılan kombine etkileşimin Kaspaz-3 gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Ancak 50 μ M Eto üzerine 25 nM, 100 nM, 200 nM ve 400 nM Bort ilavesinin Kaspaz-3 gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olduğu görüldü (p değerleri sırası ile $p=0.0059$, $p=0.0045$, $p=0.0015$ ve $p=0.0081$ olarak hesaplandı).



Şekil 4.21: Eto-Bort kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği, D; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

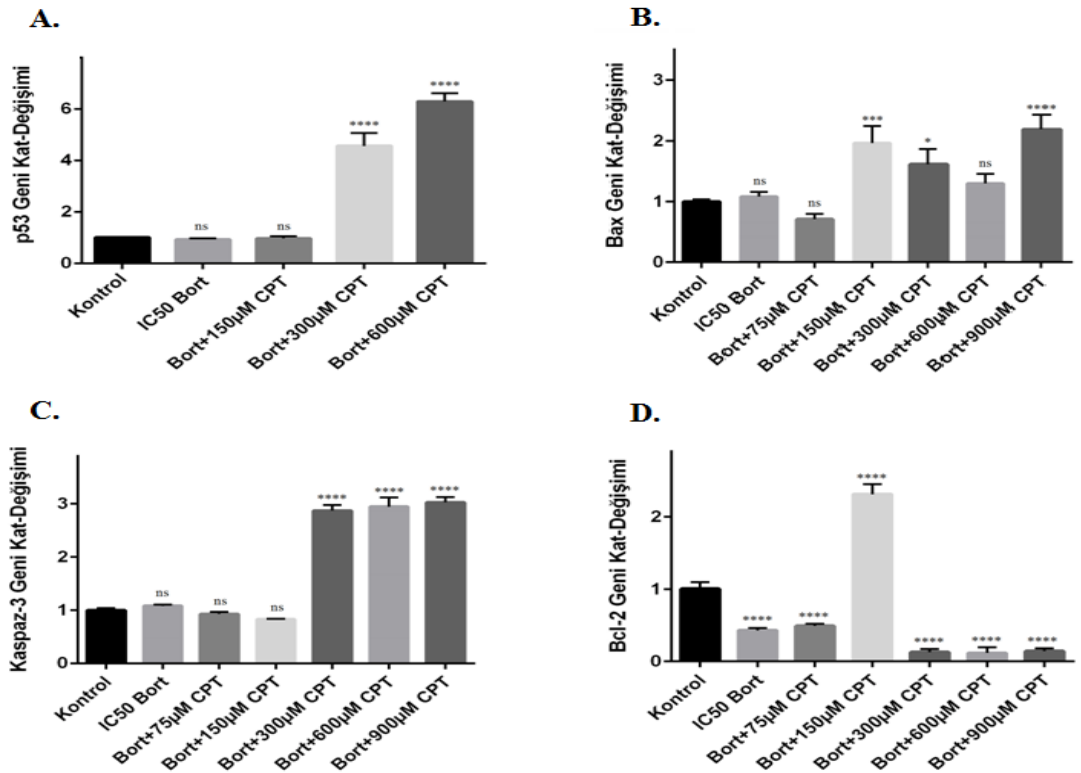
4.6.5 Bortezomib-Camptothecin kombinasyonunun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

Şekil 4.22'de Bort-CPT kombine etkileşim K562 hücre hattında Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR gen ekspresyon grafikleri görülmektedir. Şekil 4.22A'da sadece 200 nM Bort üzerine 300 μ M CPT ilavesi ile yapılan uygulamanın Rel-A gen ifadesini arttırdığı görüldü ($p=0.046$). Şekil 4.22B'de Bort-CPT kombinasyonunun NF- κ B1 gen ifadesinde anlamlı değişiklik sergilemediği belirlendi. Şekil 4.22C'de 200 nM Bort üzerine 150 μ M CPT eklenen grup hariç diğer tüm grupların ATM gen ifadesini arttırdığı bulundu (p değerleri sırayla ile $p<0.0001$, $p=0.0425$, $p=0.999$, $p<0.0001$, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.22D'de 200 nM Bort üzerine 150 μ M CPT ilavesi olan grup hariç diğer tüm grupların ATR gen ifadesini arttırdığı belirlendi (p değerleri $p<0.0001$, $p=0.04$, $p=0.99$, $p<0.0001$, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$ olarak bulundu).



Şekil 4.22: Bort-CPT kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF- κ B1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

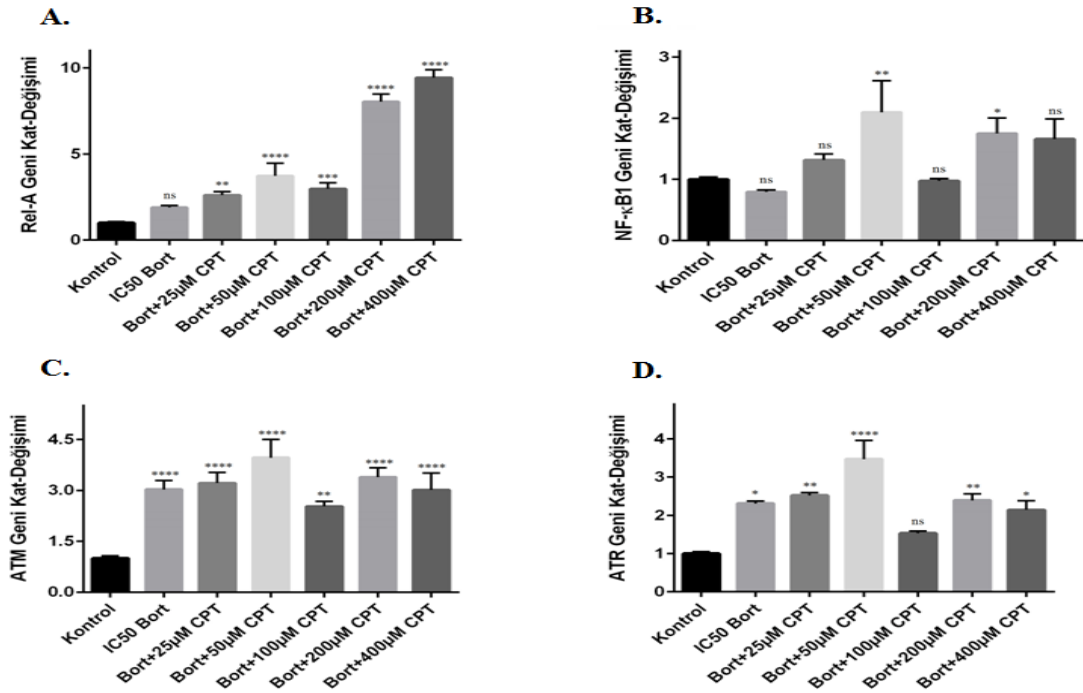
Şekil 4.23 incelendiğinde, Bort-CPT kombinasyonunun sadece 200 nM Bort üzerine 300 µM CPT ve 600 µM CPT eklenmesi ile oluşan kombine uygulamalarının p53 gen ifadesinin arttırdığı belirlendi (Şekil 4.23A'da verilen sıra ile p değerleri; p=0.997, p>0.999, p<0.0001 ve p<0.0001 olarak hesaplandı). Şekil 4.23B'de Bort-CPT kombinasyonunun sadece 200 nM Bort üzerine 150 µM CPT, 300 µM CPT ve 900 µM CPT eklenmesi ile oluşan kombine etkileşim gruplarının Bax gen ifadesini arttırdığı fakat diğer gruplarda anlamlı bir değişim gözlenmedi (p değerleri; p=0.997, p=0.492, p=0.0003, p=0.014, p=0.462 ve p<0.0001 olarak hesaplandı). Şekil 4.23C'de istatistiksel analiz sonucunda sadece 200 nM Bort üzerine 300 µM CPT, 600 µM CPT ve 900 µM CPT eklenmesi ile oluşan grupların Kaspaz-3 gen ifadesini arttırdığı bulundu (p<0.0001). Şekil 4.23D'de Bort-CPT kombine uygulaması yapılan gruplarda Bcl-2 gen ifadesinde sadece 200nM Bort üzerine 150µM CPT ilavesi yapılan grupta artış olduğu diğer gruplarda Bcl-2 gen ifadesinde azalma olduğu belirlendi (p<0.0001).



Şekil 4.23: Bort-CPT kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği, D; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık p<0.0001; (***) Kontrol göre anlamlılık p<0.001; (**) Kontrol göre anlamlılık p<0.01; (*) Kontrol göre anlamlılık p<0.05.

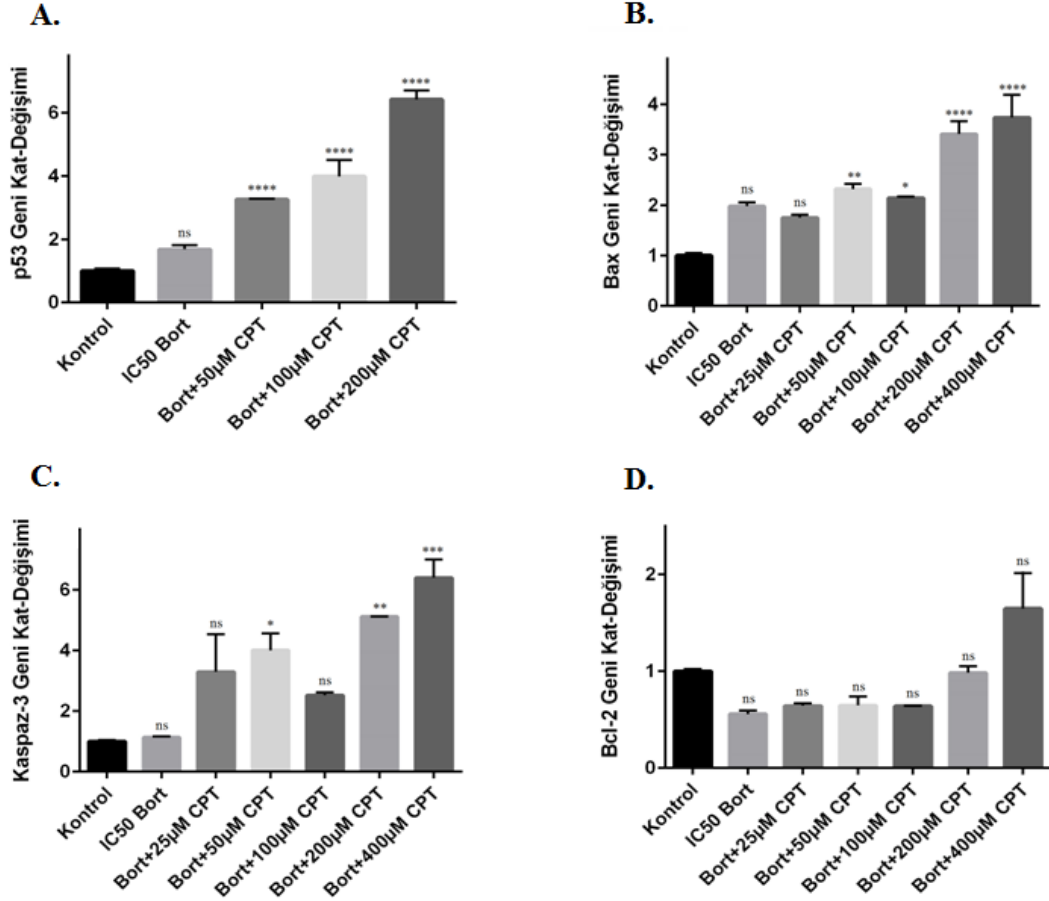
4.6.6 Bortezomib-Camptothecin kombinasyonunun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

Şekil 4.24A'da görüldüğü üzere, Bort-CPT kombine etkinin HL-60 hücre hattındaki Rel-A gen ekspresyonunu anlamlı bir artışa neden olduğu ve HL-60 hücre hattında Rel-A gen ekspresyonunu ciddi bir şekilde artırdığı belirlenmiştir (p değerleri soldan-sağa sıra ile $p=0.0034$, $p<0.0001$, $p=0.0005$, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Buna ek olarak; şekil 4.24B'de kombine etkileşim yapılan grupların NF- κ B1 gen ekspresyonundaki değişikliğin kontrol grubuna göre karşılaştırmalı anlamlılık testinde; 100 nM Bort üzerine 50 μ M ve 200 μ M CPT eklenmesinin NF- κ B1 geninde anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi (p değerleri sıra ile $p=0.0017$ ve $p=0.0351$ olarak hesaplandı). Şekil 4.24C'de kombine etkileşimi yapılan tüm gruplarda ATM gen ekspresyonunda anlamlı bir şekilde artma olduğu sonucuna varıldı (p değerleri sıra ile $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.0012$, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Buna ek olarak; şekil 4.24D'de gösterilen grupların kontrol grubu ATR gen ekspresyon sonucuna göre yapılan karşılaştırmalı analiz sonucunda 100 nM Bort üzerine 100 μ M CPT eklenmesi ile yapılan kombinasyon dışında kalan grupların ATR gen ifadesini arttırdığı görüldü (p değerleri sırası ile $p=0.011$, $p=0.0033$, $p<0.0001$, $p=0.66$, $p=0.007$ ve $p=0.03$ olarak hesaplandı).



Şekil 4.24: Bort-CPT kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF- κ B1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği.

Bort-CPT kombine etkileşimin HL-60 hücre hattında yapılan p53 gen ekspresyon çalışması sonucunda elde edilen kat-değişim verileri istatistiksel olarak analiz edildi. Şekil 4.25A'da gösterilen tek ve kombine ilaç etkileşimi olan grupların p53 gen ifadesinde, 100 nM Bort eklenen grup dışındaki grupların p53 gen ekspresyonundaki arttırdığı belirlendi (p değerleri; $p=0.749$, $p<0.0001$, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.25B'de verilen grupların Bax gen ekspresyonu değişimi için yapılan karşılaştırmalı analiz sonucunda; 100 nM Bort üzerine 50 μ M CPT, 100 μ M CPT, 200 μ M CPT ve 400 μ M CPT eklenmesi ile meydana gelen kombinasyon gruplarının Bax gen ifadesini arttırdığı görüldü ($p<0.0001$). Şekil 4.25C'de verilen grupların kontrol grubuna göre karşılaştırmalı analiz sonucunda; 100 nM Bort üzerine 50 μ M CPT, 200 μ M CPT ve 400 μ M CPT eklenmesi ile meydana gelen kombine etkileşimdeki Kaspaz-3 gen ifadesini arttırdığı bulundu. Fakat diğer grupların anlamlı bir değişiklik sergilemediği belirlendi (p değerleri; $p>0.9999$, $p=0.126$, $p=0.026$, $p=0.505$, $p=0.0021$ ve $p=0.0001$ olarak hesaplandı). Öte yandan, Bort-CPT kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattında Bcl-2 geni için yapılan çalışmada elde edilen kat-değişim verileri ile istatistiksel analiz yapıldı. Yapılan analiz sonucunda $p=0.05$ olarak bulundu. Çalışmanın kendi içinde anlamlı olmadığı görüldü. Buna ek olarak; gruplar arasında da kontrol grubuna göre herhangi bir anlamlılık sergilemediği istatistiksel olarak belirlendi. Şekil 4.25D'de Bort-CPT kombinasyonunun HL-60 hücre hattındaki Bcl-2 gen ekspresyonu kat-değişim grafiği verilmektedir.

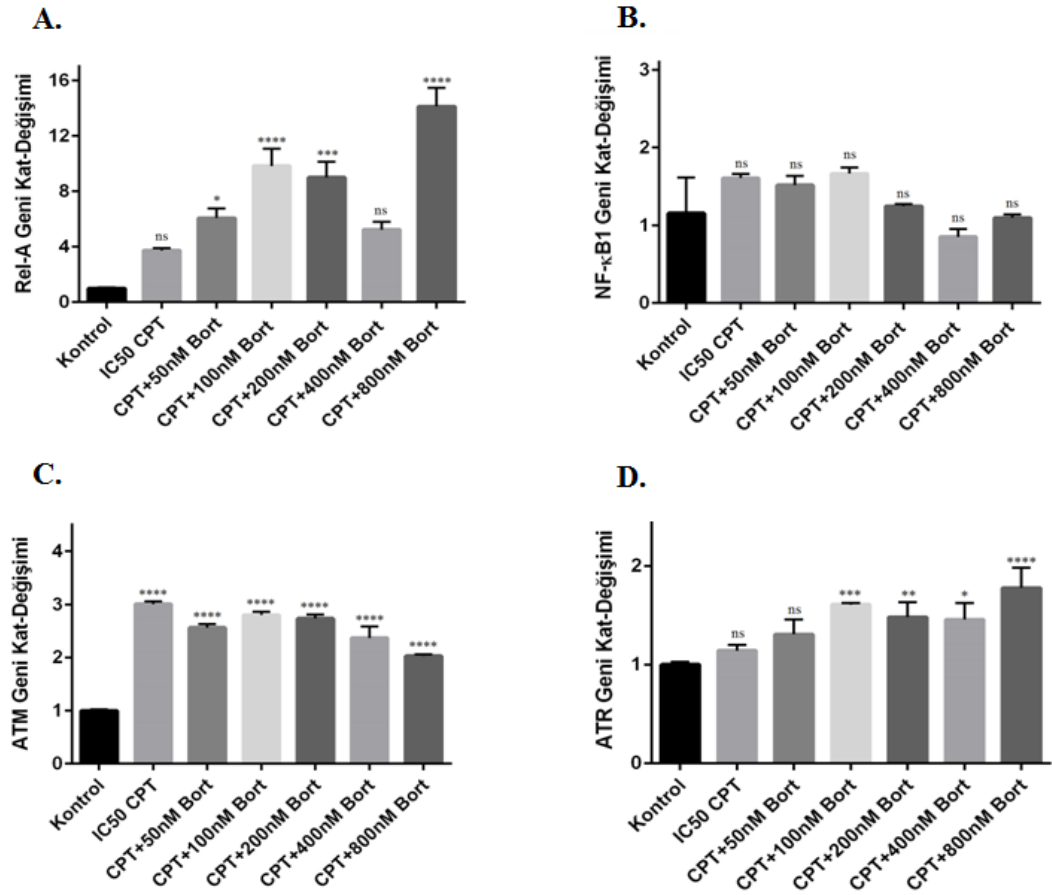


Şekil 4.25: Bort-CPT kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği, D; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

4.6.7 Camptothecin-Bortezomib kombinasyonunun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

CPT-Bort kombine etkileşiminin K562 hücre hattındaki Rel-A gen ekspresyonu çalışmalarında; 300 µM CPT ilave edilen grup ile 300 µM CPT+400 nM Bort ilave edilerek elde edilen grubun Rel-A gen ekspresyonundaki değişikliğin anlamlı olmadığı anlaşıldı. Fakat şekil 4.26A'da gösterilen diğer grupların Rel-A gen ekspresyonunu arttırdığı belirlendi (p değerleri; $p=0.356$, $p=0.153$, $p<0.0001$, $p=0.0003$, $p=0.052$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.26B'de CPT-Bort kombine etkileşiminin K562 hücre hattında NF-κB1 gen ekspresyonu çalışmaları sonucunda yapılan istatistiksel analizde çalışmanın anlamlı olmadığı belirlendi.

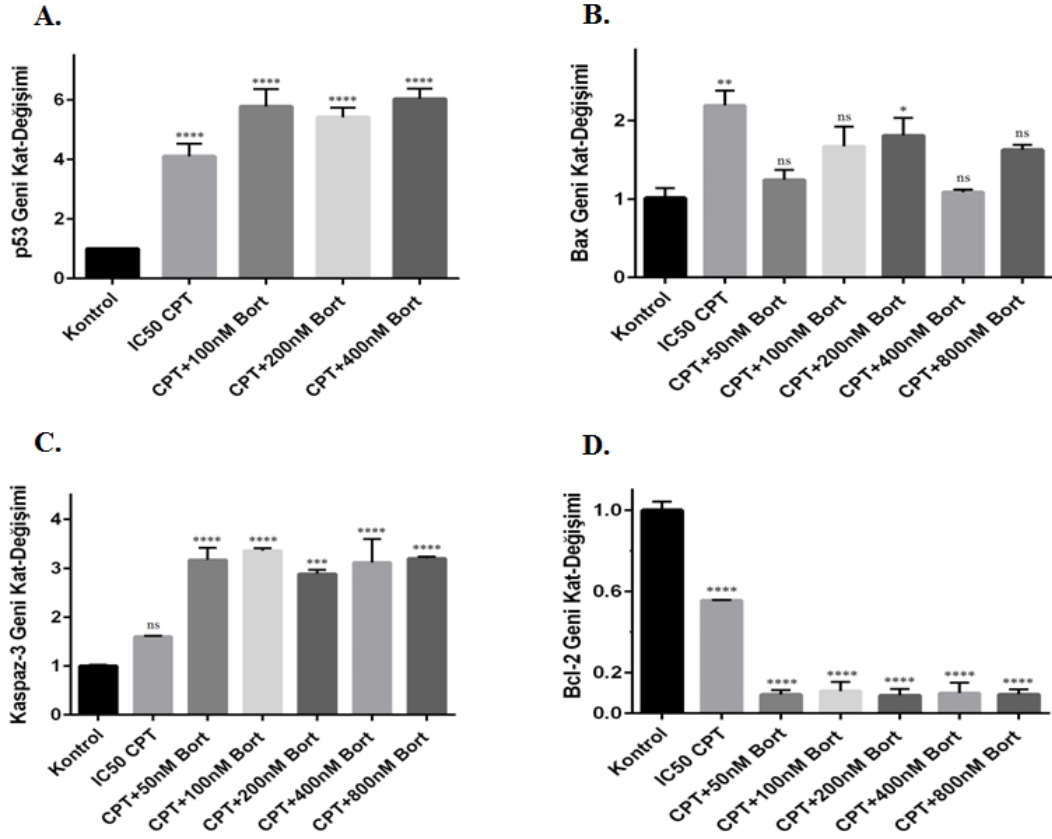
Şekil 4.26C'de CPT-Bort kombine etkileşiminin K562 hücre hattında ATM gen ekspresyonunu arttırdığı ve bu değişiminin de istatistiksel olarak anlamlı olduğu sonucuna varıldı ($p<0.0001$). Öte yandan, şekil 4.26D'de 300 μ M CPT eklenen grup ile 300 μ M CPT+50 nM Bort eklenmesi sonucu oluşan grubun anlamlı değişiklik sergilemediği görüldü. Fakat diğer grupların ATR gen ifadesini arttırdığı belirlendi (p değerleri; $p=0.821$, $p=0.126$, $p=0.0009$, $p=0.0069$, $p=0.0104$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı).



Şekil 4.26: CPT-Bort kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF-κB1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF-κB1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

Şekil 4.27A'da gösterilen CPT-Bort etkileşimi yapılan tüm gruplarda p53 gen ifadesinin arttığı görüldü ($p<0.0001$). Şekil 4.27B'de, tek başına 300 μ M CPT grubu ile 300 μ M CPT+200 nM Bort ilavesi ile oluşan gruplarda Bax gen ifadesinin arttığı belirlendi (p değeri sıra ile, $p=0.0023$ ve $p=0.0461$ olarak hesaplandı).

Şekil 4.27C'de gösterilen ve ilaç uygulaması yapılan gruplardan tek başına 300 μ M CPT uygulaması yapılan grup hariç diğer tüm gruplarda anlamlı bir artma olduğu görüldü (p değerleri; $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.0003$, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.27D'de CPT-Bort kombinasyon uygulamasının K562 hücre hattında Bcl-2 gen ifadesini anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü ($p<0.0001$).

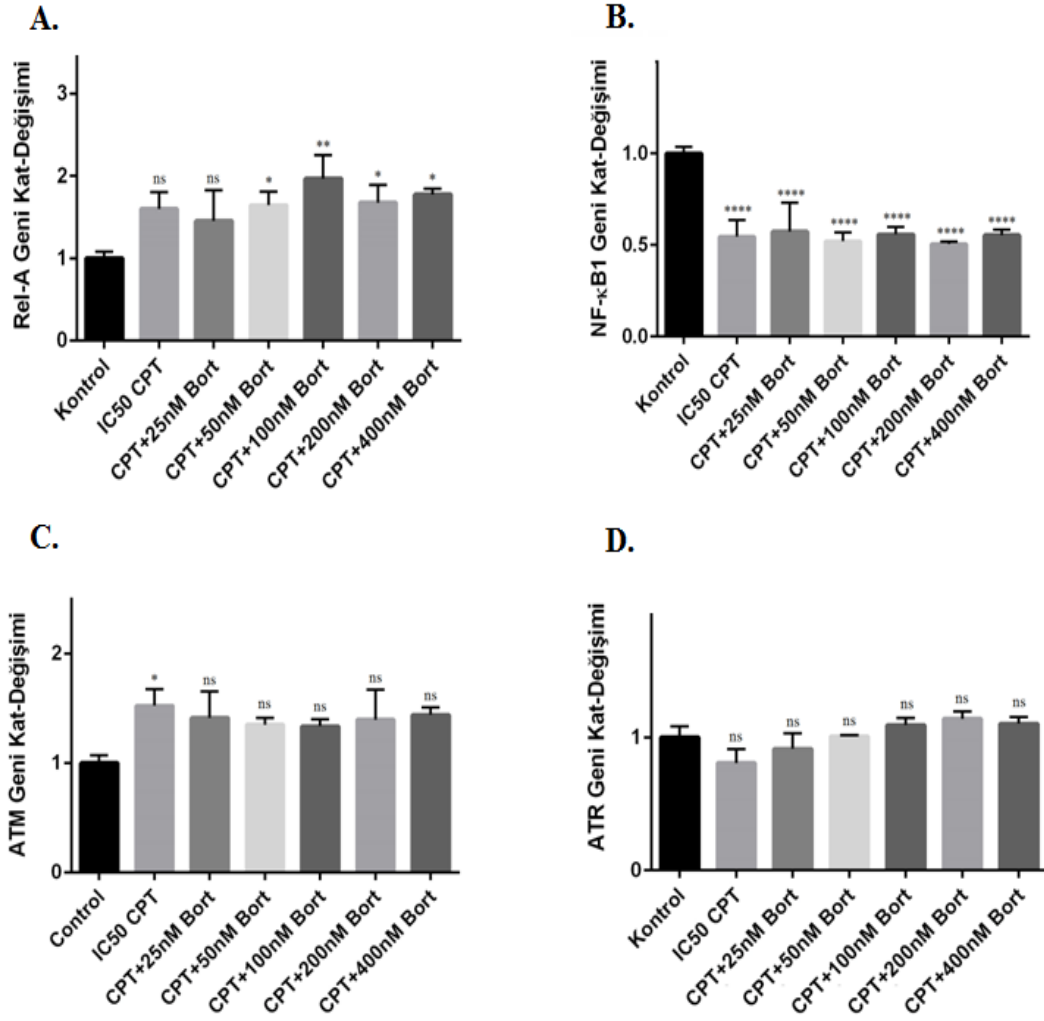


Şekil 4.27: CPT-Bort kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği, D; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

4.6.8 Camptothecin-Bortezomib kombinasyonunun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

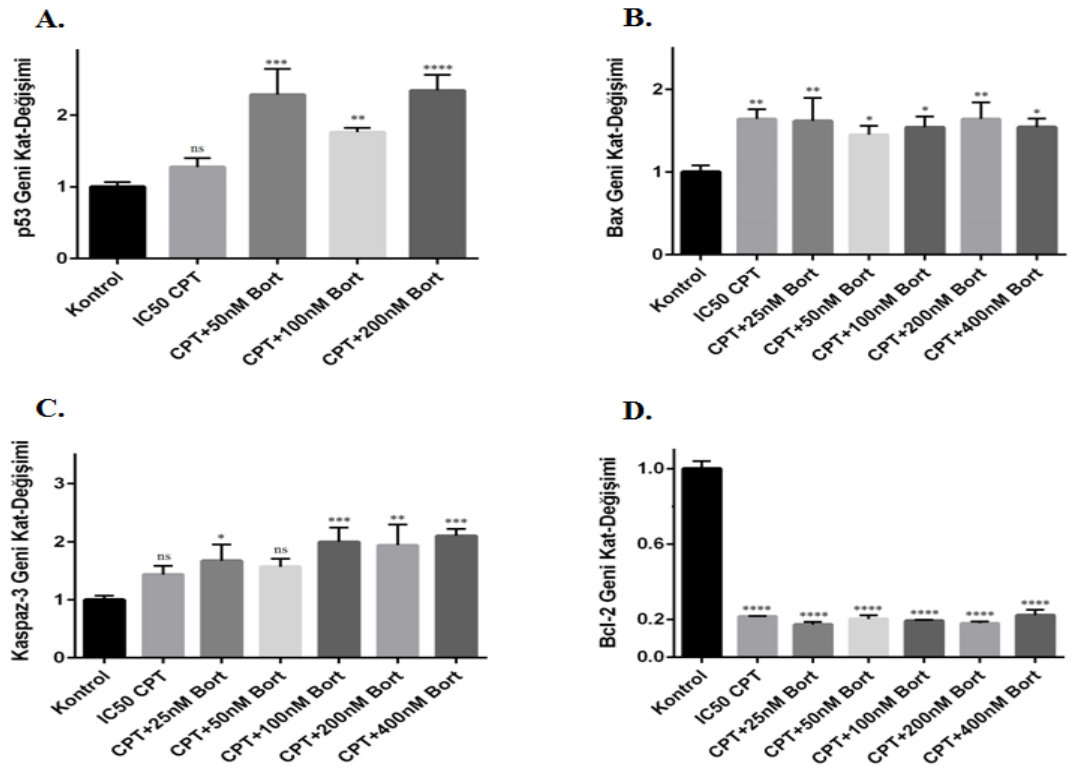
Şekil 4.28A'da CPT-Bort kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattında Rel-A gen ifadesine bakıldığında; tek başına 100 μ M CPT ve 100 μ M CPT+25 nM Bort eklenerek oluşan kombinasyon grubunun istatistiksel olarak anlamlı değişiklik sergilemediği görüldü. Fakat diğer tüm gruplarda Rel-A gen ekspresyonunun arttığı belirlendi (p değerleri; $p=0.039$, $p=0.0016$, $p=0.028$, $p=0.01$ olarak hesaplandı).

Şekil 4.28B'de görüldüğü üzere CPT-Bort kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattında yapılan NF- κ B1 gen ekspresyonunu baskıladığı ve bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.0001$). Buna ek olarak; şekil 4.28C'de verilen ve ilaç etkileşimi yapılan tüm grupların kontrol grubu ATM ekspresyonu ile yapılan karşılaştırmalı analizinde, sadece 100 μ M CPT eklenerek elde edilen grubun anlamlı bir artış sergilediği belirlendi ($p=0.015$). Öte yandan, şekil 4.28D'de gösterilen CPT-Bort kombinasyonu yapılan tüm gruplarda meydana gelen ATR gen ekspresyonunda anlamlı bir değişim olmadığı görüldü.



Şekil 4.28: CPT-Bort kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF- κ B1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

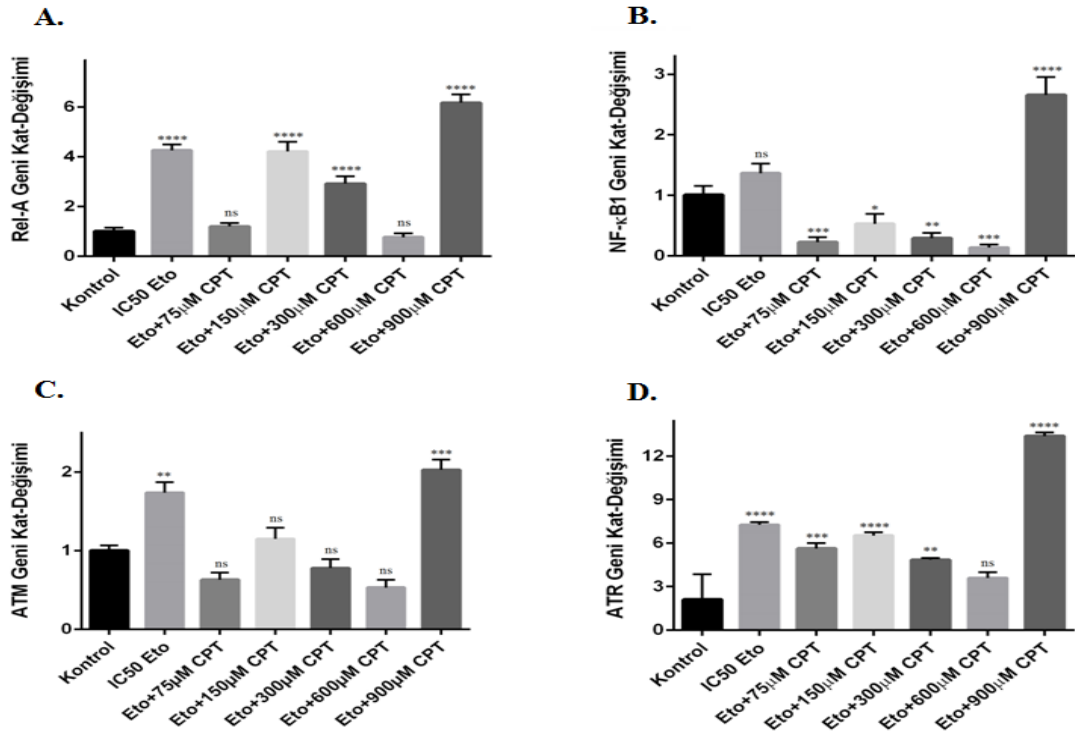
Şekil 4.29A'da CPT-Bort kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattında p53 gen ifadesini tüm gruplarda arttırdığı belirlendi ($p=0.488$, $p=0.0001$, $p=0.0063$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Öte yandan; şekil 4.29B'de CPT-Bort kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattındaki Bax gen ifadesini artırdığı ve bu artışta anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0033$, $p=0.0045$, $p=0.046$, $p=0.013$, $p=0.0032$ ve $p=0.012$ olarak hesaplandı). Diğer taraftan şekil 4.29C'de CPT-Bort kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattında Kaspaz-3 gen ifadesini artırdığı ve bununla kontrole göre anlamlı olduğu görüldü ($p=0.0255$, $p=0.001$, $p=0.0017$ ve $p=0.0003$ olarak hesaplandı). Analiz sonucunda 100 μM CPT ilavesi yapılan grup ile 100 μM CPT+50 nM Bort ilavesi yapılan grubun Kaspaz-3 gen ifadesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. Şekil 4.29D'de CPT-Bort etkileşiminin HL-60 hücre hattındaki Bcl-2 gen ifadesinde meydana gelen değişimin tüm gruplar için yaklaşık aynı oranda olduğu ve kontrol grubuna göre daha düşük seviyede kaldığı belirlendi ($p<0.0001$).



Şekil 4.29: CPT-Bort kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği, D; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

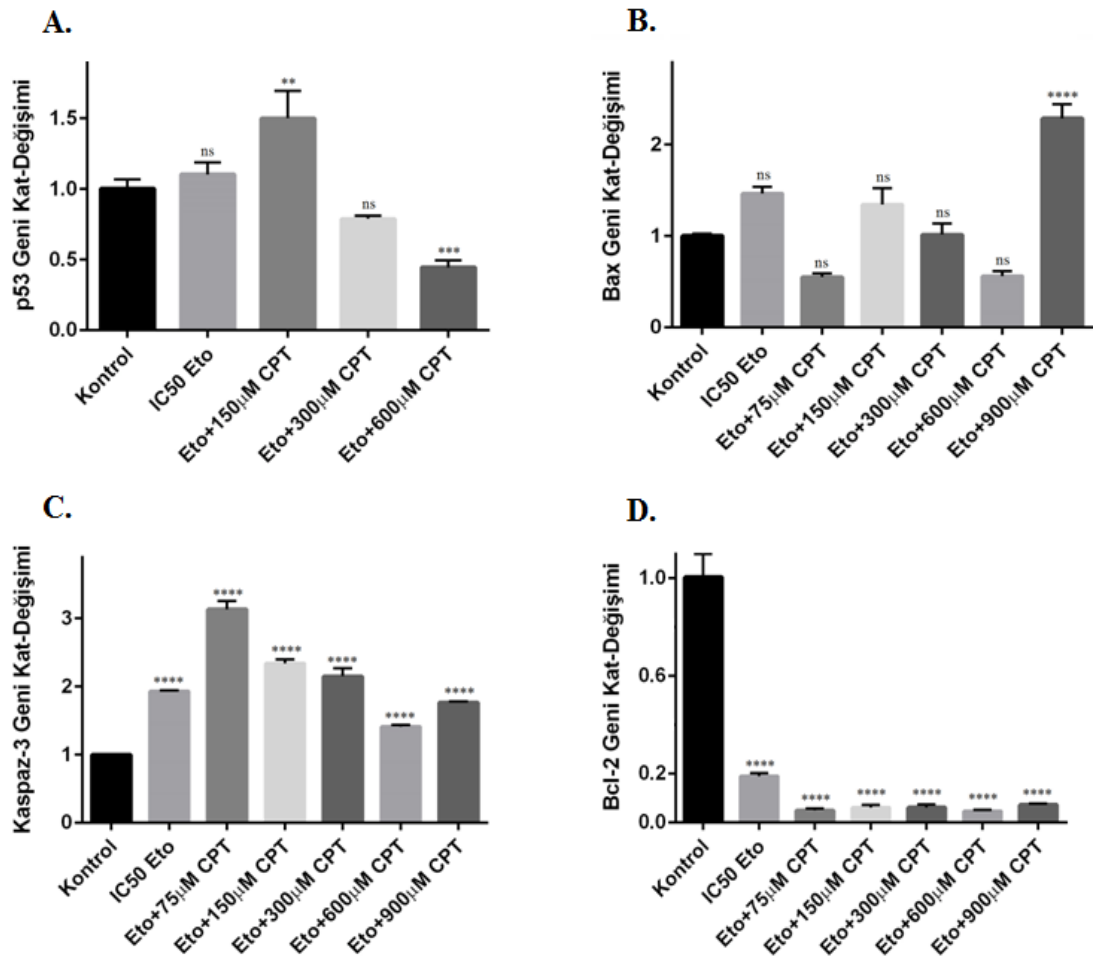
4.6.9 Etoposid-Camptothecin kombinasyonunun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

Eto-CPT kombinasyonunun K562 hücre hattında Rel-A gen ekspresyon çalışmaları sonucunda şekil 4.30A'da gösterilen tek başına 200 μ M Eto eklenen grup ile 200 μ M Eto +150 μ M CPT, 200 μ M Eto+300 μ M CPT ve 200 μ M Eto+900 μ M CPT eklenmesinin Rel-A gen ekspresyonunu artırdığı belirlendi. Şekil 4.30B'de Eto-CPT kombine etkileşiminin K562 hücre hattında NF- κ B1 gen ifadesini baskıladığı belirlendi ($p=0.0005$, $p=0.0311$, $p=0.0012$, $p=0.0002$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.30C'de tek başına 200 μ M Eto eklenen grup ile 200 μ M Eto+900 μ M CPT eklenen grupta meydana gelen artma anlamlı olarak bulundu (p değerleri sırası ile $p=0.0062$ ve $p=0.0003$ olarak bulundu). Diğer gruplardaki ATM gen ifadesindeki değişimin anlamlı olmadığı görüldü. Şekil 4.30D'de Eto-CPT kombine etkinin K562 hücre hattında ATR gen ifadesini tüm gruplar için arttırdığı fakat bazı gruplarda bu değişimin anlamlı olmadığı belirlendi ($p<0.0001$, $p=0.0004$, $p<0.0001$, 0.0045 ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı).



Şekil 4.30: Eto-CPT kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF- κ B1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

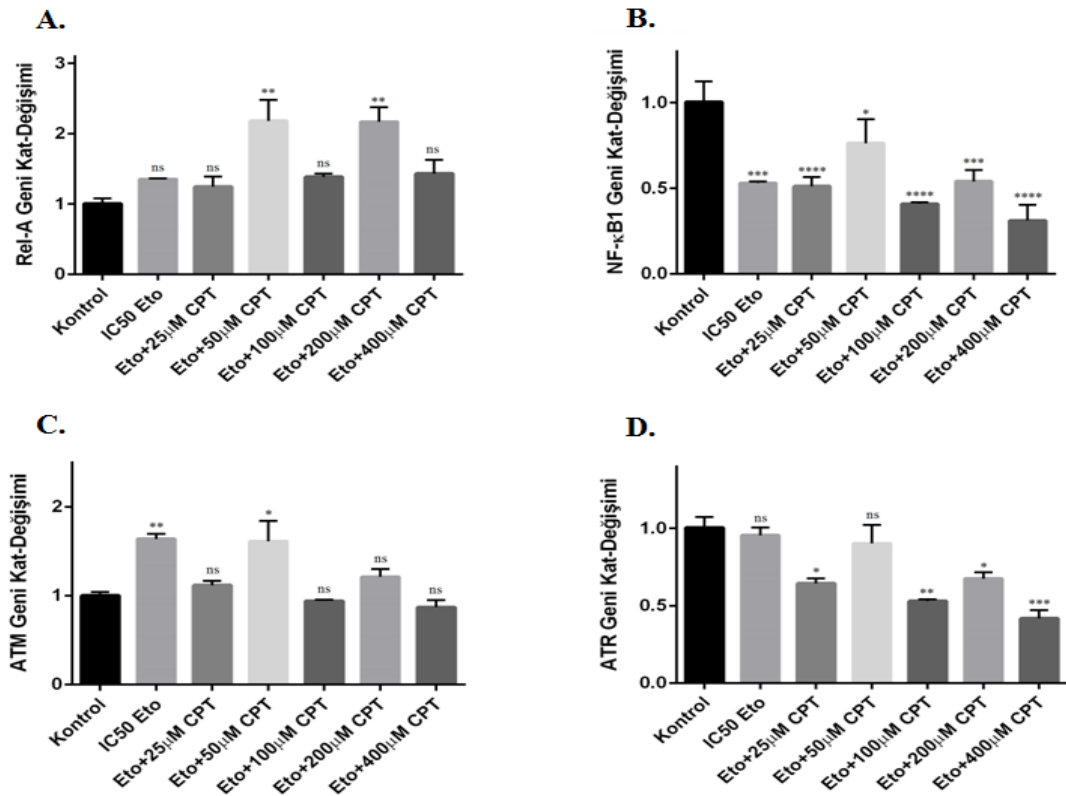
Şekil 4.31A'da Eto-CPT kombinasyonunun K562 hücre hattında p53 gen ifadesini 200µM Eto+150µM CPT ile oluşan grupta arttırdığı, 200 µM Eto+600µM CPT ile oluşan grupta ise azalmaya neden olduğu belirlendi ($p=0.001$, $p=0.0004$). Şekil 4.31B'de Eto-CPT kombinasyonunun K562 hücre hattında 900µM CPT eklenen grupta Bax gen ifadesini arttırdığı belirlendi ($p<0.0001$). Şekil 4.31C'de Eto-CPT kombine etkileşiminin K562 hücre hattında Kaspaz-3 gen ifadesini arttırdığı görüldü ($p<0.0001$). Öte yandan, Eto-CPT kombinasyonunun K562 hücre hattındaki Bcl-2 gen ekspresyonunun anlamlı bir şekilde kontrol grubuna göre daha düşük seviyede kaldığı şekil 4.31D'de gösterildi ($p<0.0001$).



Şekil 4.31: Eto-CPT kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği, D; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

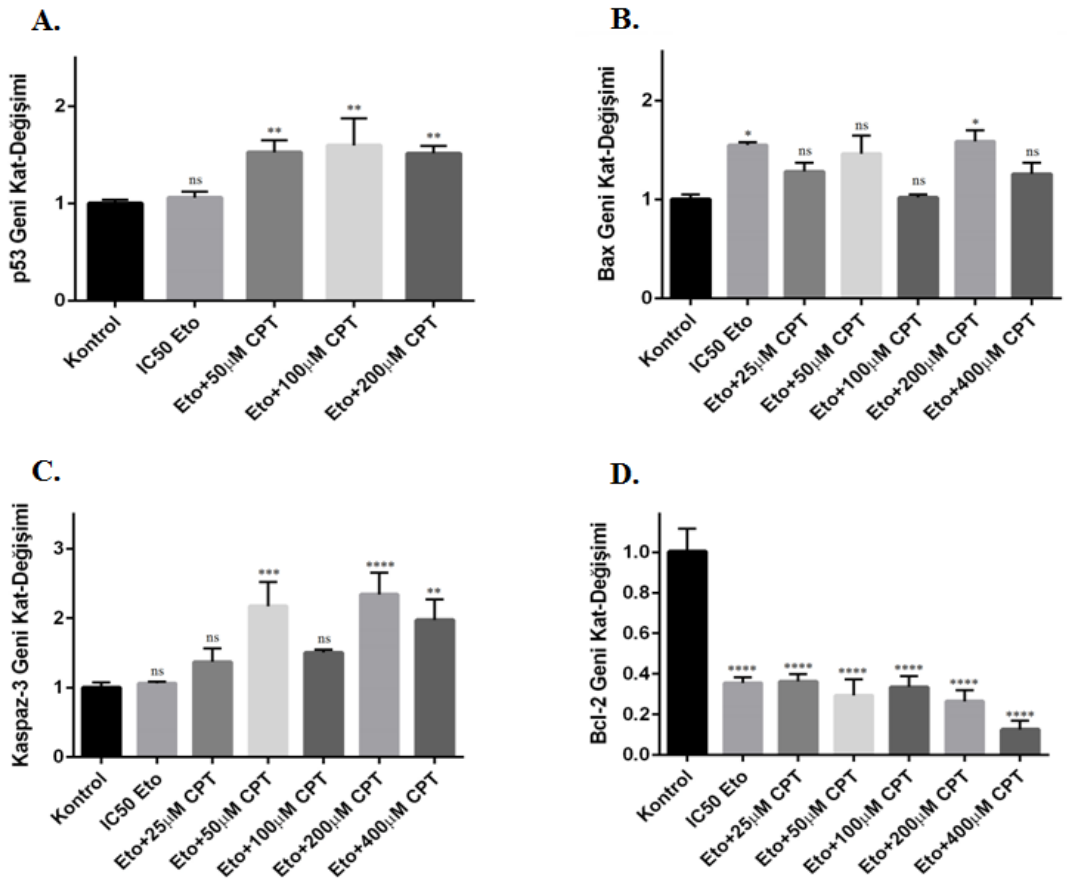
4.6.10 Etoposid-Camptothecin kombinasyonunun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

Eto-CPT kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattındaki Rel-A gen ekspresyonu çalışmaları sonucunda şekil 4.32A'da da gösterildiği gibi sadece 50 μ M Eto+50 μ M CPT ve 50 μ M Eto+200 μ M CPT eklenmesi ile oluşan kombinasyon gruplarında Rel-A gen ifadesinin arttığı görüldü ($p=0.0032$ ve $p=0.0035$). Şekil 4.32B'de Eto-CPT kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattındaki NF- κ B1 gen ifadesini baskıladığı belirlendi ($p=0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.0408$, $p<0.0001$, $p=0.0001$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.32C'de Eto-CPT kombinasyonunun ATM gen ifadesini sadece 50 μ M Eto uygulanan grup ile 50 μ M Eto+50 μ M CPT eklenerek uygulama yapılan gruplarda arttığı belirlendi ($p=0.0094$ ve $p=0.0134$). Şekil 4.32D'de Eto-CPT kombinasyonunun HL-60 hücre hattında ATR gen ekspresyonu sadece artan CPT konsantrasyonlarında baskıladığı belirlendi ($p=0.0147$, $p=0.0014$, $p=0.0278$ ve $p=0.0002$).



Şekil 4.32: Eto-CPT kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF- κ B1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

Şekil 4.33A'da Eto-CPT kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattında p53 gen ifadesini sadece kombine uygulama yapılan gruplarda arttırdığı belirlendi ($p=0.0079$, $p=0.0033$ ve $p=0.0090$). Şekil 4.33B'de tek başına 50 μM Eto uygulanan grup ile 50 μM Eto+200 μM CPT eklenen gruplarda Bax gen ifadesinin arttığı bulundu ($p=0.0124$, $p=0.015$). Şekil 4.33C'de gösterilen ve ilaç etkileşimi 50 μM Eto+50 μM CPT, +200 μM CPT ve +400 μM CPT eklenerek oluşturulan gruplarda anlamlı bir artış belirlendiği görüldü ($p=0.0003$, $p<0.0001$ ve $p=0.0016$). Şekil 4.33D'de Eto-CPT kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattında Bcl-2 gen ifadesini tüm gruplarda anlamlı bir şekilde baskıladığı görüldü ($p<0.0001$).

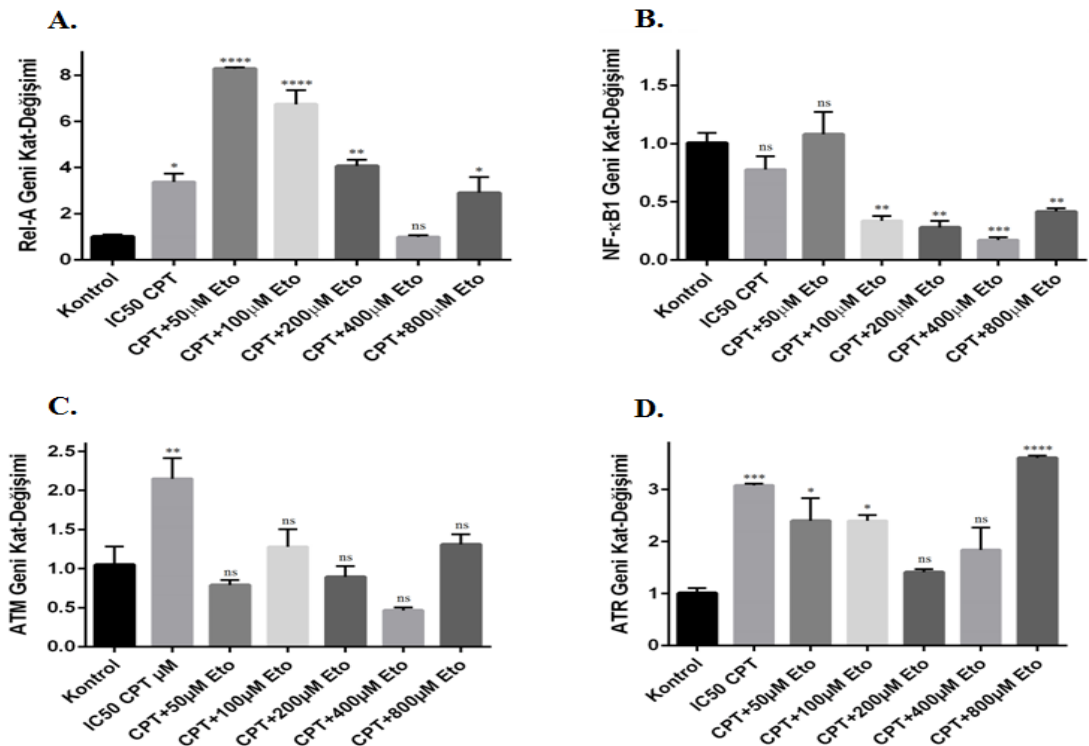


Şekil 4.33: Eto-CPT kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği, D; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

4.6.11 Camptothecin-Etoposid kombinasyonunun K562 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

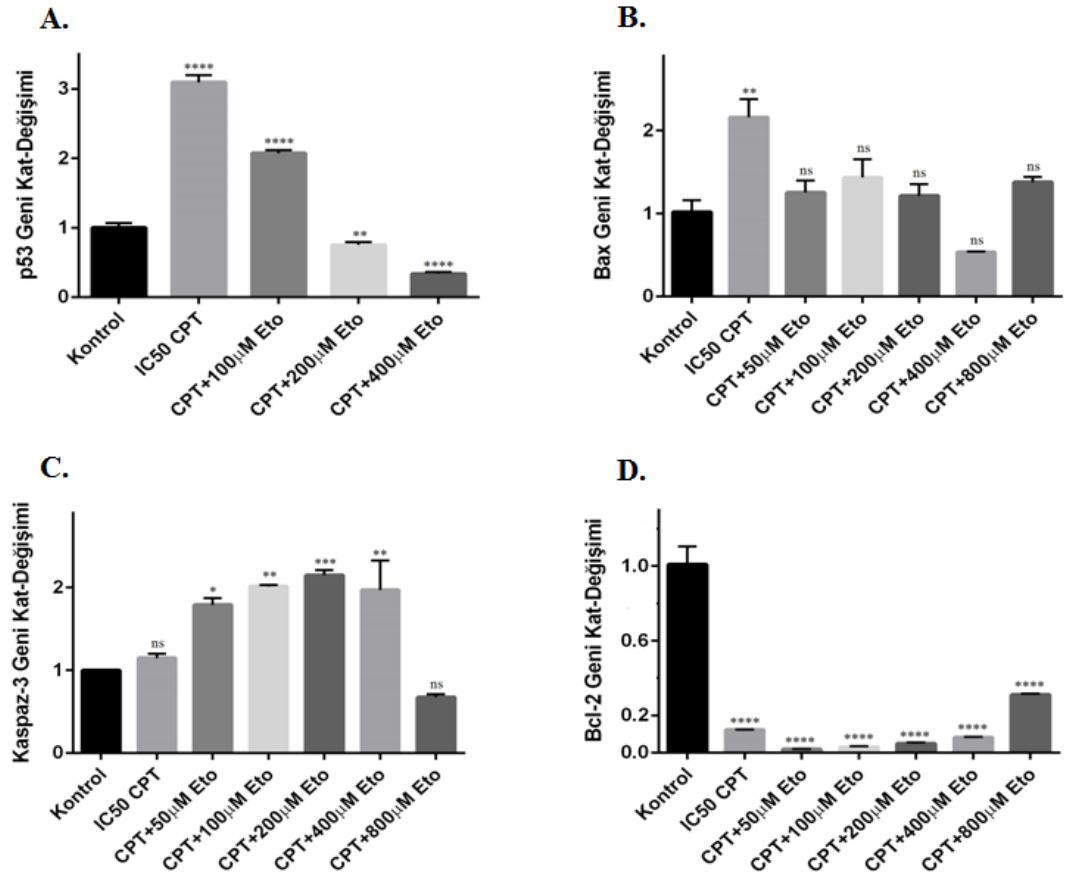
CPT-Eto kombinasyonunun K562 hücre hattında yapılan gen ekspresyonu çalışmalarında şekil 4.34'de Rel-A, NF- κ B1, ATM, ATR gen değişimleri, şekil 4.35'de p53, Bax, Kaspaz-3 ve Bcl-2 gen ifadeleri görülmektedir.

Şekil 4.34A'da CPT-Eto kombine etkileşiminin K562 hücre hattında Rel-A gen ifadesini artırdığı ve bu artışında anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p=0.01$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.001$ ve $p=0.047$). Şekil 4.34B'de CPT-Eto kombinasyonunda Eto konsantrasyonunun artması NF- κ B1 gen ekspresyonunu azalttığı görüldü ($p=0.003$, $p=0.0014$, $p=0.0004$ ve $p=0.0087$). Şekil 4.34C'de CPT-Eto uygulamasının K562 hücre hattında sadece IC₅₀ CPT eklenen grupta ATM gen ifadesinde artmaya neden olduğu fakat diğer gruplarda ise anlamlı değişim olmadığı görüldü. Şekil 4.34D'de gösterilen ve anlamlı olan grupların p değerleri sırası ile $p=0.0004$, $p=0.0141$, $p=0.0145$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı. Sonuç olarak; CPT-Eto kombinasyonunun K562 hücre hattındaki ATR gen ekspresyonunu artırdığı görüldü.



Şekil 4.34: CPT-Eto kombinasyonu K562 hücre hattındaki Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF- κ B1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği.

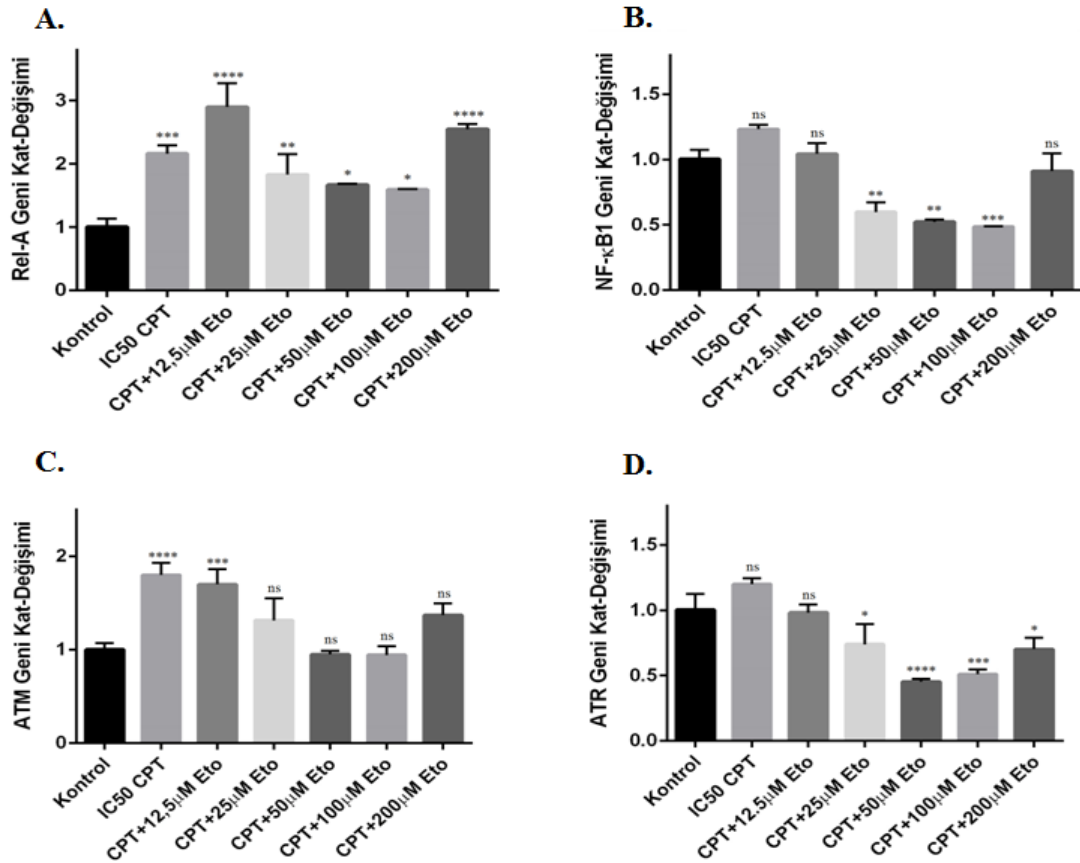
Şekil 4.35A incelendiğinde CPT-Eto kombine etkileşiminin K562 hücre hattında artan Eto değişimine bağlı olarak azaldığı görüldü ($p<0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.0049$ ve $p<0.0001$ olarak hesaplandı). Şekil 4.35B'de sadece IC₅₀ CPT ile oluşan grupta Bax gen ifadesinin arttığı fakat diğer gruplarda anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi ($p=0.0014$). Şekil 4.35C'de CPT-Eto kombine etkileşimin K562 hücre hattındaki Kaspaz-3 gen ifadesini anlamlı olan gruplarda arttırdığı belirlendi ($p=0.0195$, $p=0.0026$, $p=0.0008$ ve $p=0.0038$). Şekil 4.35D'de CPT-Eto uygulamasının K562 hücre hattındaki Bcl-2 gen ekspresyonunda azalma sergilediği gösterildi ($p<0.0001$).



Şekil 4.35: CPT-Eto kombinasyonu K562 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği, D; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

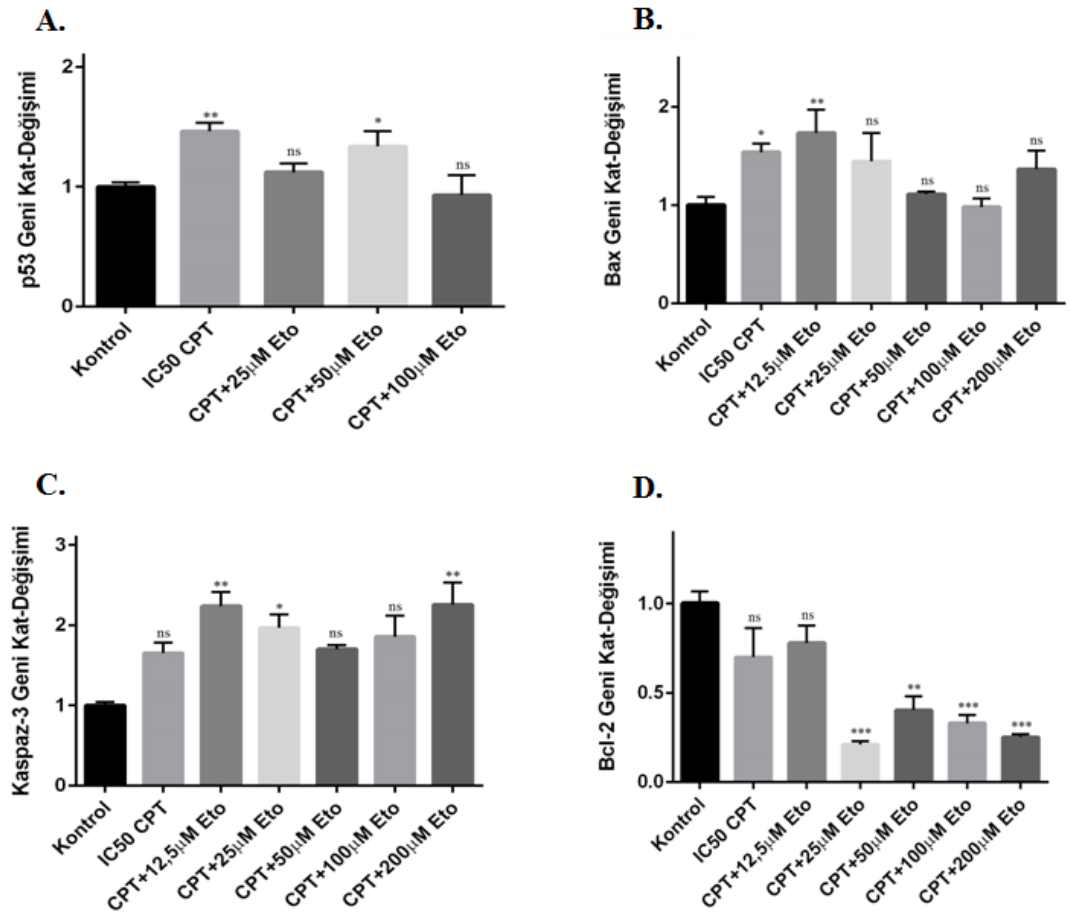
4.6.12 Camptothecin-Etoposid kombinasyonunun HL-60 hücre hatlarındaki gen ekspresyon çalışmaları

Şekil 4.36A'da CPT-Eto kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattında uygulanması sonucunda Rel-A gen ifadesini arttırdığı, bu artışın anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p=0.0001$, $p<0.0001$, $p=0.003$, $p=0.0178$, $p=0.0412$ ve $p<0.000$). Şekil 4.36B'de CPT-Eto kombinasyonunun NF- κ B1 gen ekspresyonunda anlamlı bir azalış sergilediği görüldü ($p=0.0058$, $p=0.0014$ ve $p=0.0007$). Şekil 4.36C'de CPT-Eto kombine etkileşiminin anlamlı olduğu gruplarda ATM gen ifadesini arttırdığı gösterildi ($p<0.0001$ ve $p=0.0003$ olarak hesaplandı). Şekil 4.36D'de CPT-Eto kombinasyonunun HL-60 hücre hattında Eto konsantrasyonunun artması ATR gen ifadesinde kontrol grubuna göre azalmaya neden olduğu görüldü ($p=0.0286$, $p<0.0001$, $p=0.0001$ ve $p=0.0107$).



Şekil 4.36: CPT-Eto kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki Rel-A, NF- κ B1, ATM ve ATR genlerinin kat-değişim grafikleri: A; Rel-A geni kat-değişimi, B; NF- κ B1 geni kat-değişim grafiği, C; ATM geni kat-değişim grafiği, D; ATR geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

Şekil 4.37A'da CPT-Eto kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattındaki p53 gen ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı olan gruplarda artma sergilediği bulundu ($p=0.005$). Şekil 4.37B'de CPT-Eto kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattındaki Bax gen ifadesini anlamlı olan gruplar için arttırdığı görüldü ($p=0.0202$ ve $p=0.0016$). Şekil 4.37C'de CPT-Eto kombinasyonunun HL-60 hücre hattında Kaspaz-3 gen ifadesinde anlamlı değişim sergileyen gruplarda arttırdığı belirlendi ($p=0.0034$, $p=0.0239$ ve $p=0.0030$). Şekil 4.37D'de CPT-Eto kombine etkileşiminin HL-60 hücre hattındaki Bcl-2 gen ifadesinde azalma sergilediği belirlendi ($p=0.0002$, $p=0.0025$, $p=0.0009$ ve $p=0.0003$ olarak hesaplandı).



Şekil 4.37: CPT-Eto kombinasyonu HL-60 hücre hattındaki p53, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin kat-değişim grafikleri: A; p53 geni kat-değişimi, B; Bax geni kat-değişim grafiği, C; Kaspaz-3 geni kat-değişim grafiği, D; Bcl-2 geni kat-değişim grafiği. ns: Kontrol göre anlamlılık yok; (****) Kontrol göre anlamlılık $p<0.0001$; (***) Kontrol göre anlamlılık $p<0.001$; (**) Kontrol göre anlamlılık $p<0.01$; (*) Kontrol göre anlamlılık $p<0.05$.

5. TARTIŞMA-SONUÇ

Yaptığımız bu tez çalışmasında ilk olarak klinikteki etkinliği proteozomu inhibe ederek NF- κ B sinyal yolağını bloke etmeye bağlı olan Bort'in, topoizomerez inhibitörleri ile birlikte kombine terapide kullanılabilirliğini hücre canlılığına bakarak değerlendirmeyi, DNA hasarına neden olup olmadığını, ATM-NEMO yolağını ile mi yoksa p53 aracılığıyla mı apoptozise neden olduğunu gen ifade düzeylerine bakarak belirlemek istedik. Klinikte sadece myeloma tedavisinde kullanılmak üzere onay alan Bort'in tüm bu etkilerini iki farklı hematolojik malignite örneğinde çalıştık.

Hücre canlılığı sonuçlarına baktığımızda ilk olarak HL-60 hücrelerinin K562 hücrelerine göre Bort'e ve diğer topoizomerez inhibitörlerine daha duyarlı olduğunu gördük. Her üç ilacında IC₅₀ dozları HL-60 hücrelerinde K562 hücre hatlarına göre daha düşük dozlarda bulunduğu için bu durum bize HL-60 hücrelerinin tekli kemoterapiye daha duyarlı olduğunu gösterdi. Ancak kombine terapiye geçtiğimizde K562 hücrelerinin HL-60 hücrelerine göre daha hassas olabileceğini gözlemledik. Kombine ilaç uygulamalarında sitotoksik etkinin K562 hücrelerinde artması bize bunu düşündürdü. Her iki hücre hattının farklı biyolojik kökene ve farklılaşma basamağına sahip olması bu farklılığın nedeni olarak yorumlandı.

Gen ifade düzeylerine baktığımızda ise tek başına Bort (IC₅₀) uygulamasının, HL-60 hücrelerinde NF- κ B1 genini baskımlarken, RelA ifadesini artırdığı, K562 hücrelerinde ise hem Rel-A hem de NF- κ B1 gen ifade düzeylerini artırdığı gözlemlendi. Bu sonuç Bort'in NF- κ B sinyal iletimini hücre tipine göre değişen farklı bir mekanizmayla etkilediğini gösterir. Ayrıca Bort'in her iki hücre hattında da NF- κ B sinyal yolağını tamamen baskılamak yerine NF- κ B sinyal yolağının pro-apoptotik mekanizmasını tetikleyebileceğini düşündürür. Çünkü yaptığımız deneylerde Bort'in doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı, sitotoksik etkiye neden olduğu ve artan sitotoksik etki ile hücreleri apoptoza götürdüğü hem hücre canlılığı hem de apoptotik genlerin ifadesindeki değişiklikle gözlemlendi. Yaptığımız gen ekspresyon çalışmalarında IC₅₀ Bort'in tek başına anti-apoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunu baskıladığı öte yandan pro-apoptotik Bax ve Kaspaz-3 gen ekspresyonunu her iki hücre hattında da arttırdığı belirlendi. Azalan Bcl-2 ile artan Bax ve Kaspaz-3 gen ekspresyonları hücrelerin apoptoza gittiğini ve Bort'in apoptozu indüklediğinin bir kanıtı olarak bulundu.

Ayrıca Bort'in tek başına (IC₅₀ dozunda) K562 ve HL-60 hücre hatlarında ATM ve ATR gen ifadesini arttırdığı da gözlemlendi. Bu sonuç literatüre önemli bir katkı sağlayacak olan Bort'in DNA hasarına neden olabileceği fikrini ileri sürdü. Buna ek olarak IC₅₀ Bort tek başına uygulandığında p53 gen ifadesinin her iki hücre hattında indüklediği görüldü. Bu sonuç Bort' in DNA hasarı oluşturduğu fikrini destekleyen bir kanıt olarak bulundu.

Bort'in proteozomları inhibe ederek NF-κB sinyal yolağını etkilediği bilinmektedir. Yaptığımız çalışma sonucunda Bort'in NF-κB alt birimlerini aktive ettiği görüldü. Bu durumun Bort'in ATM ve ATR gen ifadelenmesinin artması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çünkü NF-κB aktivitesinin gerçekleştiği atipik yolakta; NEMO, çekirdekte değişime uğrar ve ubikütinasyonu gerçekleştirir. Bu yol, ATM kinaza bağımlıdır. NEMO, ATM ile birlikte sitoplâzmaya geçer böylece IKK aktivasyonu sağlanır. IKK'lar tarafından IκB'ler fosforillenir ve NF-κB heterodimeri aktifleşir [86]. Yani, artan ATM gen ifadesinin NEMO aracılığıyla NF-κB aktivitesini arttırabileceği bilinmektedir. ATM NEMO fosforilasyonunu uyarır ve nihayetinde NF-κB sinyaline sebep olur. Bu yüzden ATM seviyesinin artması ya da azalmasına bağlı olarak ATM bağımlı NF-κB aktivasyonunu artabilir ya da azalabilir [176]. Çalışmamızda Bort'in Rel-A ve NF-κB1 gen ifadesini artırmasının sebebi ATM aracılıklı NEMO aktivitesi olduğu düşünülmektedir.

Diğer taraftan tümör baskılayıcı proteinlerin, NF-κB alt birimlerinin tümör ilerleme aktivitesine kısmen katkıda bulunmaktadır. Rel-A ve p52 gibi NF-κB alt birimleri, p53 ile doğrudan bağlantılıdır. Bu durumlarda NF-κB aktivitesi, pro-apoptotik olabilir, metastazı baskılayabilir ya da proliferasyonu inhibe edebilir [18]. Rel-A'nın pro-apoptotik genleri trans aktive ederek ve anti-apoptotik genleri baskılayarak hücre ölümüne neden olacağı rapor edilmiştir [18]. Ayrıca NF-κB'nin p52 alt biriminin DNA hasarından sonra pro-apoptotik etkide rol aldığı bildirilmiştir [17]. Tüm bu veriler ışığında artan p53 gen ifadesinin NF-κB alt birimlerinin gen ifade düzeylerini arttırmış olabileceği ve bu şekilde apoptozu başlatabilmek için NF-κB ile işbirliği yapabileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız tez çalışmasının ikinci büyük ayağı DNA'da tek zincir kırığına neden olan topoizomeraz I inhibitörü CPT ve DNA'da çift zincir kırığına neden olan topoizomeraz II inhibitörü Eto'nun NF-κB sinyal yolağı üzerine etkilerini incelemek oldu.

Topoizomeraz I inhibitörü olarak klinikte kullanılan CPT'nin NF- κ B sinyal yolağına etkisini araştırırken, öncelikle K562 ve HL-60 hücre hatlarında CPT'nin sitotoksitesine ve % canlılığına bakıldı. Yapılan canlılık testlerinde K562 hücre hattında 300 μ M CPT'nin %52.9 canlılık sergilediğı, HL-60 hücre hattında ise 100 μ M CPT'nin %53.0 canlılık gösterdiği bulundu. Bu değerler daha sonraki çalışmalarda CPT'nin IC₅₀ değerleri olarak kullanıldı. CPT'nin doz bağımlı olarak hücrelerde sitotoksik etki yaptığı bilinmektedir. Çalışmamızda yapılan canlılık test sonuçlarına göre CPT için doz miktarının artması sitotoksik etkiye neden olduğu ve hücre canlılığını azalttığı bulundu.

CPT'nin NF- κ B'yi aktive ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir. CPT'nin DNA hasarına katkıda bulunduğu ve NF- κ B'nin DNA bağlanması aktivitesini arttırdığı da rapor edilmiştir [142]. Çalışmamızda IC₅₀ CPT dozları uygulandığında K562 hücre hattı ile HL-60 hücre hattında Rel-A ve NF- κ B1 gen ekspresyonunu arttırdığı bulundu. NF- κ B'nin CPT ile aktivasyonu tüm hücre hatlarında geçicidir. Yapılan çalışmalarda NF- κ B aktivitesinin sürdürülebilmesi için ATM gereklidir. CPT'nin DNA'da hasar oluşturduğu bilinmektedir [150]. Yaptığımız çalışmada DNA hasarına bağılı olarak CPT'nin ATM ve ATR gen ifadesini K562 ve HL-60 hücre hatlarında arttırdığı gösterildi. Bu durum NF- κ B aktivitesinin her iki hücre hattında da devam edebileceğine işarettir. Nükleus içinde DNA hasarının CPT ile uyarılması I κ B α 'nın proteozom aracılığıyla degrade olmasını sağlar. Buna ek olarak CPT gibi DNA hasar ajanları ile tedaviden sonra kanser hücrelerinin NF- κ B bağımlı yaşamaya devam etmesi, tümüyle malignitenin birikmesine ve mutasyonların artmasına neden olmaktadır [177]. Ayrıca çalışmamızda CPT'nin her iki hücre hattında p53 gen ifadesini indüklediğı de belirlendi.

CPT'nin doz bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve hücre canlılığını etkilediğı yapılan canlılık deneylerinde gösterildi. CPT ile uyarılan NF- κ B aktivitesi anti-apoptotik özellik sergileyebilmektedir [177]. Fakat çalışmamızda gen ekspresyon düzeyinde CPT'nin K562 ve HL-60 hücre hatlarında, Bcl-2 gen ifadesini azalttığı, Bax ve Kaspaz-3 gen ifadesini de arttırarak apoptoza neden olduğu görüldü. Bu sonuç bize CPT ile uyarılan NF- κ B aktivitesinin pro-apoptotik özellik sergilediğini göstermektedir.

Yaptığımız tez çalışmasında ayrıca topoizomeraz II inhibitörü olarak klinikte kullanılan Eto'nun NF- κ B sinyal yolağı üzerine etkisine bakıldı. Bu amaçla K562 ve HL-60 hücre hatlarında canlılık testleri yapıldı. Yapılan canlılık testlerinde K562 hücre hattında 200 μ M Eto'nun %55.9 canlılık gösterdiği, HL-60 hücre hattında ise 50 μ M Eto'nun %49.2 canlılık sergilediği bulundu. IC₅₀ değerleri belirlemek için yapılan canlılık testlerinde Eto'nun doz bağımlı olarak K562 hücre hattı ile HL-60 hücre hattında canlılığı azalttığı ve sitotoksik olduğu görüldü.

Mevcut çalışmalarda Eto'nun NF- κ B'yi aktive ettiği gösterilmiştir [142], [178]. Bu tez çalışmasında IC₅₀ Eto dozu uygulandığı zaman K562 ve HL-60 hücre hatlarında Rel-A ve NF- κ B1 gen ifadelerini arttırdığı görüldü. Eto'nun topoizomeraz II'yi inhibe ederek DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına sebep olduğu bilinmektedir [152]. Yaptığımız çalışmada IC₅₀ Eto'nun DNA hasarı ile uyarılan ATM ve ATR gen ifadelerini her iki hücre hattında arttırdığı belirlendi. Myeloma hücre hatlarında yapılan çalışmalarda Eto'nun NF- κ B sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. p53 transkripsiyon faktörünün inhibisyonu NF- κ B aktivasyonunu ortadan kaldırmaktadır [179]. Bu tez çalışmasında tek başına Eto'nun K562 hücre hattı ile HL-60 hücre hattında p53 gen ekspresyonunu arttırdığı gösterildi. Bu durum Eto'nun p53 transkripsiyon faktörünün aktivitesine uyararak NF- κ B aktivitesine katkı sağladığını düşündürmektedir.

Buna ek olarak, tek başına IC₅₀ Eto uygulamasının gen düzeyinde apoptozu tetiklediği de gösterilmiştir. Bu durum IC₅₀ Eto'nun hem K562 hücre hattında hem de HL-60 hücre hattında anti-apoptotik Bcl-2 gen ifadesini azaltması, pro-apoptotik Bax ve Kaspaz-3 gen ifadelerini arttırması ile de kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalarda Eto'nun NF- κ B alt birimlerinden biri olan p65'i aktive ettiği gösterilmiştir. Buna ek olarak Eto tarafından aktive edilen apoptoz için p65 aktivitesinin rolü olduğu görülmektedir [179]. Yaptığımız çalışmada Eto'nun her iki hücre hattında p65 ifadesini arttırdığı gösterdik. Dolayısıyla Eto tarafından aktive edilen apoptozis de p65'in de rol alabileceği düşünülmektedir.

NF- κ B inhibitörlerinin tek başına kanser tedavisinde etkin olduğu fikri yaygın bir görüştür [3, 43]. Tek başına NF- κ B inhibisyonunun anti-apoptotik diğer faktörlerin devreye girebilme ihtimali nedeniyle, solid tümörlerde genellikle etkin sonuçlar veremeyeceği fakat NF- κ B inhibisyonunun sağ kalım için tek yol olduğu lösemi veya (Hodgkin Lenfoma gibi) lenfomalarda yarar sağlayabileceği savunulmuştur [43, 95].

NF- κ B'nin apoptozu inhibe edebileceğini gösteren çalışmalar, NF- κ B'nin kemoterapiye ve radyasyona karşı tümör direncine neden olup olmadığını değerlendirmeye de olanak sağlamıştır. Kemoterapinin türü, NF- κ B'nin pro- veya anti-apoptotik olup olmamasına göre belirlenmektedir. Örneğin, çoğu kemoterapötik ilaç DNA hasarının bazı formlarını indüklerken, aynı zamanda NF- κ B aktivasyonuna da neden olur. Bununla birlikte yapılan birçok çalışma NF- κ B aktivasyonunu inhibe etmenin hücreyi ölüme sürüklediğini de göstermiştir [95]. Sonuç olarak, NF- κ B sinyal yolağının bloke edilmesinin çoğu tümör hücresinin anti-tümör ajanların aktivasyonuna daha duyarlı hale gelmesine ve/veya hücre proliferasyonunun azalmasına neden olduğu düşüncesi kabul görmüştür [49]. Bu durum tedavide NF- κ B sinyal yolağına kombine ilaç uygulamalarının yapılabileceğini göstermektedir. Bu amaçla yaptığımız tez çalışmasında Bort, Eto ve CPT'nin kombine kullanılarak NF- κ B sinyal yolağına etkisini de araştırdık.

Bort için IC_{50} değeri belirlendikten sonra CPT ve Eto ile kombine etkinin incelemesi için K562, HL-60 hücre hatları kullanılarak canlılık testleri gerçekleştirildi. Bort'in CPT ve Eto ile kombinasyonlarının K562 ve HL-60 hücre hatlarındaki canlılığa etkileri incelendiği zaman, Bort'in IC_{50} dozu sabit kalarak CPT'nin ve Eto'nun miktarı arttığı zaman hem K562 hem de HL-60 hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı bulundu. Bu sonuçlar bize Bort-CPT ve Bort-Eto kombinasyonlarının daha etkin bir sitotoksiteye neden olduğunu gösterdi.

Bu tez çalışmasında, Bort-Eto kombinasyonunun K562 ve HL-60 hücre hatlarında Rel-A gen ifadesini arttırdığı görüldü. Bu çalışma literatürde mevcut olan ve Eto'nun NF- κ B alt birimlerinden biri olan p65'i aktive ettiği gösterilen çalışmalarla tutarlılık göstermektedir [179]. Ayrıca literatürde Eto'nun NF- κ B'yi aktive ettiğini gösteren çalışmalarla da uyumludur [142], [178]. Buna ek olarak bizim çalışmalarımızda HL-60 hücre hattında artan Eto dozuna bağlı olarak NF- κ B1 gen ifadesinin arttığı gözlemlendi. Fakat K562 hücre hattında NF- κ B1 gen ifadesinin Bort-Eto kombinasyonu ile baskılandığı belirlendi.

Hücreler devamlı olarak iç ve dış ajanlara maruz kalarak genom hasar tehdidiyle karşılaşmaktadır. DNA çift zincir kırıkları DNA hasarının en toksik formları arasındadır. Bu durum ATM kinaz tarafından tanınır ve yanıt oluşturulur. ATM'nin ana rolü DNA çift zincir kırıklarının onarımı için gerekli olan transkripsiyonu başlatmak ve NF- κ B, p53 gibi transkripsiyonel faktörleri aktive etmektir. Eto'nun

DNA'da hasar oluşturduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Biz de yaptığımız çalışmada, Bort-Eto kombine uygulamasında doz artması ile K562 ve HL-60 hücre hattında ATM gen ekspresyonunu arttığını, ancak bu durumun HL-60 hücre hattında anlamlı değişikliğe neden olurken K562 hücre hattında anlamlı değişikliğe neden olmadığını belirledik. Öte yandan, replikasyon stresine yanıtta ATR aktive edildikçe NF-κB'nin DNA hasarını düzenleyebildiği gösterilmiştir [180]. Yaptığımız alışmada, Bort-Eto kombinasyonunun K562 hücre hattında ATR gen ifadesini azalttığı, HL-60 hücre hattında ise ATR gen ifadesini arttırdığını belirledik.

DNA hasarındaki NF-κB aktivasyonunda ATM'nin NEMO ile direk ilişkiye girdiği bilinmektedir. NEMO smolasyonu ve fosforilasyonu DNA hasarını takip eden NF-κB aktivasyonu için gereklidir. DNA hasarını takip eden NF-κB aktivasyonunun apoptotik hücre ölümünden hasarlı hücreleri koruduğu düşünülmektedir [181]. Buna ek olarak ATM fosforilasyonunun Bort ile tedavi edilen bazı kanser türlerinde arttığı gözlenmiştir. Bort tedavisi ATM sinyal yolağı ile ilişkilidir. Fakat Bort tedavisine yanıtta ATR aktivasyonu gözlenmemiştir. Bort ile uyarılan DNA hasarına yanıtta ATR'nin rolü net olarak tanımlanmamıştır [182]. Bu durum HL-60 hücre hattında artan DNA hasarına yanıtta ATM ve ATR gen ifadesinin artması NF-κB sinyal yolağını aktifleştirdiği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. Ayrıca Bort-Eto kombine etkileşimi K562 ve HL-60 hücre hatlarında p53 gen ifadesini de arttırdığı görüldü. Bu sonuç, artan DNA hasarı ile p53'n hücre proliferasyonunun durdurması ve hücrelerde meydana gelen DNA hasarının NF-κB bağımlı düzenlemesine olanak tanıdığı düşünülmektedir.

Bort-Eto kombinasyon çalışmalarının hücre canlılığını doz bağımlı olarak etkilediği ve artan Eto dozuna bağlı olarak sitotoksik etki oluşturduğu belirlendi. Bu kombinasyon uygulamasında sitotoksik etkiye bağlı olarak hem K562 hem de HL-60 hücre hatlarında hücrelerin apoptozu uyardığı görüldü. Bort-Eto kombinasyon çalışmalarının Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 gen ifadeleri incelediği zaman, her iki hücre hattında Bcl-2 gen ifadesinin azaldığı, Bax gen ifadesinin arttığı görüldü.

Kaspaz-3 gen ifadesinin HL-60 hücre hattında arttığı fakat K562 hücre hattında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Anti-apoptotik Bcl-2 proteini, pro-apoptotik proteinleri nötralize eder ve kanser hücrelerinin apoptoza geçme yeteneğini belirlemede çok önemlidir. Bax normalde sitoplâzmada bulunurken apoptozu ilerletmek için mitokondriye transloke olur. Fakat Bax aktivitesi Bcl-2 gibi anti-

apoptotik proteinler tarafından giderilmektedir [183]. Gen ekspresyon deneyleri sonucunda elde edilen bilgiler ve literatürde mevcut olan çalışmalar ışığında, Bort-Eto kombine etkileşiminin yapılan canlılık testlerine ek olarak gen ifade düzeyinde de Bcl-2 genindeki azalma, Bax ve Kaspaz-3 gen ifadesindeki artış hücrelerin apoptoza sürüklendiğinin ve Bort-Eto kombinasyonunun apoptozu uyardığı belirlendi. Bu durum kanser tedavide Bort ve Eto ilaçlarının kombine uygulamasının sinerjetik olabileceği ve bu etkinin apoptozu ile sonuçlanabileceğinin bir kanıtı olarak gösterilebilir. Fakat bu sinerjetik etkinin isobologram analizi yapılarak da doğrulanması gerekmektedir.

Bort-CPT kombinasyon çalışmasının K562 hücre hattı ile HL-60 hücre hattında NF- κ B sinyal yolağına etkisine bakıldığında, her iki hücre hattında Rel-A gen ifadesini arttırdığı belirlendi. CPT'nin NF- κ B'yi aktive ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu ilaçların DNA hasarına katkıda bulunduğu ve NF- κ B'nin DNA bağlanması aktivitesini arttırdığı da rapor edilmiştir [142]. Bizim sonuçlarımız CPT ile NF- κ B aktivitesinin uyarıldığını doğrulamaktadır. Öte yandan, Bort-CPT kombine etkileşiminin hem K562 hem de HL-60 hücre hattında NF- κ B1 gen ifadesini baskıladığı belirlendi. Bu veri, Bort'ın proteozomları inhibe ederek NF- κ B'nin alt birimi olan NF- κ B1'in aktivitesini baskıladığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda Bort'un topoizomerez I inhibitörü CPT ile kombine kullanımının NF- κ B inhibisyonu ile sonuçlandığı ve NF- κ B inhibitörlerinin bölgesel seçimi için kullanıldığı gösterilmiştir [178]. Elde edilen sonuçlarda Bort-CPT kombinasyonunun Rel-A gen ifadesini artmasına neden olduğu diğer taraftan NF- κ B1 gen ifadesinin bastırılarak azalmasına neden olmuştur. Bu durum çalışmamızda Bort-CPT kombinasyonunun NF- κ B alt birimlerini seçici olarak aktive ettiği ya da baskılandığı görüşünü güçlendirmektedir.

CPT ile topoizomerez I etkileşiminin NF- κ B aktivasyonu, translokasyonu ve ATM dahil birçok sinyal olayını başlattığı bilinir [184]. Yaptığımız çalışmada Bort-CPT kombinasyonunun K562 ve HL-60 hücre hatlarında hem ATM hem de ATR gen ekspresyonunu arttırdığı belirlendi. Bu sonuç ile Bort-CPT kombinasyonunun NF- κ B gibi ATM/ATR sinyal yolağını da aktive ettiğini gösterdi. Bu sonuç aynı zamanda Bort-CPT kombinasyonunun doz bağımlı olarak DNA'da hasar oluşturduğunu, DNA hasarına yanıtta ATM ekspresyonu ile NF- κ B'nin aktive olduğunu göstermiştir [185].

Sonuç olarak Bort-CPT kombinasyonunun ATM/ATR ekspresyonunu uyararak NF- κ B'in alt birimi olan Rel-A'nın gen ifadesinin artmasına neden olabileceği düşüncesini de ortaya çıkarmıştır.

Yaptığımız çalışmada Bort-CPT kombinasyonunun p53 gen ifadesini hem K562 hem de HL-60 hücre hattında arttırdığı belirlendi. Bu durum artan DNA hasarına ya da artan ATM aktivitesine bağlı olarak p53'ün uyarılabileceğini göstermektedir. Literatürde ATM aktivitesinin; DNA tamiri, hücre kontrol noktalarının aktivitesi, apoptozun başlaması, NF- κ B ve p53 aktivitesi ile sonuçlandığını gösteren çalışmalar mevcuttur [185].

Bort-CPT kombinasyon çalışmasının K562 hücre hattı ile HL-60 hücre hattındaki canlılık deneylerinde sitotoksik etkide artış ve hücre canlılığını doz bağımlı olarak azalttığı görüldü. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen canlılık verilerinin Bort-CPT kombine etkileşiminin hücrelerde apoptozu arttırdığı görüşü güçlendi. Canlılık deneylerine ilaveten gerçekleştirilen gen ekspresyon çalışmalarında, Bort-CPT kombinasyonunun HL-60 ve K562 hücre hattında anti-apoptotik gen olan Bcl-2 ifadesini baskıladığı bulundu. Öte yandan Bort-CPT kombinasyonunun her iki hücre hattında pro-apoptotik aktivite gösteren Bax ve Kaspaz-3 gen ifadelerini indüklediği bulundu. Anti-apoptotik Bcl-2 proteini, pro-apoptotik proteinleri nötralize eder ve kanser hücrelerinin apoptoza geçme yeteneğini belirlemede çok önemlidir [186]. Özellikle Bcl-2 gen ifadesindeki azalmanın, Bax ve Kaspaz-3 gen ifadelerindeki de artmanın, literatürdeki mevcut çalışmalarda olduğu gibi apoptozu tetiklediği bulundu. Sonuç olarak Bort-CPT kombinasyonunun hem K562 hem de HL-60 hücre hattında apoptoza neden olduğu gen ekspresyon çalışmaları ile de doğrulandı.

CPT için IC₅₀ dozları belirlendikten sonra Bort ve Eto ile kombine etkilerinin K562 ve HL-60 hücre hatlarındaki hücre canlılığına etkisine bakıldı. Yapılan kombinasyon çalışmalarında CPT'nin IC₅₀ dozu sabit tutularak Bort ve Eto artan dozlarda uygulama yapıldı. Elde edilen % canlılık verilerine göre CPT'nin Bort ve Eto ile kombinasyon uygulamalarının hem K562 hem de HL-60 hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı ve sitotoksik etki gösterdiği bulundu.

CPT-Bort kombinasyonu ile yapılan deney sonuçları Bort-CPT kombinasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlarla büyük benzerlik göstermektedir.

CPT-Bort kombinasyon verilerinde Bort-CPT çalışmalarından farklı olarak sadece NF- κ B1 ve ATR gen ifadesinde farklılıklar bulunmuştur. Bor-CPT kombinasyon çalışmalarında NF- κ B1 gen ifade düzeyi hem K562 hem de HL-60 hücrelerinde azalırken, CPT-Bor kombinasyonunda NF- κ B1 ifade düzeyi HL-60 hücrelerinde anlamlı şekilde azalırken K562 hücrelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Benzer bir durum ATR gen ifade düzeyi içinde gözlenmiştir. CPT-Bort kombinasyonunun ATR gen ifadesini sadece K562 hücre hattında arttırdığı, HL-60 hücre hattında ise bu kombine etkinin ATR gen ifadesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar CPT-Bort kombine etkisinin NF- κ B sinyal yolağının aktivitesini engellemede Bort'in daha yüksek dozlarda uygulanarak gerçekleştirilebileceği düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

CPT-Eto kombine etkileşiminin gen ekspresyon düzeyinde etkileri incelediği zaman; bu etkileşimin K562 hücre hattında ve HL-60 hücre hattında Rel-A gen ifadesini arttırdığı görüldü. Öte yandan CPT-Eto kombinasyonunun her iki hücre hattında NF- κ B1 gen ifadesini baskıladığı belirlendi. CPT ve Eto'nun NF- κ B'yi aktive ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu ilaçların DNA hasarına katkıda bulunduğu ve NF- κ B'nin DNA bağlanması aktivitesini arttırdığı da rapor edilmiştir [142]. Yapılan çalışmalarda Eto'nun NF- κ B alt birimlerinden biri olan p65'i aktive ettiği gösterilmiştir. Buna ek olarak Eto tarafından aktive edilen apoptoz için p65 aktivitesinin rolü olduğu görülmektedir [179]. Yaptığımız çalışmada Rel-A genindeki artışın Eto'nun doz bağımlı etkisinden kaynakladığı düşünülmektedir. Aksine CPT-Eto uygulamasının NF- κ B1 gen ifadesi üzerinde aynı etkiyi göstermediği bu kombine etkinin NF- κ B1 gen ifadesini baskıladığı görüldü.

Bu sonuçlar CPT-Eto kombine etkileşimi ile tetiklendiği düşünülen apoptoz da, Rel-A'nın rol oynadığı düşüncesini destekledi. Dolayısıyla bu kombine etkileşimde artan Rel-A gen ifadesinin apoptozunun aktivasyonuna sebep olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan canlılık testlerinde CPT-Eto kombine etkinin K562 ve HL-60 hücre hatlarında doz bağımlı olarak sitotoksik etkiye neden olduğu ve her iki hücre hattında canlılığını azalttığı belirlendi. Bu sonuç ile beraber apoptoz için yapılan gen ekspresyon çalışmaları da, CPT-Eto kombinasyonunun her iki hücre hattında apoptozu tetiklediği görüşünü destekledi. CPT-Eto kombine etkileşiminin anti-apoptotik Bcl-2 gen ifadesini hem K562 hem de HL-60 hücre hattında baskıladığı bulundu.

Diğer taraftan pro-apoptotik Bax ve Kaspaz-3 gen ifadesine bakıldığında ise; CPT-Eto kombinasyonunun HL-60 hücre hattında Bax ve Kaspaz-3 gen ifadesini artmasına neden oldu. Fakat K562 hücre hattında Bax geni için anlamlı bir değişikliğin olmadığı, Kaspaz-3 geni için ise doz bağımlı olarak gen ifadesinin artmasına neden olduğu görüldü. Hücre canlılığı ve apoptotik gen ekspresyonu çalışmaları sonucunda CPT-Eto kombine etkileşiminin her iki hücre hattında da apoptozu indüklediği ve hücre ölümüne neden olduğu belirlendi.

CPT ve Eto ökaryotik topoizomera I ve II enzimlerini inhibe ederek DNA'da tek ve çift zincir kırıkları oluşmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla DNA'da hasar oluşturduğu bilinmektedir [177, 179]. Bundan dolayı CPT-Eto kombine etkileşiminin DNA hasarı ile uyarılan ATM, ATR ve p53 gen ifadesini etkileyebileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Bu amaçla yapılan gen ekspresyon çalışmalarında CPT-Eto kombine etkileşiminin K562 hücre hattında ATM gen ifadesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı fakat HL-60 hücre hattında ATM gen ifadesinin artmasına neden olduğu belirlendi. Öte yandan CPT-Eto kombine etkileşiminin her iki hücre hattında ATR gen ifadesinin artmasını sağladığı görüldü. Hücrel strese cevapta p53 tümör baskılayıcı proteini ana bileşendir. DNA hasarı, hipoksi, ısı stresi gibi durumlarda hücrel stresin kaynağına ve miktarına bağlı olarak hücre DNA'sının tamiri, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozu düzenlemektedir [187]. Dolayısıyla CPT-Eto kombinasyonunun DNA hasarına bağlı olarak hücrel stresin artmasına ve bundan dolayı p53 gen ifadesini etkilediği bulundu. Ekspresyon çalışmalarında CPT-Eto etkileşiminin K562 hücre hattında p53 gen ifadesinin doz bağımlı olarak azalmasına, HL-60 hücre hattında ise p53 gen ifadesinin artmasına neden olduğu görüldü.

CPT-Eto kombine etkileşimi sonucunda elde edilen tüm veriler, bu etkileşimin kanser hücre hatlarında apoptozu neden olduğu anlaşılmaktadır. K562 hücre hattında bu etkileşim ile uyarılan apoptoziste NF- κ B'nin alt birimi olan Rel-A'nın görev aldığı ve apoptozun Rel-A aracılığıyla meydana geldiği düşünülmektedir. Öte yandan HL-60 hücre hattına bakıldığında zaman, CPT-Eto etkileşimi ile uyarılan apoptoziste hem NF- κ B'nin hem de p53'ün rol oynayabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla CPT-Eto etkileşiminin doz bağımlı olarak kanser terapide NF- κ B bağımlı apoptoziste önemli rol oynadığı ve bu etkileşimin sinerjetik olabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır.

Eto-CPT kombinasyonuna bakıldığında ise CPT-Eto kombinasyon çalışmalarından elde edilen verilere özellikle RelA, Bcl-2, Bax, Kaspaz3 ve p53 düzeyleri açısından büyük bir benzerliği bulundu. ATM, ATR ve NF- κ B1 genlerinin ifade düzeylerin hücre tipine göre değişen bir farklılığı saptandı. Bu farklılıkların ilaçların dozuna bağlı olarak değişti gözlemlendi. Sonuç olarak Eto-CPT kombinasyonun CPT-Eto kombinasyonu gibi her iki hücre hattında da apoptozise neden olduğu bu apoptozis mekanizmasının ise hem NF- κ B hem de DNA hasarı ile uyarılan diğer mekanizmalar (örneğin; p53 gibi) ile etkili olduğu görüldü.

Eto'nun IC₅₀ dozu belirlendikten sonra Bort ve CPT ile kombine etkisinin K562, HL-60 hücre hattındaki canlılık çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla Eto'nun IC₅₀ dozu sabit tutuldu, Bort ve CPT artan miktarlarda ilave edildi. Elde edilen % canlılık verileri ışığında Eto'nun Bort ve CPT ile yapılan kombinasyon uygulamalarında K562 ve HL-60 hücre hatlarında hücre canlılığını azalttığı ve sitotoksik etki sergilediği bulundu.

Eto-Bort kombinasyon çalışmalarının ardından yapılan gen ekspresyonu çalışmalarında, bu kombine etkinin K562 ve HL-60 hücre hattında Rel-A gen ifadesini arttırdığı bulundu. Öte yandan Eto-Bort kombine etkileşiminin hem K562 hem de HL-60 hücre hattında NF- κ B1 gen ifadesini azalttığı fakat K562 hücre hattında meydana gelen değişimin anlamlı olmadığı belirlendi. NF- κ B alt birimlerinden biri olan Rel-A hem bir aktivatör hem de bir represör olabilir. Rel-A özellikle bir apoptoz düzenleyici olarak işlev görür. Deneysel çalışmalarda kemoterapik ilaçlar ile uyarılan Rel-A'nın anti-apoptotik etkiye sahip olabileceği de gösterilmiştir [188]. Eto-Bort kombine etkileşiminin ardından her iki hücre hattındaki Rel-A gen ifadesinin artması apoptozu düzenlemede rol aldığı düşünülmektedir. Ayrıca Eto'nun NF- κ B'yi aktive ettiği literatürde mevcuttur [142].

Kanser hücreleri Bort'un pro-apoptotik etkisine normal hücrelerden daha fazla duyarlıdır [189]. Yapılan bazı çalışmalarda Bort uygulamasının hücre hatlarında pro-apoptozun başlatılması için doz ve zaman bağımlı uygulamaların önemini vurgulanmaktadır. Seçici NF- κ B inhibisyonunun tek başına apoptozu başlatmak için yeterli olmadığı da gösterilmiştir [190]. Yaptığımız çalışmada Bort doz bağımlı olarak NF- κ B sinyal yolağını inhibe etmede önemli olabileceği düşünülmektedir.

Kanser hücrelerinde NF- κ B aktivitesinin engellenmesi anti-apoptotik genlerin regülasyonunu düzenleyerek bir sağkalım mekanizması sağlar [191]. Rel-A'nın esas fonksiyonu ve NF- κ B aktivasyonunun önemli bir çıktısı programlanmış hücre ölümüne direnci teşvik etmek kabiliyetidir ve bunu da başlıca; bcl-x gibi anti-apoptotik proteinlerin düzenlenmesi aracılığıyla gerçekleştirilir. Ayrıca NF- κ B aktivitesi apoptoza karşı direncin teşvik edilmesi ile kanser hücrelerinin direncini kolaylaştırabilir [192]. Buna ek olarak Rel-A DNA hasarını da iletilebilir [193]. NF- κ B alt birimlerinin farklı sergilenme yetenekleri bazı hedef genlerin ekspresyonuna sebep olmak için bastırılabilir. Yani; Rel-A pro-apoptotik genlerin indüklenmesi ve anti-apoptotik genlerin baskılanması aracılığıyla hücre ölümünü iletilebilir [18]. Ayrıca NF- κ B'nin p52 alt birimi DNA hasarından sonra pro-apoptotik etkilere de katkıda bulunmaktadır [17]. Yaptığımız çalışmada Rel-A gen ekspresyonunun uyarılmasının anti-apoptotik genleri baskıladığı, pro-apoptotik genlerin ifadenmesini sağlayarak hücreleri apoptoza sürüklediği düşünülmektedir. Bu amaçla Eto-Bort kombine etkileşiminin K562 hücre hattı ile HL-60 hücre hattındaki anti ve pro-apoptotik gen ifadelerine bakıldığında, bu kombine etkileşimin her iki hücre hattında Bcl-2 gen ifadesini baskıladığı, Kaspaz-3 gen ifadesini arttırdığı belirlendi. Eto-Bort kombine etkileşiminin K562 hücre hattında Bax gen ifadesinin azalmasına neden olduğu öte yandan; Eto-Bort kombinasyonunun HL-60 hücre hattında Bax gen ifadesinin artmasına neden olduğu görüldü. Eto'ya maruz kalan hücrelerde NF- κ B aktivitesi güçlü bir şekilde uyarılır bu etki Bort ilavesi ile azalır. NF- κ B inhibisyonuna ek olarak etoposid ve bortezomib kullanımı güçlü bir şekilde Bcl-2 ekspresyonunu baskılar. Daha önce yapılan çalışmalarda Eto uygulamasının myeloma hücre hatlarında Bcl-2 gen ekspresyonunu güçlü bir şekilde uyardığı bildirilmiştir. Bort uygulaması ise Bcl-2 gen ekspresyonunu az miktarda inhibe ettiği görülmüştür. Fakat bu iki ilacın birlikte Bcl-2 gen ekspresyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir.

Apoptozun baskılanmasında Bcl-2 ve NF- κ B sinyal yollarının bağlantısı vardır. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonuna I κ B'nin kaybı ve NF- κ B aktivasyonu aracılık eder. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu proteozomal inhibisyon tarafından kaldırılabilen bir etkidir [19].

Elde edilen bu veriler ışığında K562 hücre hattında tetiklenen apoptozisin Rel-A, Kaspaz-3 ve DNA'da meydana gelen hasar sonucunda uyarılan diğer mekanizmaların etkili olabileceği, HL-60 hücre hattında ise uyarılan apoptozis mekanizmasının NF- κ B ve DNA hasarı ile meydana gelebileceği düşünülmektedir.

Eto'in topoizomerez II'yi inhibe ederek, Bort'in ise proteozomları inhibe ederek DNA'da hasar oluşturduğu mevcut çalışmalarda gösterilmiştir [142, 182]. Bu nedenle Eto-Bort kombine etkileşiminin DNA hasarı ile uyarılan ATM, ATR ve p53 gen ifadelerinde meydana gelen değişimler incelendi. Yapılan gen ekspresyon çalışmaları sonucunda, Eto-Bort kombinasyonunun HL-60 hücre hattında ATM ve ATR gen ifadelerini arttırdığı belirlendi. Bu sonuç Eto-Bort kombine etkileşimin de DNA'da hasar oluşturduğu anlamına gelmektedir. Öte yandan Eto-Bort kombinasyonunun K562 hücre hattında ATM ve ATR gen ifadesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. Yapılan bir çalışmada ATM fosforilasyonunun Bort tedavisi ile bazı kanser türlerinde arttığı gözlenmiştir. Bort tedavisi ATM sinyal yolağı ile ilişkilidir. Fakat Bort tedavisine yanıtta ATR aktivasyonu gözlenmemiştir. Bort ile uyarılan DNA hasarına yanıtta ATR'nin rolü net olarak tanımlanmamıştır [182]. Yapılan bir diğer çalışmada ise Bort tedavisinin myeloma hücre hatlarında ATM'yi parçaladığı gösterilmektedir. Bort ilavesi Kaspaz-3 aktivitesini de uyarmaktadır. Bu durum Bort tarafından tetiklenen ATM'nin kırılması Kaspaz-3 aktivitesine bağımlı olduğu gösterilmiştir [194]. Dolayısıyla yaptığımız çalışmada K562 hücre hattındaki ATM ve ATR gen ifadesindeki bu durumun doz bağımlı olarak Bort'den kaynakladığı düşünülmektedir. Eto-Bort kombine etkileşimi K562 hücre hattı ile HL-60 hücre hattında p53 gen ifadesinin artmasına neden olmuştur. Bu sonuç doz bağımlı olarak arttığı düşünülen DNA hasarı sonucunda hücrelerin bölünmeyi durdurarak DNA onarım mekanizmasının devreye girmesine ya da bu yol ile apoptozu tetiklemesine neden olmuş olabilir.

SONUÇ

Bu tez çalışmasında, proteozom inhibitörü bortezomib, ökaryotik topoizomerez I ve II inhibitörü camptothecin ve etoposid'in NF- κ B sinyal yolağına etkisi K562 hücre hattı ile HL-60 hücre hatlarında qRT-PCR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen veriler ışığında NF- κ B sinyal yolağının kanserdeki rolü araştırılmıştır.

Sonuç olarak;

1. Hücre canlılığı sonuçları, HL-60 hücrelerinin K562 hücrelerine göre Bort'e ve diğer topoizomerez inhibitörlerine daha duyarlı olduğunu gösterdi.
2. Bort'in doza bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı, sitotoksik etkiye neden olduğu ve artan sitotoksik etki ile hücreleri apoptoza götürdüğü hem hücre canlılığı hem de apoptotik genlerin ifadesindeki değişikle gözlemlendi.
3. Bort'in tek başına (IC₅₀ dozunda) K562 ve HL-60 hücre hatlarında ATM, ATR ve p53 gen ifadelerinde artışa neden olması, DNA hasarına neden olabileceğini gösterdi.
4. Bort'in ATM aracılı NEMO aktivitesi ile Rel-A ve NF- κ B1 gen ifadesinde artışa neden olacağı, bu durumun da Bort'in NF- κ B sinyal yolağını tamamen baskılamak yerine sinyal yolağının pro-apoptotik fonksiyonunu açığa çıkardığı düşünülmektedir.
5. CPT'in ve Eto'in tek başlarına hem K562 hem de HL-60 hücrelerinde DNA da hasar yaptığı ATM, ATR ve p53 gen ifade düzeyleriyle, bu hasarın apoptozise neden olduğu hücre canlılığı ve Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin ifadesindeki değişikliklerle doğrulandı.
6. Hem CPT'in hem de Eto'in her iki hücre hattında da Rel-A ve NF- κ B1 gen ifade düzeylerini artırarak NF- κ B sinyal iletimine neden olduğu gözlemlendi.
7. Bort ve Eto kombinasyonlarının K562 ve HL-60 hücre hatlarında sitotoksik etkiye neden olduğu ve hücreleri apoptoza götürdüğü hem hücre canlılığı hem de apoptotik genlerin ifadesindeki değişikle gözlemlendi. Buna ek olarak Bort-Eto kombinasyonunun her iki hücrede de Rel-A ve p53 gen ifadesini arttırdığı ancak NF- κ B1, ATM ve ATR gen ifade düzeylerinin hücreye göre ve doza göre değiştiği saptandı. Bu sonuçlar Bort ve Eto'in birlikte kullanıldığı kombine terapide p53 bağımlı apoptozis mekanizmasının gerçekleştiğini, hücreye göre değişen ATM-ATR aracılığıyla Rel-A üzerinden NF- κ B sinyal iletiminin olduğunu ve NF- κ B'nin pro-apoptotik fonksiyonun gerçekleştiğini gösterdi.

İlginç olarak; ATM aktivitesinin tek başına NF- κ B aktivitesini uyardığı düşünülmektedir. Fakat ATM aktivitesinin olmadığı durumlarda NF- κ B aktivasyonu için ATR aktivitesinin gerekli olabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır.

8. Bort ve CPT kombinasyonlarının K562 ve HL-60 hücre hatlarında sitotoksik etkiye neden olduğu ve hücreleri apoptoza götürdüğü hem hücre canlılığı hem de apoptotik genlerin ifadesindeki değişikle gözlemlendi. Buna ek olarak; Bort ve CPT kombinasyonlarının DNA hasarına bağlı olarak her iki hücre hattında ATM, ATR ve p53 gen ifade düzeylerinin artmasına neden olduğu gözlemlendi. İlginç olarak; Bort ve CPT kombinasyonlarının Rel-A gen ifadesini arttırdığı fakat NF- κ B1 gen ifadesinin baskılanmasına neden olduğu görüldü. Bu durum NF- κ B'in p65-p50 dimerlerinden ziyade Rel-A aktivasyonu aracılığıyla pro-apoptotik özellik sergilediği gözlemlendi.

9. Eto ve CPT kombinasyonlarının K562 ve HL-60 hücre hatlarında sitotoksik etkiye neden olduğu ve hücreleri apoptoza götürdüğü hem hücre canlılığı hem de apoptotik genlerin ifadesindeki değişimlerle gözlemlendi. Buna ek olarak; Eto ve CPT kombinasyonlarının her iki hücre hattında Rel-A aktivasyonunu uyardığı gözlemlendi. Diğer taraftan, Eto ve CPT kombinasyonlarının her iki hücre hattında NF- κ B1 gen ifadesini doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü. Ayrıca DNA'da hasar oluşturduğu bilinen Eto ve CPT'nin kombinasyon çalışmalarında ATM ve ATR aktivasyonunu doz bağımlı olarak etkilediği belirlendi. Diğer çalışmalardan farklı olarak Eto ve CPT kombinasyonlarının p53 gen ifadesinin K562 hücre hattında azalmasına, HL-60 hücre hattında artmasına neden olduğu gözlemlendi. Bu sonuç, p53 aracılı apoptozis yolağının hücre tipine göre farklı özellikler sergilediği düşüncesini ortaya çıkarmıştır.

10. Bu tez çalışmasında Bort, CPT ve Eto'nun DNA hasarına neden olduğu ve bu hasarın hücrede ATM, ATR gen ifadesini etkilediği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlarda NF- κ B alt birimlerinin aktivite göstermelerinin ATM/NEMO aktivitesine bağlı olabileceği düşüncesini güçlendirmektedir. Bu nedenle daha sonra yapılacak çalışmalarda ATM ifadenin yanı sıra NEMO'nun durumunu da incelemek önem arz etmektedir.

11. Yaptığımız çalışmada elde edilen veriler, tek başına ve kombine ilaç uygulamalarının NF- κ B alt birimlerini aktive veya inhibe ettiği bulunmuştur. Bu nedenle kanser terapide doğrudan NF- κ B sinyal yolağının hedef alan terapilerden çok NF- κ B alt birimlerini hedef alan çalışmaların yapılması elzemdir.

KAYNAKÇA

1. Hanahan, D. ve R.A. Weinberg, 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144, 5, 646-674.
2. Lin, Y., L. Bai, W. Chen, ve S. Xu, 2010, The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy, *Expert opinion on therapeutic targets*, 14, 1, 45-55.
3. Sethi, G., B. Sung, ve B.B. Aggarwal, 2008, Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside, *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 233, 1, 21-31.
4. Panwalkar, A., S. Verstovsek, ve F. Giles, 2004, Nuclear factor-kappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies, *Cancer*, 100, 8, 1578-1589.
5. Savitsky, K., A. Bar-Shira, S. Gilad, G. Rotman, Y. Ziv, L. Vanagaite, D.A. Tagle, S. Smith, T. Uziel, S. Sfez, M. Ashkenazi, I. Pecker, M. Frydman, R. Harnik, S.R. Patanjali, A. Simmons, G.A. Clines, A. Sartiel, R.A. Gatti, L. Chessa, O. Sanal, M.F. Lavin, N.G. Jaspers, A.M. Taylor, C.F. Arlett, T. Miki, S.M. Weissman, M. Lovett, F.S. Collins, ve Y. Shiloh, 1995, A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase, *Science* (New York, N.Y.), 268, 5218, 1749-1753.
6. Mauro, C., F. Zazzeroni, S. Papa, C. Bubici, ve G. Franzoso, 2009, The NF-kappaB transcription factor pathway as a therapeutic target in cancer: methods for detection of NF-kappaB activity, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 512, 169-207.
7. Fan, Y., R. Mao, ve J. Yang, 2013, NF-kappaB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer, *Protein & cell*, 4, 3, 176-185.
8. Trojandt, S., D. Knies, S. Pektor, S. Ritz, V. Mailander, S. Grabbe, A.B. Reske-Kunz, ve M. Bros, 2013, The chemotherapeutic agent topotecan differentially modulates the phenotype and function of dendritic cells, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 62, 8, 1315-1326.
9. Horie, R., 2013, Molecularly-targeted Strategy and NF-kappaB in lymphoid malignancies, *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH*, 53, 3, 185-195.
10. Van Waes, C., 2007, Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13, 4, 1076-1082.
11. Tabruyn, S.P. ve A.W. Griffioen, 2008, NF-kappa B: a new player in angiostatic therapy, *Angiogenesis*, 11, 1, 101-106.
12. Karin, M., 2006, Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression, *Nature*, 441, 7092, 431-436.
13. Fuchs, O., 2010, Transcription factor NF-kappaB inhibitors as single therapeutic agents or in combination with classical chemotherapeutic agents for the treatment of hematologic malignancies, *Current molecular pharmacology*, 3, 3, 98-122.

14. Hoesel, B. ve J.A. Schmid, 2013, The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer, *Molecular cancer*, 12, 86.
15. Fuchs, O., 2013, Targeting of NF-kappaB signaling pathway, other signaling pathways and epigenetics in therapy of multiple myeloma, *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*, 13, 1, 16-34.
16. Yang, X., H. Jin, K. Liu, Q. Gu, ve X. Xu, 2011, A novel peptide derived from human pancreatitis-associated protein inhibits inflammation in vivo and in vitro and blocks NF-kappa B signaling pathway, *PloS one*, 6, 12, e29155.
17. Ho, J.Q., M. Asagiri, A. Hoffmann, ve G. Ghosh, 2011, NF-kappaB potentiates caspase independent hydrogen peroxide induced cell death, *PloS one*, 6, 2, e16815.
18. Perkins, N.D. ve T.D. Gilmore, 2006, Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB, *Cell death and differentiation*, 13, 5, 759-772.
19. von Metzler, I., U. Heider, M. Mieth, B. Lamottke, M. Kaiser, C. Jakob, ve O. Sezer, 2009, Synergistic interaction of proteasome and topoisomerase II inhibition in multiple myeloma, 315, 14, 2471-2478.
20. Wang, J.C., 2002, Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3, 6, 430-440.
21. Nitiss, J.L. ve J.C. Wang, 1996, Mechanisms of cell killing by drugs that trap covalent complexes between DNA topoisomerases and DNA, *Molecular pharmacology*, 50, 5, 1095-1102.
22. Hande, K.R., 2008, Topoisomerase II inhibitors, 3, 1, 13-26.
23. Warren, J.L., A. Mariotto, D. Melbert, D. Schrag, P. Doria-Rose, D. Penson, ve K.R. Yabroff, 2013, Sensitivity of Medicare Claims to Identify Cancer Recurrence in Elderly Colorectal and Breast Cancer Patients, *Medical care*,
24. Roukos, D.H., 2010, Beyond HER2 and trastuzumab: heterogeneity, systems biology, and cancer origin research may guide the future for personalized treatment of very early but aggressive breast cancer, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28, 17, e279-280; author reply e282-273.
25. Hudson, M.M., K.K. Ness, V.G. Nolan, G.T. Armstrong, D.M. Green, E.B. Morris, S.L. Spunt, M.L. Metzger, K.R. Krull, J.L. Klosky, D.K. Srivastava, ve L.L. Robison, 2011, Prospective medical assessment of adults surviving childhood cancer: study design, cohort characteristics, and feasibility of the St. Jude Lifetime Cohort study, *Pediatric blood & cancer*, 56, 5, 825-836.
26. Frohling, S. ve H. Dohner, 2008, Chromosomal abnormalities in cancer, *The New England journal of medicine*, 359, 7, 722-734.
27. Kocabıyık, V.B., *All Ve Kml' Li Hastalarda Bcr Ve Abl Genlerindeki Mutasyonların İncelenmesi*, *İn Tıbbi Genetik Anabilim Dah.* 2011, Selçuk Üniversitesi: Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
28. Bignell, G.R., C.D. Greenman, H. Davies, A.P. Butler, S. Edkins, J.M. Andrews, G. Buck, L. Chen, D. Beare, C. Latimer, S. Widaa, J. Hinton, C. Fahey, ve M.R. Stratton, 2010, Signatures of mutation and selection in the cancer genome, *Nature*, 463, 7283, 893-898.

29. Bell, D., D. Roberts, M. Kies, P. Rao, R.S. Weber, ve A.K. El-Naggar, 2010, Cell type-dependent biomarker expression in adenoid cystic carcinoma: biologic and therapeutic implications, *Cancer*, 116, 24, 5749-5756.
30. Ding, N., U. Yamashita, H. Matsuoka, T. Sugiura, J. Tsukada, J. Noguchi, ve Y. Yoshida, 2011, Apoptosis induction through proteasome inhibitory activity of cucurbitacin D in human T-cell leukemia, *Cancer*, 117, 12, 2735-2746.
31. Pleasance, E.D., R.K. Cheetham, P.J. Stephens, D.J. McBride, S.J. Humphray, C.D. Greenman, I. Varela, M.L. Lin, G.R. Odonez, G.R. Bignell, K. Ye, J. Alipaz, M.J. Bauer, D. Beare, A. Butler, R.J. Carter, L. Chen, A.J. Cox, S. Edkins, P.I. Kokko-Gonzales, N.A. Gormley, R.J. Grocock, C.D. Haudenschild, M.M. Hims, T. James, M. Jia, Z. Kingsbury, C. Leroy, J. Marshall, A. Menzies, L.J. Mudie, Z. Ning, T. Royce, O.B. Schulz-Trieglaff, A. Spiridou, L.A. Stebbings, L. Szajkowski, J. Teague, D. Williamson, L. Chin, M.T. Ross, P.J. Campbell, D.R. Bentley, P.A. Futreal, ve M.R. Stratton, 2010, A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome, *Nature*, 463, 7278, 191-196.
32. Verhaak, R.G., K.A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M.D. Wilkerson, C.R. Miller, L. Ding, T. Golub, J.P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B.A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H.S. Feiler, J.G. Hodgson, C.D. James, J.N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P.T. Spellman, R.K. Wilson, T.P. Speed, J.W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C.M. Perou, ve D.N. Hayes, 2010, Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1, *Cancer cell*, 17, 1, 98-110.
33. Aggarwal, B.B., A.B. Kunnumakkara, K.B. Harikumar, S.R. Gupta, S.T. Tharakan, C. Koca, S. Dey, ve B. Sung, 2009, Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171, 59-76.
34. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, ve M. Karin, 2010, Immunity, inflammation, and cancer, *Cell*, 140, 6, 883-899.
35. Aggarwal, B.B. ve P. Gehlot, 2009, Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients?, *Current opinion in pharmacology*, 9, 4, 351-369.
36. Mantovani, A., F. Marchesi, C. Portal, P. Allavena, ve A. Sica, 2008, Linking inflammation reactions to cancer: novel targets for therapeutic strategies, *Advances in experimental medicine and biology*, 610, 112-127.
37. Dutta, J., Y. Fan, N. Gupta, G. Fan, ve C. Gelinas, 2006, Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB, *Oncogene*, 25, 51, 6800-6816.
38. Ledford, H., 2010, Big science: The cancer genome challenge, *Nature*, 464, 7291, 972-974.
39. Sen, R. ve D. Baltimore, 1986, Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism, *Cell*, 47, 6, 921-928.

40. Luqman, S. ve J.M. Pezzuto, 2010, NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention, *Phytotherapy research : PTR*, 24, 7, 949-963.
41. Baud, V. ve M. Karin, 2009, Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls, *Nature reviews. Drug discovery*, 8, 1, 33-40.
42. Karin, M., Y. Cao, F.R. Greten, ve Z.W. Li, 2002, NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit, *Nature reviews. Cancer*, 2, 4, 301-310.
43. Aggarwal, B.B., Y. Takada, S. Shishodia, A.M. Gutierrez, O.V. Oommen, H. Ichikawa, Y. Baba, ve A. Kumar, 2004, Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine, *Indian journal of experimental biology*, 42, 4, 341-353.
44. Calzado, M.A., S. Bacher, ve M.L. Schmitz, 2007, NF-kappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer, *Current medicinal chemistry*, 14, 3, 367-376.
45. Huxford, T., A. Hoffmann, ve G. Ghosh, 2011, Understanding the logic of IkappaB:NF-kappaB regulation in structural terms, *Current topics in microbiology and immunology*, 349, 1-24.
46. Prasad, S., J. Ravindran, ve B.B. Aggarwal, 2010, NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship, *Molecular and cellular biochemistry*, 336, 1-2, 25-37.
47. Perkins, N.D., 2006, Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway, *Oncogene*, 25, 51, 6717-6730.
48. Vallabhapurapu, S. ve M. Karin, 2009, Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system, *Annual review of immunology*, 27, 693-733.
49. Aggarwal, B.B. ve B. Sung, 2011, NF-kappaB in cancer: a matter of life and death, *Cancer discovery*, 1, 6, 469-471.
50. Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A.M. Manning, J.S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio, ve Y. Ben-Neriah, 1998, Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase, *Nature*, 396, 6711, 590-594.
51. Rogers, S., R. Wells, ve M. Rechsteiner, 1986, Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science (New York, N.Y.)*, 234, 4774, 364-368.
52. Ernst, M.K., L.L. Dunn, ve N.R. Rice, 1995, The PEST-like sequence of I kappa B alpha is responsible for inhibition of DNA binding but not for cytoplasmic retention of c-Rel or RelA homodimers, *Molecular and cellular biology*, 15, 2, 872-882.
53. Whiteside, S.T. ve A. Israel, 1997, I kappa B proteins: structure, function and regulation, *Seminars in cancer biology*, 8, 2, 75-82.
54. Nolan, G.P., T. Fujita, K. Bhatia, C. Huppi, H.C. Liou, M.L. Scott, ve D. Baltimore, 1993, The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I kappa B-like

molecule that preferentially interacts with NF-kappa B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner, *Molecular and cellular biology*, 13, 6, 3557-3566.

55. Thompson, C.B., 1995, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science (New York, N.Y.)*, 267, 5203, 1456-1462.
56. Kunsch, C., S.M. Ruben, ve C.A. Rosen, 1992, Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation, *Molecular and cellular biology*, 12, 10, 4412-4421.
57. Arenzana-Seisdedos, F., P. Turpin, M. Rodriguez, D. Thomas, R.T. Hay, J.L. Virelizier, ve C. Dargemont, 1997, Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm, *Journal of cell science*, 110 (Pt 3), 369-378.
58. Gerondakis, S., R. Grumont, R. Gugasyan, L. Wong, I. Isomura, W. Ho, ve A. Banerjee, 2006, Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models, *Oncogene*, 25, 51, 6781-6799.
59. Hoffmann, A., A. Levchenko, M.L. Scott, ve D. Baltimore, 2002, The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation, *Science (New York, N.Y.)*, 298, 5596, 1241-1245.
60. Basak, S., H. Kim, J.D. Kearns, V. Tergaonkar, E. O'Dea, S.L. Werner, C.A. Benedict, C.F. Ware, G. Ghosh, I.M. Verma, ve A. Hoffmann, 2007, A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module, *Cell*, 128, 2, 369-381.
61. Palombella, V.J., O.J. Rando, A.L. Goldberg, ve T. Maniatis, 1994, The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B, *Cell*, 78, 5, 773-785.
62. Hacker, H. ve M. Karin, 2006, Regulation and function of IKK and IKK-related kinases, *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2006, 357, re13.
63. Naumann, M., A. Nieters, E.N. Hatada, ve C. Scheidereit, 1993, NF-kappa B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF-kappa B/rel-factors, *Oncogene*, 8, 8, 2275-2281.
64. Savinova, O.V., A. Hoffmann, ve G. Ghosh, 2009, The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes, *Molecular cell*, 34, 5, 591-602.
65. Ghosh, S., M.J. May, ve E.B. Kopp, 1998, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses, *Annual review of immunology*, 16, 225-260.
66. Hatada, E.N., A. Nieters, F.G. Wulczyn, M. Naumann, R. Meyer, G. Nucifora, T.W. McKeithan, ve C. Scheidereit, 1992, The ankyrin repeat domains of the NF-kappa B precursor p105 and the protooncogene bcl-3 act as specific inhibitors of NF-kappa B DNA binding, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6, 2489-2493.

67. Cogswell, P.C., D.C. Guttridge, W.K. Funkhouser, ve A.S. Baldwin, Jr., 2000, Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3, *Oncogene*, 19, 9, 1123-1131.
68. Michel, F., M. Soler-Lopez, C. Petosa, P. Cramer, U. Siebenlist, ve C.W. Muller, 2001, Crystal structure of the ankyrin repeat domain of Bcl-3: a unique member of the IkappaB protein family, *The EMBO journal*, 20, 22, 6180-6190.
69. Franzoso, G., V. Bours, V. Azarenko, S. Park, M. Tomita-Yamaguchi, T. Kanno, K. Brown, ve U. Siebenlist, 1993, The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF-kappa B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select kappa B sites, *The EMBO journal*, 12, 10, 3893-3901.
70. Hayden, M.S. ve S. Ghosh, 2008, Shared principles in NF-kappaB signaling, *Cell*, 132, 3, 344-362.
71. Lenardo, M. ve U. Siebenlist, 1994, Bcl-3-mediated nuclear regulation of the NF-kappa B trans-activating factor, *Immunology today*, 15, 4, 145-147.
72. Carmody, R.J., Q. Ruan, S. Palmer, B. Hilliard, ve Y.H. Chen, 2007, Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade, *Science (New York, N.Y.)*, 317, 5838, 675-678.
73. Wan, F. ve M.J. Lenardo, 2009, Specification of DNA binding activity of NF-kappaB proteins, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1, 4, a000067.
74. Palmer, S. ve Y.H. Chen, 2008, Bcl-3, a multifaceted modulator of NF-kappaB-mediated gene transcription, *Immunologic research*, 42, 1-3, 210-218.
75. Motoyama, M., S. Yamazaki, A. Eto-Kimura, K. Takeshige, ve T. Muta, 2005, Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein, *The Journal of biological chemistry*, 280, 9, 7444-7451.
76. Kuwata, H., M. Matsumoto, K. Atarashi, H. Morishita, T. Hirotani, R. Koga, ve K. Takeda, 2006, IkappaBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation, *Immunity*, 24, 1, 41-51.
77. Fiorini, E., I. Schmitz, W.E. Marissen, S.L. Osborn, M. Touma, T. Sasada, P.A. Reche, E.V. Tibaldi, R.E. Hussey, A.M. Kruisbeek, E.L. Reinherz, ve L.K. Clayton, 2002, Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor, *Molecular cell*, 9, 3, 637-648.
78. DiDonato, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi, ve M. Karin, 1997, A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB, *Nature*, 388, 6642, 548-554.
79. Mercurio, F., H. Zhu, B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennett, J. Li, D.B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, ve A. Rao, 1997, IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation, *Science (New York, N.Y.)*, 278, 5339, 860-866.

80. Bargou, R.C., F. Emmerich, D. Krappmann, K. Bommert, M.Y. Mapara, W. Arnold, H.D. Royer, E. Grinstein, A. Greiner, C. Scheidereit, ve B. Dorken, 1997, Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells, *The Journal of clinical investigation*, 100, 12, 2961-2969.
81. Karin, M. ve Y. Ben-Neriah, 2000, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity, *Annual review of immunology*, 18, 621-663.
82. Luo, J.L., H. Kamata, ve M. Karin, 2005, IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy, *The Journal of clinical investigation*, 115, 10, 2625-2632.
83. Li, Z.W., W. Chu, Y. Hu, M. Delhase, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, ve M. Karin, 1999, The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis, *The Journal of experimental medicine*, 189, 11, 1839-1845.
84. Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F.R. Greten, G. Krahm, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S.C. Sun, ve M. Karin, 2001, Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway, *Science (New York, N.Y.)*, 293, 5534, 1495-1499.
85. Bonizzi, G. ve M. Karin, 2004, The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity, *Trends in immunology*, 25, 6, 280-288.
86. Perkins, N.D., 2007, Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, 1, 49-62.
87. McElhinny, J.A., S.A. Trushin, G.D. Bren, N. Chester, ve C.V. Paya, 1996, Casein kinase II phosphorylates I kappa B alpha at S-283, S-289, S-293, and T-291 and is required for its degradation, *Molecular and cellular biology*, 16, 3, 899-906.
88. Gilmore, T.D., 2006, Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives, *Oncogene*, 25, 51, 6680-6684.
89. Matsuda, A., Y. Suzuki, G. Honda, S. Muramatsu, O. Matsuzaki, Y. Nagano, T. Doi, K. Shimotohno, T. Harada, E. Nishida, H. Hayashi, ve S. Sugano, 2003, Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways, *Oncogene*, 22, 21, 3307-3318.
90. Hayden, M.S. ve S. Ghosh, 2004, Signaling to NF-kappaB, *Genes & development*, 18, 18, 2195-2224.
91. Oeckinghaus, A. ve S. Ghosh, 2009, The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1, 4, a000034.
92. Mattson, M.P. ve M.K. Meffert, 2006, Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease, *Cell death and differentiation*, 13, 5, 852-860.
93. Bond, M., A.J. Chase, A.H. Baker, ve A.C. Newby, 2001, Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9

production by vascular smooth muscle cells, *Cardiovascular research*, 50, 3, 556-565.

94. Guttridge, D.C., C. Albanese, J.Y. Reuther, R.G. Pestell, ve A.S. Baldwin, Jr., 1999, NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1, *Molecular and cellular biology*, 19, 8, 5785-5799.
95. Baldwin, A.S., 2001, Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB, *The Journal of clinical investigation*, 107, 3, 241-246.
96. Ribatti, D., 2005, The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review, *British journal of haematology*, 128, 3, 303-309.
97. Werther, K., I.J. Christensen, N. Brunner, ve H.J. Nielsen, 2000, Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma. The Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group, *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 26, 7, 657-662.
98. Schulz, W., *Molecular Biology of Human Cancers*. 1 ed. An Advanced Student's Textbook, ed. S.S.B.M. B.V. Vol. 978-1-4020-3186-1. 2007, Springer Netherlands: Springer Netherlands. XIX, 508.
99. Koch, A.E., P.J. Polverini, S.L. Kunkel, L.A. Harlow, L.A. DiPietro, V.M. Elner, S.G. Elner, ve R.M. Strieter, 1992, Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis, *Science (New York, N.Y.)*, 258, 5089, 1798-1801.
100. Huang, S., J.B. Robinson, A. Deguzman, C.D. Bucana, ve I.J. Fidler, 2000, Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8, *Cancer research*, 60, 19, 5334-5339.
101. Bond, M., R.P. Fabunmi, A.H. Baker, ve A.C. Newby, 1998, Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: an absolute requirement for transcription factor NF-kappa B, *FEBS letters*, 435, 1, 29-34.
102. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, ve A.R. Currie, 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*, 26, 4, 239-257.
103. Gopisetty, G., K. Ramachandran, ve R. Singal, 2006, DNA methylation and apoptosis, *Molecular immunology*, 43, 11, 1729-1740.
104. Meier, P., A. Finch, ve G. Evan, 2000, Apoptosis in development, *Nature*, 407, 6805, 796-801.
105. Prindull, G., 1995, Apoptosis in the embryo and tumorigenesis, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 31a, 1, 116-123.
106. Melet, A., K. Song, O. Bucur, Z. Jagani, A.R. Grassian, ve R. Khosravi-Far, 2008, Apoptotic pathways in tumor progression and therapy, *Advances in experimental medicine and biology*, 615, 47-79.

107. Harris, G., 1983, *Molecular biology of the cell* by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and James D. Watson, Garland Publishing, 1983. \$33.95 (h/c) (USA and Canada)/ pound20.00 (approx.) (h/c) and pound12.50 (p/b) (elsewhere) (xxxix + 1181 pages) ISBN 0 824 07282 0 (h/c)/ISBN 0 824 07283 9 (p1b), *Immunology today*, 4, 12, 352.
108. Savill, J. ve V. Fadok, 2000, Corpse clearance defines the meaning of cell death, *Nature*, 407, 6805, 784-788.
109. Saikumar, P., Z. Dong, V. Mikhailov, M. Denton, J.M. Weinberg, ve M.A. Venkatachalam, 1999, Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease, *The American journal of medicine*, 107, 5, 489-506.
110. Strasser, A., L. O'Connor, ve V.M. Dixit, 2000, Apoptosis signaling, *Annual review of biochemistry*, 69, 217-245.
111. Gasparini, C., C. Celeghini, L. Monasta, ve G. Zauli, 2014, NF- κ B pathways in hematological malignancies, *Cell. Mol. Life Sci.*, 71, 11, 2083-2102.
112. Petit, F., D. Arnoult, L. Viollet, ve J. Estaquier, 2003, Intrinsic and extrinsic pathways signaling during HIV-1 mediated cell death, *Biochimie*, 85, 8, 795-811.
113. Fas, S.C., B. Fritzsche, E. Suri-Payer, ve P.H. Krammer, 2006, Death receptor signaling and its function in the immune system, *Current directions in autoimmunity*, 9, 1-17.
114. Sandu, C., E. Gavathiotis, T. Huang, I. Wegorzewska, ve M.H. Werner, 2005, A mechanism for death receptor discrimination by death adaptors, *The Journal of biological chemistry*, 280, 36, 31974-31980.
115. Berglund, H., D. Olerenshaw, A. Sankar, M. Federwisch, N.Q. McDonald, ve P.C. Driscoll, 2000, The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain, *Journal of molecular biology*, 302, 1, 171-188.
116. Schimmer, A.D., 2008, Apoptosis in leukemia: from molecular pathways to targeted therapies, *Best practice & research. Clinical haematology*, 21, 1, 5-11.
117. Stennicke, H.R., J.M. Jurgensmeier, H. Shin, Q. Deveraux, B.B. Wolf, X. Yang, Q. Zhou, H.M. Ellerby, L.M. Ellerby, D. Bredesen, D.R. Green, J.C. Reed, C.J. Froelich, ve G.S. Salvesen, 1998, Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8, *The Journal of biological chemistry*, 273, 42, 27084-27090.
118. Stennicke, H.R. ve G.S. Salvesen, 1998, Properties of the caspases, *Biochimica et biophysica acta*, 1387, 1-2, 17-31.
119. Klener, P., Jr., L. Andera, P. Klener, E. Necas, ve J. Zivny, 2006, Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of apoptotic pathways, *Folia biologica*, 52, 1-2, 34-44.
120. Green, D.R., R.A. Knight, G. Melino, A. Finazzi-Agro, ve S. Orrenius, 2004, Ten years of publication in cell death, *Cell death and differentiation*, 11, 1, 2-3.

121. Shi, Y., 2002, Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis, *Molecular cell*, 9, 3, 459-470.
122. Kluck, R.M., E. Bossy-Wetzel, D.R. Green, ve D.D. Newmeyer, 1997, The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science (New York, N.Y.)*, 275, 5303, 1132-1136.
123. Jin, Z. ve W.S. El-Deiry, 2005, Overview of cell death signaling pathways, *Cancer biology & therapy*, 4, 2, 139-163.
124. Cory, S. ve J.M. Adams, 2002, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nature reviews. Cancer*, 2, 9, 647-656.
125. Pastorino, J.G., M. Tafani, R.J. Rothman, A. Marcinkeviciute, J.B. Hoek, ve J.L. Farber, 1999, Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore, *The Journal of biological chemistry*, 274, 44, 31734-31739.
126. Caporali, S., S. Falcinelli, G. Starace, M.T. Russo, E. Bonmassar, J. Jiricny, ve S. D'Atri, 2004, DNA damage induced by temozolomide signals to both ATM and ATR: role of the mismatch repair system, *Molecular pharmacology*, 66, 3, 478-491.
127. Yoshida, K., T. Ozaki, K. Furuya, M. Nakanishi, H. Kikuchi, H. Yamamoto, S. Ono, T. Koda, K. Omura, ve A. Nakagawara, 2008, ATM-dependent nuclear accumulation of IKK-alpha plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin, *Oncogene*, 27, 8, 1183-1188.
128. Myers, J.S. ve D. Cortez, 2006, Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11, *The Journal of biological chemistry*, 281, 14, 9346-9350.
129. Pabla, N., S. Huang, Q.S. Mi, R. Daniel, ve Z. Dong, 2008, ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis, *The Journal of biological chemistry*, 283, 10, 6572-6583.
130. Roos, W.P. ve B. Kaina, 2013, DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis, *Cancer letters*, 332, 2, 237-248.
131. Cuadrado, M., B. Martinez-Pastor, M. Murga, L.I. Toledo, P. Gutierrez-Martinez, E. Lopez, ve O. Fernandez-Capetillo, 2006, ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks, *The Journal of experimental medicine*, 203, 2, 297-303.
132. Stiff, T., S.A. Walker, K. Cerosaletti, A.A. Goodarzi, E. Petermann, P. Concannon, M. O'Driscoll, ve P.A. Jeggo, 2006, ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling, *The EMBO journal*, 25, 24, 5775-5782.
133. Canman, C.E., D.S. Lim, K.A. Cimprich, Y. Taya, K. Tamai, K. Sakaguchi, E. Appella, M.B. Kastan, ve J.D. Siliciano, 1998, Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53, *Science (New York, N.Y.)*, 281, 5383, 1677-1679.
134. Escarcega, R.O., S. Fuentes-Alexandro, M. Garcia-Carrasco, A. Gatica, ve A. Zamora, 2007, The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer,

- Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain)), 19, 2, 154-161.
135. Ryan, K.M., M.K. Ernst, N.R. Rice, ve K.H. Vousden, 2000, Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death, *Nature*, 404, 6780, 892-897.
 136. Webster, G.A. ve N.D. Perkins, 1999, Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53, *Molecular and cellular biology*, 19, 5, 3485-3495.
 137. van den Bogert, C., B.H. Dontje, ve A.M. Kroon, 1985, The antitumour effect of doxycycline on a T-cell leukaemia in the rat, *Leukemia research*, 9, 5, 617-623.
 138. Chaturvedi, M.M., B. Sung, V.R. Yadav, R. Kannappan, ve B.B. Aggarwal, 2011, NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all', 30, 14, 1615-1630.
 139. Tanaka, T., M.J. Grusby, ve T. Kaisho, 2007, PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit, *Nature immunology*, 8, 6, 584-591.
 140. Karin, M., Y. Yamamoto, ve Q.M. Wang, 2004, The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development, *Nature reviews. Drug discovery*, 3, 1, 17-26.
 141. Alkalay, I., A. Yaron, A. Hatzubai, A. Orian, A. Ciechanover, ve Y. Ben-Neriah, 1995, Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 23, 10599-10603.
 142. Li, F. ve G. Sethi, 2010, Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy, *Biochimica et biophysica acta*, 1805, 2, 167-180.
 143. Sethi, G. ve V. Tergaonkar, 2009, Potential pharmacological control of the NF-kappaB pathway, *Trends in pharmacological sciences*, 30, 6, 313-321.
 144. O'Dea, E. ve A. Hoffmann, 2010, The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2, 1, a000216.
 145. Mitsiades, N., C.S. Mitsiades, V. Poulaki, D. Chauhan, G. Fanourakis, X. Gu, C. Bailey, M. Joseph, T.A. Libermann, S.P. Treon, N.C. Munshi, P.G. Richardson, T. Hideshima, ve K.C. Anderson, 2002, Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 22, 14374-14379.
 146. Adams, J., 2004, The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs, *Cancer cell*, 5, 5, 417-421.
 147. Nitiss, J.L., 2009, Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy, *Nature reviews. Cancer*, 9, 5, 338-350.
 148. Pommier, Y., E. Leo, H. Zhang, ve C. Marchand, 2010, DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs, *Chemistry & biology*, 17, 5, 421-433.

149. Malik, M. ve J.L. Nitiss, 2004, DNA repair functions that control sensitivity to topoisomerase-targeting drugs, *Eukaryotic cell*, 3, 1, 82-90.
150. Marchand, C., S. Antony, K.W. Kohn, M. Cushman, A. Ioanoviciu, B.L. Staker, A.B. Burgin, L. Stewart, ve Y. Pommier, 2006, A novel norindenoisoquinoline structure reveals a common interfacial inhibitor paradigm for ternary trapping of the topoisomerase I-DNA covalent complex, *Molecular cancer therapeutics*, 5, 2, 287-295.
151. D'Annessa, I., C. Tesauro, P. Fiorani, G. Chillemi, S. Castelli, O. Vassallo, G. Capranico, ve A. Desideri, 2012, Role of Flexibility in Protein-DNA-Drug Recognition: The Case of Asp677Gly-Val703Ile Topoisomerase Mutant Hypersensitive to Camptothecin, *Journal of amino acids*, 2012, 206083.
152. Dey, A., V. Tergaonkar, ve D.P. Lane, 2008, Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF-kappaB pathways, *Nature reviews. Drug discovery*, 7, 12, 1031-1040.
153. Capranico, G., Baranello L., Bertozzi, D. and Marinello, J., , *Transcriptional stress by camptothecin: mechanisms and implications for the drug antitumor activity*, . DNA topoisomerases and cancer, ed. Y. Pommier. 2012, New York: Springer. 309-324pp.
154. Lyu, Y.L., J.E. Kerrigan, C.P. Lin, A.M. Azarova, Y.C. Tsai, Y. Ban, ve L.F. Liu, 2007, Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane, *Cancer research*, 67, 18, 8839-8846.
155. Rogojina, A.T. ve J.L. Nitiss, 2008, Isolation and characterization of mAMSA-hypersensitive mutants. Cytotoxicity of Top2 covalent complexes containing DNA single strand breaks, *The Journal of biological chemistry*, 283, 43, 29239-29250.
156. Mehta, A., ve Hoffbrand, V, *Hematological Malignancy: basic mechanisms. "Hematology at a Glance"* Hematological Malignancy: basic mechanisms. "Hematology at a Glance", ed. A. Mehta, ve Hoffbrand, V. Vol. 19. 2000, Blackwell Science Ltd, Oxford: Blackwell Science Ltd, Oxford. 55-59.
157. Collins, S.J., R.C. Gallo, ve R.E. Gallagher, 1977, Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture, *Nature*, 270, 5635, 347-349.
158. Collins, S.J., 1987, The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression, *Blood*, 70, 5, 1233-1244.
159. Klein, E., H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliack, ve F. Vanky, 1976, Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 18, 4, 421-431.
160. Lozzio, C.B. ve B.B. Lozzio, 1975, Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, *Blood*, 45, 3, 321-334.
161. Koeffler, H.P. ve D.W. Golde, 1980, Human myeloid leukemia cell lines: a review, *Blood*, 56, 3, 344-350.

162. Nakajima, O., Y. Hashimoto, ve S. Iwasaki, 1993, Enhancement by retinoid of hemin-induced differentiation of human leukemia K562 cell line, FEBS letters, 330, 1, 81-84.
163. Andersson, L.C., M. Jokinen, ve C.G. Gahmberg, 1979, Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562, Nature, 278, 5702, 364-365.
164. Davis, M.G., Y. Kawai, ve I.J. Arinze, 2000, Involvement of Gialpha2 in sodium butyrate-induced erythroblastic differentiation of K562 cells, The Biochemical journal, 346 Pt 2, 455-461.
165. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, ve R.J. Randall, 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, The Journal of biological chemistry, 193, 1, 265-275.
166. Singhal, S.S., S. Awasthi, U. Pandya, J.T. Piper, M.K. Saini, J.Z. Cheng, ve Y.C. Awasthi, 1999, The effect of curcumin on glutathione-linked enzymes in K562 human leukemia cells, Toxicology letters, 109, 1-2, 87-95.
167. Wu, S.Q., K.V. Voelkerding, L. Sabatini, X.R. Chen, J. Huang, ve L.F. Meisner, 1995, Extensive amplification of bcr/abl fusion genes clustered on three marker chromosomes in human leukemic cell line K-562, Leukemia, 9, 5, 858-862.
168. Lozzio, B.B., C.B. Lozzio, E.G. Bamberger, ve A.S. Feliu, 1981, A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 166, 4, 546-550.
169. Doyle A, G.J., *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*, ed. G.J. Doyle A. 1998, JohnWiley&Sons: JohnWiley&Sons. 57-61:62-64.
170. Technology, L. *Cell Culture Protocols*. 2015; Available from: <http://www.lifetechnologies.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/trypan-blue-exclusion.html>.
171. Livak, K.J. ve T.D. Schmittgen, 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, Methods, 25, 4, 402-408.
172. Assef, Y., F. Rubio, G. Colo, S. del Monaco, M.A. Costas, ve B.A. Kotsias, 2009, Imatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells, Leukemia research, 33, 5, 710-716.
173. Pessano, S., A. McNab, ve G. Rovera, 1981, Growth and differentiation of human and murine erythroleukemia cell lines in serum-free synthetic medium, Cancer research, 41, 9 Pt 1, 3592-3596.
174. Harris, P. ve P. Ralph, 1985, Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines, Journal of leukocyte biology, 37, 4, 407-422.
175. Tallarida, R.J., 2006, An overview of drug combination analysis with isobolograms, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 319, 1, 1-7.

176. Wu, Z.-H. ve S. Miyamoto, 2008, Induction of a pro-apoptotic ATM–NF- κ B pathway and its repression by ATR in response to replication stress, 27, 14, 1963-1973.
177. Huang, T.T., S.M. Wuerzberger-Davis, B.J. Seufzer, S.D. Shumway, T. Kurama, D.A. Boothman, ve S. Miyamoto, 2000, NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events, *The Journal of biological chemistry*, 275, 13, 9501-9509.
178. Tsang, P.S., A.T. Cheuk, Q.R. Chen, Y.K. Song, T.C. Badgett, J.S. Wei, ve J. Khan, 2012, Synthetic lethal screen identifies NF-kappaB as a target for combination therapy with topotecan for patients with neuroblastoma, *BMC cancer*, 12, 101.
179. Meley, D., D.G. Spiller, M.R. White, H. McDowell, B. Pizer, ve V. See, 2010, p53-mediated delayed NF-kappaB activity enhances etoposide-induced cell death in medulloblastoma, *Cell death & disease*, 1, e41.
180. Kenneth, N.S., S. Mudie, ve S. Rocha, 2010, IKK and NF-kappaB-mediated regulation of Claspin impacts on ATR checkpoint function, *The EMBO journal*, 29, 17, 2966-2978.
181. McCool, K.W. ve S. Miyamoto, 2012, DNA damage-dependent NF-kappaB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out, *Immunological reviews*, 246, 1, 311-326.
182. Hong, Y.S., S.W. Hong, S.M. Kim, D.H. Jin, J.S. Shin, D.H. Yoon, K.P. Kim, J.L. Lee, D.S. Heo, J.S. Lee, ve T.W. Kim, 2012, Bortezomib induces G2-M arrest in human colon cancer cells through ROS-inducible phosphorylation of ATM-CHK1, *International journal of oncology*, 41, 1, 76-82.
183. Zhang, C.L., T. Zeng, X.L. Zhao, L.H. Yu, Z.P. Zhu, ve K.Q. Xie, 2012, Protective effects of garlic oil on hepatocarcinoma induced by N-nitrosodiethylamine in rats, *International journal of biological sciences*, 8, 3, 363-374.
184. Raveh-Amit, H., N. Hai, N. Rotem-Dai, G. Shahaf, J. Gopas, ve E. Livneh, 2011, Protein kinase Ceta activates NF-kappaB in response to camptothecin-induced DNA damage, *Biochemical and biophysical research communications*, 412, 2, 313-317.
185. Westphal, C.H., K.P. Hoyes, C.E. Canman, X. Huang, M.B. Kastan, J.H. Hendry, ve P. Leder, 1998, Loss of atm radiosensitizes multiple p53 null tissues, *Cancer research*, 58, 24, 5637-5639.
186. Janssens, S. ve J. Tschopp, 2006, Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response, *Cell death and differentiation*, 13, 5, 773-784.
187. Jenkins, L.M., S.R. Durell, S.J. Mazur, ve E. Appella, 2012, p53 N-terminal phosphorylation: a defining layer of complex regulation, *Carcinogenesis*, 33, 8, 1441-1449.
188. Barkett, M. ve T.D. Gilmore, 1999, Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene*, 18, 49, 6910-6924.

189. Caravita, T., P. de Fabritiis, A. Palumbo, S. Amadori, ve M. Boccadoro, 2006, Bortezomib: efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies, *Nature clinical practice. Oncology*, 3, 7, 374-387.
190. An, J., Y. Sun, M. Fisher, ve M.B. Rettig, 2004, Maximal apoptosis of renal cell carcinoma by the proteasome inhibitor bortezomib is nuclear factor-kappaB dependent, *Molecular cancer therapeutics*, 3, 6, 727-736.
191. Tan, B.H., J.A. Ross, S. Kaasa, F. Skorpen, ve K.C. Fearon, 2011, Identification of possible genetic polymorphisms involved in cancer cachexia: a systematic review, *Journal of genetics*, 90, 1, 165-177.
192. Fan, Y., J. Dutta, N. Gupta, G. Fan, ve C. Gelinas, 2008, Regulation of programmed cell death by NF-kappaB and its role in tumorigenesis and therapy, *Advances in experimental medicine and biology*, 615, 223-250.
193. Wang, J., N.K. Jacob, K.J. Ladner, A. Beg, J.D. Perko, S.M. Tanner, S. Liyanarachchi, R. Fishel, ve D.C. Guttridge, 2009, RelA/p65 functions to maintain cellular senescence by regulating genomic stability and DNA repair, *EMBO reports*, 10, 11, 1272-1278.
194. Hideshima, T., C. Mitsiades, M. Akiyama, T. Hayashi, D. Chauhan, P. Richardson, R. Schlossman, K. Podar, N.C. Munshi, N. Mitsiades, ve K.C. Anderson, 2003, Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341, *Blood*, 101, 4, 1530-1534.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Barış KERİMOĞLU

Doğum Tarihi ve Yeri: 22.07.1988-VAN

E-posta adresi : bariskerimoglu@yahoo.com.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi-Moleküler Biyoloji ve Genetik

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi-Biyoloji

Doktora :

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

Öksüzöğlü E, Tırinoğlu Ç, **Kerimoğlu B**, Öztürk K. The Investigation of Inhibition Effect of Bortezomib on Human DNA Topoisomerase I and II Enzymes. 1st International NanoBioTechnology Symposium, 27-29 August 2014, Köyceğiz, Muğla, Turkey

‘Topoizomeraz İnhibitörlerinin NF-κB Sinyal Yolağına Etkisi’, Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: 2014-007, Araştırmacı 2014-2015

‘Bortezomib’in Ökaryotik DNA Topoizomeraz I ve II Enzimi Üzerindeki in vitro İnhibisyon Etkisinin Araştırılması’, Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: 2013-98, Araştırmacı 2013-2014

‘Platin ve Palladyum'un Azot Donörlü Ligantlarla Hazırlanan Komplekslerinin Hematolojik Kansere Hücre Hatları Üzerine Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi’, Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: 2014-009, Araştırmacı 2014-2015

‘Kanser Hücre Hatlarında Antikanser İlaçlara Karşı Gelişen Çoklu İlaç Direnci (MDR) Mekanizmalarının Araştırılması’, Aksaray Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Proje No: 2014-022, Araştırmacı 2014-(devam ediyor)