

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

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

**PrP^C ANLATIMLARI SUSTURULMUŞ H69 VE H69AR HÜCRE
HATLARINDA HÜCRE ÖLÜM BELİRTEÇLERİNİN qRT-PCR
YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

Hayrettin KADINŞAH

**Danışman
Prof. Dr. Erdal BALCAN**



MANİSA-2019

Hayretin
KADINŞAH

PRPC ANLATIMLARI SUSTURULMUŞ H69 VE H69AR HÜCRE HATLARINDA HÜCRE
ÖLÜM BELİRTEÇLERİNİN qRT-PCR YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

2019

TEZ ONAYI

Hayrettin KADINŞAH tarafından hazırlanan "**PrP^C anlatımları susturulmuş H69 ve H69AR hücre hatlarında hücre ölüm belirteçlerinin qRT-PCR yöntemiyle araştırılması**" adlı tez çalışması 02/05/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof. Dr. Erdal BALCAN
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Ü. Berrin TUĞRUL
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Savaş İZZETOĞLU
Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Hayrettin KADINŞAH



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLO DİZİNİ	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Akciğer Kanseri.....	2
2.1.1 Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu (KHAK).....	3
2.2 Programlı Hücre Ölümü	4
2.2.1 Apoptozis	4
2.2.2 Otofaji	6
2.2.3 Programlı Hücre Ölümü ve Kanserdeki Rolü.....	8
2.3 Doksorubisin	9
2.4 Çoklu İlaça Dirençlilik	10
2.5 Prion Proteini.....	12
2.5.1 Prion Proteini ve Programlı Hücre Ölümü	15
2.5.2 Prion Proteini ve Kanseri	16
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	18
3.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller.....	18
3.2 Hücre Hatlarının Temini ve İdamesi	19
3.3 Hücrelerin Sayımı.....	20
3.4 Kimyasalların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	20
3.5 Deney Gruplarının Oluşturulması	20
3.6 MTT Canlılık Ölçüm Testi.....	21
3.7 PrP'nin siRNA Transfeksiyonu ile Susturulması	21
3.7.1 Forward Transfeksiyon	22
3.7.2 Reverse Transkripsiyon	22
3.8 RNA'nın İzolasyonu.....	22
3.9 RNA Agaroz Jel Elektroforezi	23
3.10 cDNA'nın Sentezlenmesi	24
3.11 Real Time Kantitatif PCR (qRT-PCR).....	25
3.12 İstatistiksel Analiz.....	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	27
4.1 Bulgular	27
4.1.1 H69 ve H69AR Hücre Kültürlerinde Doksorubisin'in Doz Cevap Eğrisi. 27	
4.1.2 H69 ve H69AR Hücrelerinden Elde Edilen Total RNA'ların A260/A280 Oranları	27
4.1.3 <i>Prnp</i> , <i>Bax</i> , <i>Becn1</i> ve <i>CD44</i> Genlerinin İfadeleme Değişimleri.....	28
4.2 Tartışma.....	35
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4E-BP1	4E-Bağlayan Protein 1
ABC	ATP Bağlayan Kaset Protein
ADP	Adenozin Trifosfat
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktifleştiren Faktör-1
ARF	Alternatif Okuma Çerçevesi
ATG	Otofaji İlişkili Protein
ATP	Adenozin Trifosfat
BCL2	B-hücreli Lenfoma 2
BCRP	Meme Kanseri Direnç Protein
BH-3	Bcl-2 Homoloji Domain 3
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
cDNA	Komplementer DNA
DD	Ölüm Domaini
DIABLO	Direct IAP Binding Protein With Low pI
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyalleme Kompleksi
DMSO	Dimetilsülfooksit
dNTP	Deoksिनुकлеотит trifosfat
DR5	Ölüm Reseptörü 5
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGRF	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Endoplazmik Retikulum
ERK	Ekstrasellüler Düzenlenmiş Kinaz
FADD	Fas Aracılı Ölüm Domaini
FasL	Fas Ligandı
FBS	Fetal Sığır Serum
FGRF	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
GPI	Glikosilfosfatidilinositol
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HSP90	Isı Şok Proteini 90
HtrA2	Yüksek Sıcaklık Gereksinimli Protein A
IAP	Apoptosis Proteinleri İnhibitörü

KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu
KHOAK	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomu
KRAS	Kristen Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LAMP	Lizozomal İlişkili Membran Proteini
LC3-II	Hafif Zincir 3β
MAP	Mikrotübül İlişkili Protein
MDR	Çoklu İlaç Direnci
MMP11	Matriks Metalloproteinaz 11
MOMP	Mitokondriyal Dış Membran Geçirgenleştirme
MRP1	Çoklu İlaç Direnci Protein 1
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NCD	Bulaşıcı Olmayan Hastalıklar
NF-κB	Nükleer Faktör-κB
ODN	Oligo Deoksi Nükleotid
PARP1	Poli ADP Riboz Polimeraz
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PHÖ	Programlı Hücre Ölümü
PI3K	Fosfoinositid 3 Kinaz
PrP^C	Hücrel Prion Proteini
PrP^{Sc}	Scrapie Prion Proteini
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homolog
RB1	Retinoblastoma 1
RNAi	RNA interferans
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
siRNA	short interferans RNA
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPRN	Shadow of Prion Protein
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR	TNF Reseptörü
TP53	Tümör Protein p53
TRADD	TNF Reseptörü Aracılı Ölüm Domaini
TRAIL	TNF İlişkili Apoptosis İndükleyen Ligand
TSE	Bulaşıcı Spongiform Ensefalopati

ULK

Unc-51 Benzeri Kinaz

Vps

Vacuolar protein sorting-associated protein

WHO

Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Dış ve iç apoptotik yolların özet gösterimi.....	5
Şekil 2.2: Otofaji aşamaları.	7
Şekil 2.3: Düzensiz apoptozis ve kanserleşmeye neden olan etmenler.	8
Şekil 2.4: Doksorubisin'in yapısı.	10
Şekil 2.5: İlaç dirençliliğin ortaya çıkışında izlenen mekanizmaların şematize edilmiş hali.	11
Şekil 2.6: PrP ^C ve PrP ^{Sc} üçüncül yapıları.	13
Şekil 2.7: Prion ailesi proteinlerin sekonder yapıları.....	13
Şekil 2.8: PrP ^C 'nin rol aldığı fizyolojik olaylar.....	14
Şekil 3.1: H69 ve H69AR hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü.	19
Şekil 3.2: H69 ve H69AR örneklerinden elde edilen RNA'ların agaroz jel görüntüleri..	24
Şekil 3.3: Real Time PCR sırasında oluşan dsDNA'nın yaydığı floresan ışıma verilerinin logaritmik ışıma/döngü grafiği.	26
Şekil 4.1: H69 ve H69AR hücre kültürlerinde Doksorubisin'in farklı konsantrasyonlarının 48. saatteki sitotoksik etkileri.	27
Şekil 4.2: H69 hücrelerinde gen ifadenme değişimlerinin gösterimi.	29
Şekil 4.3: H69AR hücrelerinde gen ifadenme değişimlerinin gösterimi.....	32

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan materyaller.	18
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri.	18
Tablo 3.3: Tasarlanan deney grupları ve bu çalışmada kullanılan kısaltmaları.	20
Tablo 3.4: Kullanılan hedef ve referans genlerin primer dizileri.	25
Tablo 3.5: Real Time PCR cihazına girilen döngü ve adımlar.	25
Tablo 4.1: H69 ve H69AR hücre hatlarında Doksorubisin dozları uygulandığında belirlene canlılık oranlarının tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	27
Tablo 4.2: Örneklerden elde edilen total RNA'ların miktar ve A260/A280 değerleri.	28
Tablo 4.3: H69 hücre hattında gen ifadenme düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	28
Tablo 4.4: H69 hücre gruplarında <i>Prnp</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	29
Tablo 4.5: H69 hücre gruplarında <i>Prnp</i> ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.	29
Tablo 4.6: H69 hücre gruplarında <i>Bax</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	30
Tablo 4.7: H69 hücre gruplarında <i>Bax</i> ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.	30
Tablo 4.8: H69 hücre gruplarında <i>Becn1</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	30
Tablo 4.9: H69 hücre gruplarında <i>Becn1</i> ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.	30
Tablo 4.10: H69 hücre gruplarında <i>CD44</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	31
Tablo 4.11: H69 hücre gruplarında <i>CD44</i> ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.	31
Tablo 4.12: H69AR hücre hattında gen ifadenme düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları.	31
Tablo 4.13: H69AR hücre gruplarında <i>Prnp</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	32
Tablo 4.14: H69AR hücre gruplarında <i>Prnp</i> ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.	32
Tablo 4.15: H69AR hücre gruplarında <i>Bax</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	33
Tablo 4.16: H69AR hücre gruplarında <i>Bax</i> ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.	33
Tablo 4.17: H69AR hücre gruplarında <i>Becn1</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	33
Tablo 4.18: H69AR hücre gruplarında <i>Becn1</i> ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.	33
Tablo 4.19: H69AR hücre gruplarında <i>CD44</i> ifadenmesinin istatistiksel verileri.	34
Tablo 4.20: H69AR hücre gruplarında <i>CD44</i> ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.	34

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans programım boyunca bana sabırla yardımcı ve destek olan tez danışmanım Prof. Dr. Erdal BALCAN'a ve çalışma arkadaşım Zübeyde ÖZTEL'e teşekkürlerimi borç bilirim. Çalışmalarımnda laboratuvar imkânlarından faydalanmama müsaade eden DEFAM kurumuna ve çalışmamda gerekli finansal desteği 2017/005 nolu projeyle sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürlerimi sunarım.

Hayrettin KADINŞAH
MANİSA 2019



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PrP^C Anlatımları Susturulmuş H69 ve H69AR Hücre Hatlarında Hücre Ölüm Belirteçlerinin qRT-PCR Yöntemiyle Araştırılması

Hayrettin KADINŞAH

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Erdal BALCAN

Hücrel Prion proteini (PrP^C), embriyogenezin erken safhalarında ifade edilmeye başlanan bir hücre yüzey proteindir. Merkezi sinir sistemi hücreleri ve lenfoid dokularda en çok ifade edilen bu protein birçok rolde görev almasına rağmen birçok işlevi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Diğer yandan, yapılan çalışmalar PrP^C'nin kanser hücrelerinde de yüksek seviyede ifade edildiğini göstermekte, sağ kalım ve çoklu ilaca dirençlilik (MDR) mekanizmalarında rol aldığı öne sürülmektedir. PrP^C, kanser hücrelerinde gösterdiği işlevler nedeniyle ilgi odağı olmuş ve programlı hücre ölümü ve çoklu ilaca direnç mekanizmalarındaki rolü nedeniyle yeni tedavi yaklaşımları için potansiyel bir hedef haline gelmiştir. Bu çalışmanın amacı, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hücre hatlarında (H69) ve bunun ilaca dirençli formunda (H69AR) PrP^C ifadenmesi ile programlanmış hücre ölümü arasındaki ilişkileri belirlemektir.

Bu çalışmada, PrP^C'nin programlanmış hücre ölümü ve çoklu ilaca direnç mekanizmaları üzerindeki rollerini belirlemek amacıyla her iki hücre hattından kontrol grubu, PrP^C siRNA uygulanmış grup, Doksorubisin uygulanmış grup ve PrP^C siRNA+Doksorubisin uygulanmış grup olmak üzere dört grup oluşturulmuş ve *Prnp*, *Bax*, *Becn1*, *CD44* genlerinin ekspresyon düzeyleri qRT-PCR (kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile araştırılmıştır. H69 hücre hattında PrP'nin siRNA ile baskılanması sonucunda *CD44* ifadenme düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). H69AR hücre hattında ise PrP^C baskılanması sonucu *Becn1* ve *CD44* ifadenme düzeylerinde gözlenen artışın yanı sıra Doksorubisin uygulanmış grupta *Prnp* ifadenmesi de önemli derecede artmıştır ($p<0,05$). Ancak, PrP^C siRNA ve PrP^C siRNA+Doksorubisin gruplarının *Prnp* düzeylerinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir ($p>0,05$).

Elde ettiğimiz bulgular ile, *Prnp* ifadenmesinin H69 hücre hattında *CD44* ile ilişki halinde olduğunu ve H69AR hücre hattında otofaji ve ilaç dirençliliği ile önemli ölçüde yakından ilişkili olduğu sonucuna vardık. Sonuç olarak, MDR fenotipli küçük hücreli akciğer kanserlerinin tedavisinde, PrP^C'nin baskılanması ile eş zamanlı uygulanan kemoterapinin etkin bir tedavi yöntemi olacağı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: PrP^C, Kanser, KHAK, Çoklu İlaça Direnç, Programlı hücre ölümü, qRT-PCR

2019, 64 sayfa



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigation of Cell Death Markers with qRT-PCR Method in PrP^C Expression Supressed H69 and H69AR Cell Lines

Hayrettin KADINŞAH

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

Supervisor: Prof. Dr. Erdal BALCAN

Cellular Prion protein (PrP^C) is a cell surface protein which is expressed in early stages of embryogenesis. PrP^C, is the most expressed protein in the central nervous system cells and lymphoid tissues and it's involved in many roles. However, many of its functions have not yet been fully elucidated. On the other hand, studies have shown that PrP^C is expressed at a high level in cancer cells, and suggests, that it plays a role in cell survival and multidrug resistance (MDR) mechanisms. PrP^C has become a centre of interest due to its functions in cancer cells and has become a potential target for new therapeutic approaches due to its role in programmed cell death and multi drug resistance mechanisms. The purpose of this study is to determine the interactions between PrP^C expression and programmed cell death in small cell lung carcinoma (SCLC) cell line (H69) an its MDR phenotype (H69AR).

To determine the roles of PrP^C in programmed cell death and multidrug resistance mechanisms, four groups have been designed in both of two cell lines including control, PrP^C siRNA treated group, Doxorubicin treated group and PrP^C siRNA+Doxorubicin treated group, and the expression levels of *Prnp*, *Bax*, *Becn1* and *CD44* were observed with qRT-PCR (quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction) method. Increased expression of *CD44* were observed as a result of the suppression of PrP^C with siRNA in the H69 cell line ($p<0,05$). In the H69AR cell line, the increase in the expression of *Becn1* and *CD44* were observed in the PrP^C siRNA treated group, as well as the expression of *Prnp* in the Doxorubicin treated group increased significantly ($p<0,05$). However, no significant change was detected in *Prnp* levels in the groups PrP^C siRNA and PrP^C siRNA+Doxorubicin ($p>0,05$).

Our findings suggest that *Prnp* expression is associated with *CD44* in the H69 cell line and it's significantly related to autophagy and drug resistance in the H69AR cell line. In conclusion we propose that, in the small cell lung cancers with the MDR phenotype, concurrent treatment with chemotherapy and *Prnp* downregulation will be an effective treatment method

Keywords: PrP^C, Cancer, SCLC, Multi Drug Resistance, Programmed cell death, qRT-PCR

2019, 64 pages

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde bulaşıcı olmayan hastalıklar içerisinde ölüme neden olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır [1]. 2018 yılında dünya çapında yaklaşık 17 milyon yeni vakanın ve 9 milyon ölümün gerçekleştiği tahmin edilmektedir [2]. Doku ve organlardaki hücre popülasyon dengesinin bozulması ve kontrolsüz çoğalma sonucunda tümör oluşumunun altında yatan sebeplerin başında hücrelerde, hücre ölümü ve bölünme hızı gibi işlevlerden sorumlu olan genlerde meydana gelen mutasyonlar yer almaktadır. Böylece ölümden kaçan hücreler zamanla kanserleşmeye neden olabilir [3]. Bu süreçte en önemli mekanizmalardan biri ise hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlayan programlı hücre ölümüdür [4] ve kanserleşmeye giden yolda bu kontrol mekanizmasından kaçış önemli bir gelişmedir [5]. Apoptozis, otofaji ve nekrozis olarak üç tipe ayrılan programlı hücre ölümlerinin inhibe edilmesi ile kanser hücreleri yaşamaya ve çoğalmaya devam eder [6]. Ayrıca, çoklu ilaç dirençliliğinin kazanılmasında hücre ölümünün inhibe edilmesi de önemli bir rol oynamaktadır.

Prion proteini, tümör oluşumu sırasında hücre adezyonu, göç, çoğalma ve farklılaşma gibi birçok işleve sahip olmasının yanı sıra, programlı hücre ölümü ve ilaç dirençliliği mekanizmalarında da oldukça etkin bir rol oynamaktadır [7]. Genel olarak, kanser hücrelerinde strese karşı koruma, apoptozisin baskılanması ve otofajinin düzenlenmesi [8-10] gibi ana işlevlere sahip olan Prion proteini, kanser hücrelerinin sağkalımında büyük bir yer tutar. Bu sebeple Prion proteini yeni tedaviler için potansiyel bir hedef haline gelmiştir. Dünyada en çok rastlanılan kanser türlerinden biri olan [11] akciğer kanserinin bir kategorisinden olan küçük hücreli akciğer karsinomu, hızlı metastatik aktivite ve zor tedavi ile karakterizedir [11-13]. Ancak, günümüzde küçük hücreli akciğer karsinomlarında Prion proteinin işlevleri hakkında yeterli bir bilgi mevcut değildir. Çalışmamızda, bu eksikliği gidermek amacıyla, küçük hücreli akciğer karsinomu olan H69 ve bunun çoklu ilaca direnç fenotipine sahip olan formu H69AR hücre hattı üzerinde Prion proteini geni olan *Prnp* ile hücre ölümü belirteçlerinden olan *Bax* ve *Becn1*'in yanı sıra çoklu ilaca dirençlilik ile ilişkili olan *CD44* arasındaki ilişkilerinin ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, dünya sağlık örgütünün (WHO) verilerine göre bulaşıcı olmayan hastalıklar arasında 30 ve 70 yaş arası ölümlerin ikincil önemli (NCD ölümlerinin %27'si) nedenini oluşturmaktadır [1]. Kanserın rastlanma sıklığı ve mortalitesi tüm dünyada hızlı bir artış göstermektedir. Bunun ardındaki sebepler karmaşık olsa da yaşlanma ve popülasyonun artması ile birlikte sosyoekonomik gelişime bağılı olarak kanser ana risk faktörlerinin yaygınlığı ve dağılımının değışmesidir [14,15]. 2018 yılında dünya çapında 17 milyon yeni vaka ve 9 milyon ölümün gerçekleştiğı tahmin edilmektedir [2].

Kanser, karsinogenez ve tümörigenez adı verilen birtakım süreçler sonrasında meydana gelir. Yetişkin bir insan, doku ve organların tazelenmesi için bölünüp farklılaşması gereken hücreler barındırır. Bu bölünme ve yenilenme yeteneğine sahip hücreler kök hücre olarak bilinir ve her gün yaklaşık 10^{12} kez bölünebilirler. Aynı zamanda, normalde düşük seviyelerde bölünmeye sahip dokularda travma ya da enfeksiyon benzeri etmenler sonucunda bölünme hızı artar. Doku ya da organlarda bu hücre popülasyon dengesini sağlayan hücre bölünmesi ve ölümü birtakım moleküler mekanizmalar ile sıkıca kontrol edilir. Bu popülasyon dengesini bozan herhangi bir faktör ya da faktörler nesiller sonra, bulunduğu doku ya da organdan ayrı bir hücre topluluğı olarak değerlendirilen, tümör oluşumuna yol açar.

Karsinojenik süreçte, tek bir hücrenin ölüm ve bölünme oranlarında değışime yol açan faktörlerin başında hücre bölünmesi ve apoptosizin kontrolünden sorumlu genlerde meydana gelen mutasyonlar gelmektedir. Homeostatik süreçlerden kaçmayı başaran mutasyonlar hücreyi kanserleşmeye sürükler. Bu mutasyonlar onkogenlerde meydana gelen, protein aktivitesini arttıran mutasyonlar ya da tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen, gen fonksiyonunu inaktive eden mutasyonlar olmak üzere iki temel gruba ayrılır [3].

2.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünya genelinde birkaç on yıldır en sık rastlanılan kanser vakalarındandır. Aynı zamanda 2012 yılında kanser nedeni ile ölümlerin yaklaşık %19,4'ünü oluşturmaktadır. Son birkaç on yıllık süreç içerisinde akciğer kanserinin tanısında ve mortalitesinde önemli bir artış olmasına karşın bu kadar ciddi bir vakaya

karşılık bu hastalığın tedavisinde aynı oranda gelişme sağlanamamıştır [11]. Yarıım yarımdan fazla bir süredir sigara tüketimi, akciğer kanserinin öncelikli nedenleri arasında sayılmaktadır. Öyle ki, sigara içmek akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'inden sorumludur [11]. Diğer nedenler arasında ise pasif sigara içiciliği, asbest, nikel, krom ve arsenik gibi etkenlere maruz kalma, radon gazı ve radyasyona maruz kalma ile hava kirliliği sayılabilir [16].

Histolojik olarak akciğer kanseri, skuamöz hücreli, küçük hücreli, adenokarsinoma ve büyük hücreli karsinoma olmak üzere dört kategoriye ayrılmaktadır. Sigara içme ile bu tipler arasındaki en güçlü istatistiksel ilişki skuamöz ve küçük hücreli karsinoma ile ve neredeyse yalnızca sigara içenlerde gözlenir [11]. Bu dört kategori, iki ana histolojik grup olan küçük hücreli akciğer karsinomu (Small Cell Lung Carcinoma, SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (Non-Small Cell Lung Carcinoma, NSCLC) altında sınıflandırılır. Moleküler düzeyde, akciğer kanserinde en sık rastlanılan somatik ve epigenetik değişimler TP53 mutasyonları, KRAS ya da EGRF mutasyonları ve CDKN2A/ARF/RB1 yolağındaki değişimlerdir [17].

2.1.1 Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu (KHAK)

KHAK, akciğer kanserlerinin %14'ünü oluşturur ve 2015 yılında nöroendokrin tümör kategorisinin bir alt tipi olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Genellikle üst bronş duvarlarında meydana gelir [11] ve nöroendokrin prekursor hücrelerden kökenlenir [17]. KHAK, hızla yayılarak metastatik evreye erken safhalarda ulaşır ve genellikle beyni, karaciğeri, kemiği (ve kemik iliğini) ve adrenal bezleri etkiler. KHAK'ı diğer akciğer karsinom kategorilerinden ayıran en önemli özelliği ise bunlar arasında en kötü prognozu vermesine neden olan erken metastaza olan eğilimdir [11].

KHAK'de moleküler düzeyde gözlenen en önemli değişimler, TP53, RB1, BCL2 ve PI3K yolağının yanı sıra MYC ve NOTCH ailesinde gözlenen yüksek orandaki aktivasyonu veya inaktive edici mutasyonlardır [18,19]. RB1 ve TP53 tümör baskılayıcı genlerindeki işlev kayıpları KHAK vakalarının sırasıyla %65 ve %90'ında gözlenirken NOTCH ailesi ise vakaların %25'inde değişime uğramıştır [20]. PI3K yolağında inhibitör olan PTEN'in ise KHOAK'lerde normal olarak bulunduğu ancak KHAK vakalarının önemli bir kısmında bulunmadığı tespit edilmiştir [21]. Bir diğer

önemli değişim ise anti-apoptotik protein olan BCL2 ifadenmesinin KHAK vakalarının %75-90'ında tespit edilmesidir [18].

Son yıllarda KHAK'nin standart kemoterapi (platin-etoposid) tedavileri ve sağkalım sürelerinde önemli bir değişim gerçekleşmemiştir [13]. KHAK'nin yüksek metastatik potansiyeli ve tedaviye sınırlı yanıt vermesi bu sebeplerden biridir [17]. Erken safhalarda kemoterapi ve radyoterapiye görece iyi bir yanıt verse de ilerleyen safhalarda ancak 6 aylık bir sağ kalım yakalanabilmiştir [12]. Günümüze kadar olan çalışmalarla ise potansiyel tedavi hedefleri olabilecek genetik değişimler ve sinyal yolları tespit edilmiştir. Gelecek vaat eden bu hedeflerden bazıları NOTCH, PI3K ve Aurora kinaz yolları ile anti FGRF ailesi, HSP90 ve PARP1'dir [22]. KHAK'lerde en iyi bilinen anti-apoptotik BCL-2'nin inhibe edilmesi hedeflense de henüz tatmin edici sonuçlar alınamamıştır [22]. Birçok tümör çeşidinde çoklu ilaç direncinden sorumlu bu proteinin ekspresyonu ODN aracılığı ile susturulduğunda kemoterapiye karşı hassaslaştığı gösterilmiştir [23].

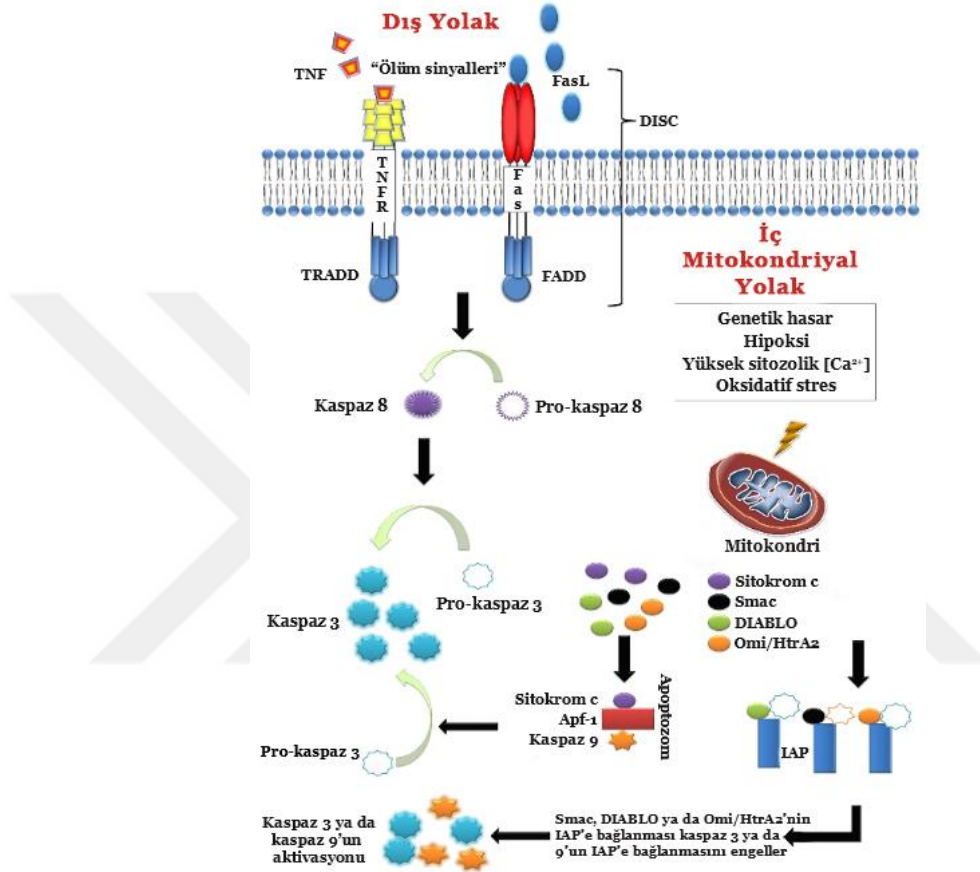
2.2 Programlı Hücre Ölümü

Programlı hücre ölümü (PHÖ), hücrelerin elenmesi için izlenilen seçici bir süreçtir. Embriyonik safhada nihai morfolojik şekle ulaşmak için kullanılmasının yanı sıra dokuların yenilenmesi ve stabilitesi için gerekli olan hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengenin kurulmasını da sağlar [4]. PHÖ, morfolojik olarak apoptozis, otofaji ve nekrozis olmak üzere üç tipte gözlenmiştir. Apoptozis, çekirdeğin parçalanması ve hücre yüzeyinde gözlenen tomurcuklanmalar ile karakterizedir [6]. Erişkinlerde doku içindeki dengeden ve hasarlı hücrelerin elenmesinden sorumludur [24]. Otofaji, özellikle hücresel açlık durumlarında vakuoller aracılığı ile kullanılmayan hücresel bileşenler ve organellerin kaldırılması ile karakterizedir [6]. Ancak, normal şartlarda hücre içinde enerjinin geri dönüşümünde rol alır [25]. Nekrozis, hücre zar bütünlüğünün bozulması ve çekirdeğin erimesi ile kendini gösterir [6].

2.2.1 Apoptozis

Programlanmış hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptozis (Antik Yunanca sonbaharda yaprakların dökülmesi), çok hücreli hayvanların gelişim sürecindeki organ şekillenmesinde ve ergin süreçte dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasını

sağlayan önemli bir fizyolojik olaydır [26] ve kaspaz aracılı dış (extrinsic) ya da iç (intrinsic) yollar ile aktive edilir (Şekil 2.1). Kaspaz aktivitesi, apoptozisin karakteristik özellikleri olan kromatin yoğunlaşması ve hücre zarının tomurcuklanmasından sorumludur. Kaspazların bu tersinmez aktivitesi dış ve iç apoptotik yolların nihai sonucudur [27].



Şekil 2.1: Dış ve iç apoptotik yolların özet gösterimi ([28] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

Dış apoptotik yolak, hücre ölüm ligandları olan TRAIL, TNF ve FasL'nin reseptörleri DR5, TNFR ve Fas'a bağlanması ile başlar. Bu ölüm reseptörleri TRADD ve FADD gibi adaptör proteinlerin bağlandığı DD (Death Domain) adında bir intrasellüler domain içerirler [29]. Ligand reseptöre bağlandıktan sonra bu ligand, reseptör ve adaptör protein'in yer aldığı DISC kompleksi meydana gelir. Bu kompleks, pro-kaspaz 8'i aktifleştirerek kaspaz 8'in aşağı yolaktaki kaspazları aktive etmesine olanak verir [28].

İç apoptotik yolak, Bcl-2 ailesine ait, bir kısmı pro-apoptotik (Bax, Bad, Bid vs.) bir kısmı da anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 vs.) olan, bir grup protein ile

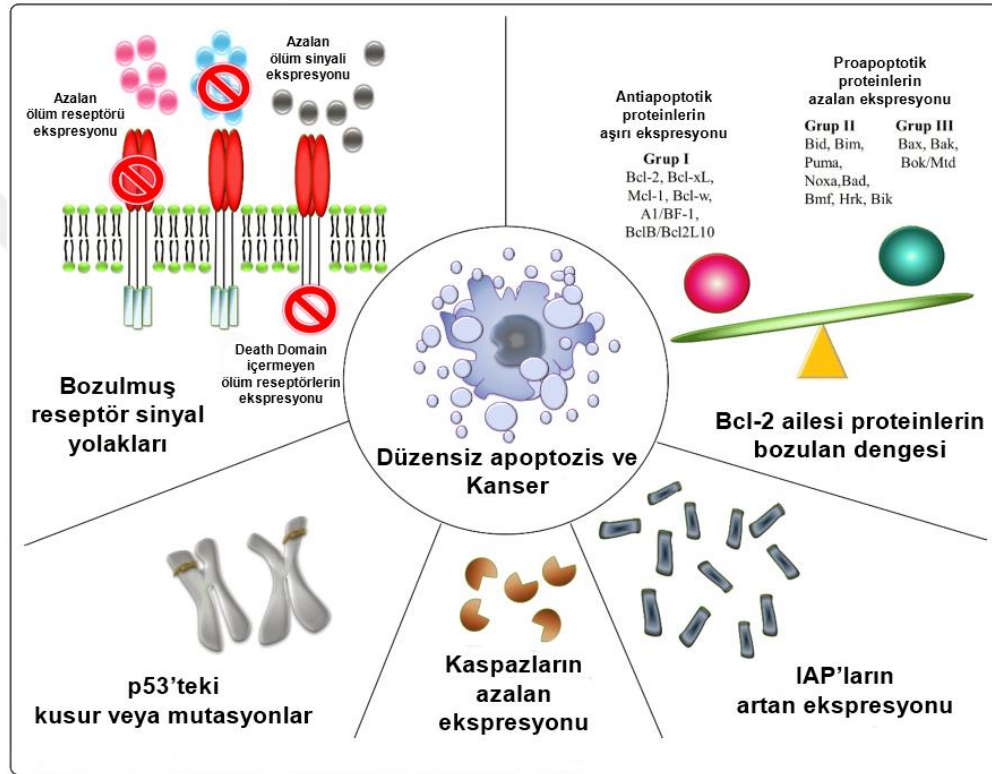
kontrol edilir [28]. İç yolak, genetik hasar, hipoksi, yüksek sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonu ve oksidatif stres ile başlatılabilir. Uyaran alındığında mitokondri dış zar geçirgenliği artar ve pro-apoptotik protein olan sitokrom *c*, *Smac*, DIABLO ve Omi/HtrA2 sitoplazmaya salınır. Sitokrom *c*'nin salınımı, sitokrom *c*, Apaf-1 ve kaspaz 9'dan oluşan **apoptozom** olarak bilinen bir kompleksin oluşumu yoluyla kaspaz 3'ü aktive eder. Diğer yandan, *Smac*/DIABLO veya Omi/HtrA2, bir kaspaz inhibitörü ailesi olan IAP'lara bağlanarak kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu teşvik eder [30]. Dış ve iç yollarla aktive edilen kaspazlar daha sonra apoptozisin kromatin yoğunlaşması, çekirdeğin yıkılması ve zarda tomurcuklanmalar gibi karakteristik özelliklerinden sorumlu birçok yolağı aktive eder.

2.2.2 Otofaji

Otofaji, tüm ökaryotlarda korunmuş olan bir hücresel bozunma ve geri dönüşüm sürecidir. Memeli hücrelerinde, mikrootofafi, makrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç tip otofaji vardır [25]. Mikrootofaji sırasında lizozom membranının çıkıntı ya da girinti oluşturmasıyla kargo yakalanır [31]. Şaperon aracılı otofaji sırasında şaperonlar özel bir pentapeptid motif taşıyan kargo proteinleri tanır ve bunları birincil yapıya indirgeyerek lizozom içine transloke eder [32]. Makrootoji, çift zarlı veziküllerin (otofagozom) *de novo* sentezi ile kargoyu ayırır ve lizozoma aktarır. Makrootofaji sürekli düşük seviyede meydana gelir ve besin ve enerji kıtlığı gibi stres şartlarında indüklenebilir. Böylece, sitoplazmik materyaller, biyosentez ya da enerji üretim süreçlerinde kullanılabilen, metabolitlere indirgenir ve hücrenin sağkalımı sağlanır (Şekil 2.2) [33].

2.2.3 Programlı Hücre Ölümü ve Kanserdeki Rolü

Hücre ölümünden kaçış, kanserleşmeye giden yolda önemli bir gelişmedir [5]. Azalmış apoptozis veya direnci karsinogeneze hayati bir rol oynar. Malign bir hücrenin apoptozisde azalma veya apoptozis direnci kazanabileceği birçok yol vardır. Apoptozisten kaçışın meydana geldiği mekanizmalar genel olarak 1) pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin bozulmuş dengesi, 2) azalmış kaspaz fonksiyonu ve 3) bozulmuş ölüm reseptörü sinyallemedir (Şekil 2.3) [28].



Şekil 2.3: Düzensiz apoptozis ve kanserleşmeye neden olan etmenler ([28] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

Hücre ölümünün düzenlenmesi pro ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesine ait proteinlerin oranı ile sağlanır. Bu genlerin aşırı ya da düşük ifadenmesi, apoptozisi azaltarak karsinogeneze katkıda bulunur [35]. İşlevleri ve Bcl-2 homoloji (BH) bölgelerine göre Bcl-2 aile üyeleri üç gruba ayrılır. Birinci grup, dört BH bölgesinin tamamını içeren anti-apoptotik proteinlerdir ve hücreyi apoptotik uyarıcılardan korurlar. İkinci grup sadece-BH-3 proteinlerinden oluşur. DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu ve endoplazmik retikulum stresi gibi durumlarda aktive olurlar. Üçüncü grubun üyeleri dört BH alanının tümünü içerir ve pro-apoptotiktir (Şekil 2.3) [36]. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyelerinin dengesinde bir

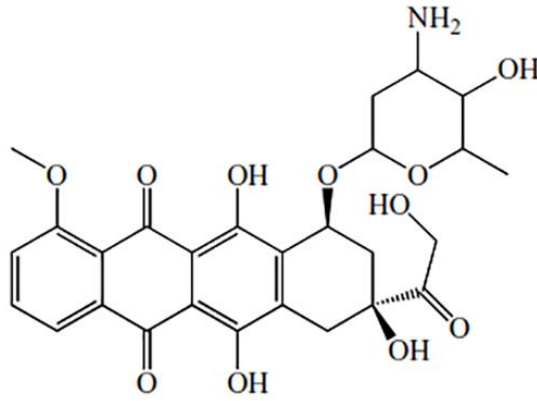
bozulma apoptozisde düzensizlikle sonuçlanır. Apoptozisin başlatılmasında ve yürütülmesinde önemli bir rol oynayan kaspazların düşük seviyeleri veya kaspaz fonksiyonundaki bozulma apoptotik azalmaya ve karsinogeneze yol açabilir [28]. Ölüm ligandları, ölüm domainleri (DD) bulundurmayan ölüm reseptörlerine bağlanabilir ve bu durumda sinyal kaskadı başlatılamaz [37]. Reseptörün azalan ekspresyonu veya reseptör fonksiyonunun bozulmasının yanı sıra, ölüm sinyallerindeki azalma da apoptozisin düzensizleşmesine katkıda bulunur [28].

Otofaji, hücrelerin ribozomlar ve mitokondri gibi hücresel organelleri parçalamalarını sağlar ve sonuçta ortaya çıkan katabolitlerin geri dönüştürülmesini ve böylece biyosentez ve enerji metabolizması için kullanılmasını sağlar. Bu şekilde, birçok kanser hücresinin yaşadığı stresli ve besinin sınırlı olduğu ortamlarda hayatta kalmayı destekleyen düşük moleküler ağırlıklı metabolitler üretilir [5]. Ancak otofaji, sağkalımın yanı sıra hücre ölümüne de sebep olabilir. Sağkalım ve ölüm arasındaki bu ikilemin otofajinin kapsamı ve süresi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [38]. Becn1 geninin veya otofajinin diğer bazı bileşenlerinin etkisizleştirilmiş alellerini taşıyan farelerde kansere karşı duyarlılığın arttığı gözlenmiştir [39,40]. Bu sonuçlar, otofajinin, apoptozis ile bağımsız veya birlikte çalışabilen tümörigeneze karşı bir engel görevi görebileceğini göstermektedir [5]. Aynı zamanda, kıtlık, radyoterapi ve bazı sitotoksik ilaçlar, bu stres indükleyici durumlarda hücre ölümüne sebep olmaktan ziyade, kanser hücreleri için sitoprotektif olan yüksek düzeyde otofaji meydana getirebilir [40-42]. Dahası, aşırı stres altındaki kanser hücrelerinin, otofaji yoluyla geri dönüşümlü bir uyku hali durumuna çekildiği gösterilmiştir. Bu sağkalım tepkisi, güçlü antikanser ajanlarla tedaviyi takiben bazı geç evre tümörlerin kalıcılığını ve nihayetinde yeniden büyümesini sağlayabilir [40,43].

2.3 Doksorubisin

Doksorubisin (Şekil 2.4), ilk olarak, 1969 yılında *Streptomyces peucetius* kültüründen izole edilmiştir [44]. Tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde verilen en güçlü anti-neoplastik ilaçlardan biridir ve sınıfının en geniş aktivite spektrumuna sahip bileşiğidir [45]. Buna karşın, yüksek kardiyotoksisite göstermesi bu ajanın kullanımını büyük ölçüde sınırlamaktadır [46]. Doksorubisin'in kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizması, malign hücrelere pasif difüzyonuyla başlar. Hücre içinde, bir yarı kinona dönüştürülerek serbest radikal oluşumuna ve oksidatif

strese neden olan reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir. Ayrıca, mitokondri içine girerek DNA hasarına ve enerjisel strese neden olur. Sonuç olarak, mitokondriden sitokrom c proteini salınır ve kaspaz kaskadı tetiklenerek hücre ölümüne neden olur. Doksorubisin daha sonra çekirdeğe aktarılaraq çift zincirli DNA sarmalı arasına girer, topoizomeraz I ve II enzimlerini inhibe eder ve sonucunda DNA’da oluşan hasar ROS oluşumuna, alkilasyona ve p53 yolağının aktivasyonuna yol açarak hücre çoğalmasını önleyerek apoptozisi indükler. Doksorubisin ayrıca poli ADP riboz polimeraz (PARP) aktivasyonunu artırır ve hücrenin enerjisini tüketerek otofajiye neden olur [46].



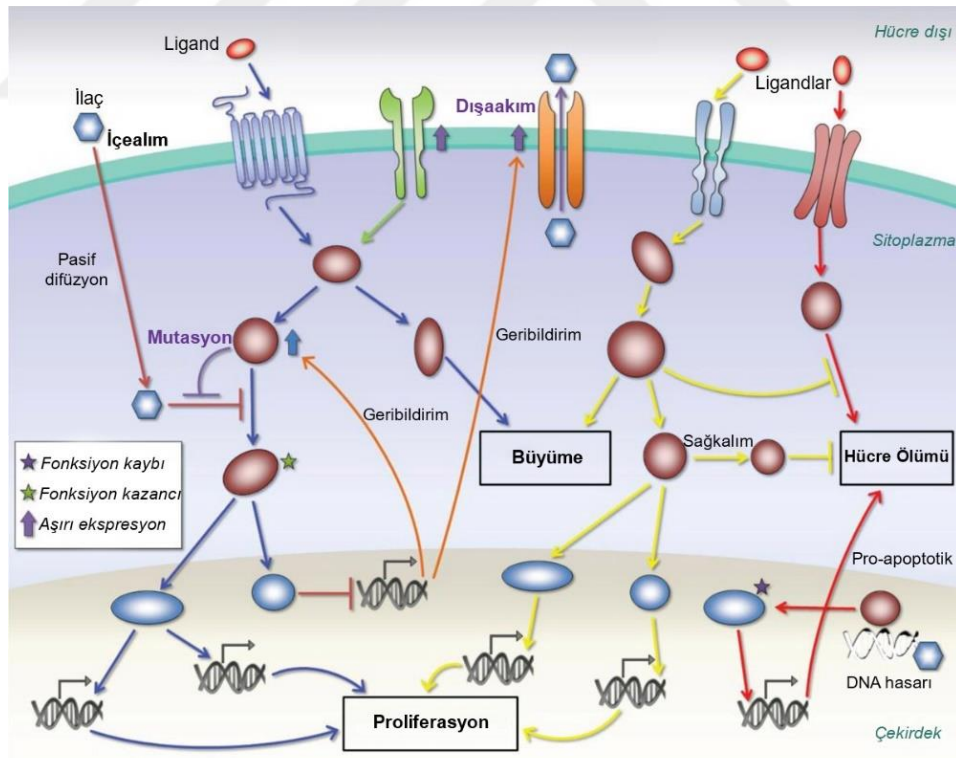
Şekil 2.4: Doksorubisin’in yapısı [45].

2.4 Çoklu İlaça Dirençlilik

İlaça dirençlilik, hedefin tedaviye karşı direnç göstermeye başlaması ile kazanılır. Tümör hücrelerinde ise ilaca dirençlilik kademeli olarak gelişir [47]. Zamanla, hücreler arasında, büyüme, apoptozis, morfoloji ve genetik dengesizlik yönünden farklılıklar içeren heterojen bir tümör kitlesinde dirençli bir popülasyonun seçilimi ile ilaca dirençlilik gelişir [48,49]. Antikanser ilaçlara karşı direnç, içsel ve edinilmiş direnç olmak üzere iki sınıfa ayrılır. İçsel direnç, tümör kitlesindeki hücrelerin tedaviyi etkisiz hale getiren faktörlere sahip olduğunda gelişir. Edinilmiş direnç ise, başlangıçta tedaviye karşı hassas olan ve tedavi sırasında ortaya çıkan mutasyonların yanı sıra terapötik hedefin artan ifadesi ve alternatif telafi edici sinyal yollarının aktivasyonu, epigenetik değişimler, hücre döngüsü ve kontrol noktalarındaki değişimler gibi çeşitli tepkiler sayesinde kazanılır (Şekil 2.5) [48,50].

Her canlı organizma, genomu içinde çoklu ilaç direnci (MDR) ailesinin birçok üyesini barındırır ve bunlar sadece ilaç dışı akımını değil, besinleri ve diğer biyolojik olarak önemli moleküllerin plazma ve hücre içi zarlardan geçmesini de sağlarlar [51].

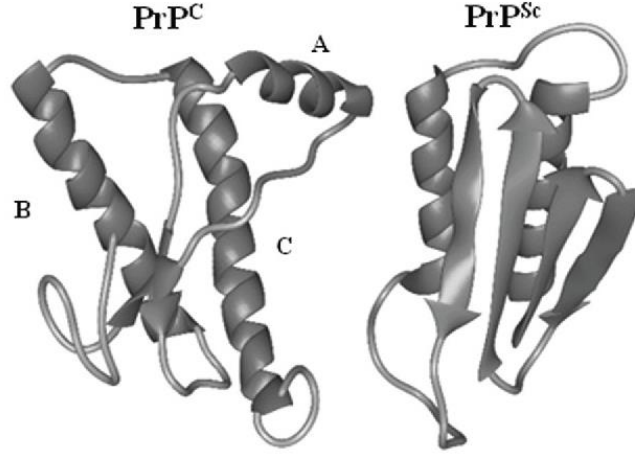
Çoklu ilaca dirençlilik ile ilişkili olan ve ilaç dışaakımını sağlayan en önemli hücre zarı taşıyıcı ailesi ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı ailesidir. Bu ailenin toplamda 49 üyesi vardır ancak, sadece üçü çoklu ilaç direnci (MDR) alanında yoğun olarak çalışılmıştır. Bunlar çoklu ilaca dirençli protein 1 (MDR1; P-glikoprotein ve ABCB1 olarak da bilinir), MDR ile ilişkili protein 1 (MRP1; ABCC1 olarak da bilinir) ve meme kanseri direnç proteini (BCRP; ABCG2 olarak da bilinir). Üçü de geniş, örtüşen substrat spesifikliğine sahiptir ve taksanlar, topoizomera inhibitörleri ve anti-metabolitler gibi ana kanser kemoterapötikleri de dahil olmak üzere çeşitli hidrofobik bileşiklerin ortadan kaldırılmasını sağlar [48]. Genel olarak mekanizma, ilacın ABC ailesinin bir üyesine bağlanması, ATP bağlayıcı bölgelerden birinin aktivasyonu ile ATP'nin hidrolizi ve konformasyonel değişim sonrasında ilacın hücre dışı boşluğa atılması şeklinde ilerler. İkinci bir ATP'nin hidrolizi, taşıyıcıyı orijinal durumuna geri döndürür ve böylece işlem tekrarlanabilir [51]. P-glikoprotein, ayrıca, kanser hücrelerinde metastatik özelliğin kazanılmasında rol oynayan bir başka glikoprotein olan CD44 ile yakından ilişkilidir ve birlikte ifadelenir [52].



Şekil 2.5: İlaç dirençliliğinin ortaya çıkışında izlenen mekanizmaların şematize edilmiş hali. İçsel direnç sırasında ilaca tepki olarak, geribildirim yoluyla, hedef proteinin ve taşıyıcı proteinlerin ekspresyonu artar. Kazanılmış direnç sırasında hedefte gözlenen mutasyon ve ekspresyon artışının yanı sıra, mikro çevredeki değişimler, epigenetik değişim, fonksiyon kaybı ve kazancı mutasyonları sayesinde hücre ölümünden kaçılır ([53] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

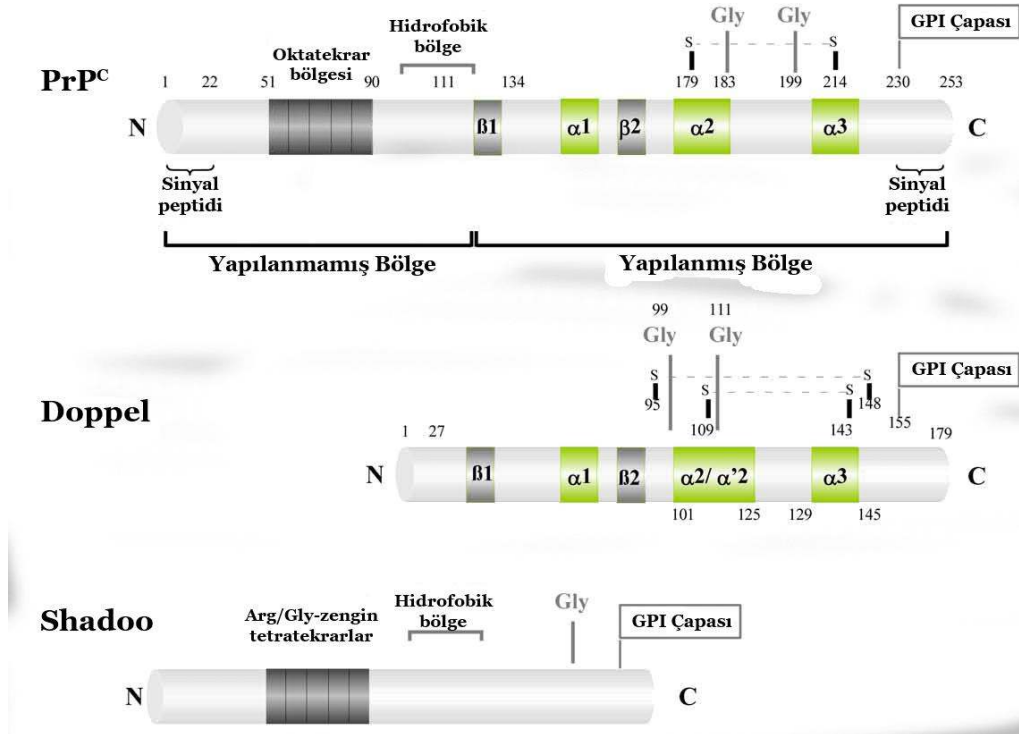
2.5 Prion Proteini

Prion, Stanley Prusiner tarafından “**proteinimsi bulaşıcı parçacık**” için kullanılan bir kısaltmadır. Hücresel prion proteini (PrP^{C}), *Prnp* geni tarafından kodlanır ve bir sinyal peptidi, PHGGGWGQ sekansının oktapeptit tekrarı, yüksek oranda korunmuş bir hidrofobik alan, üç α -sarmal yapısı, iki β -tabaka yapısı ve glikozilfosfatidilinositol (GPI) çapa için bir sinyal sekansı içerir. PrP^{C} , zardaki kolesterolce zengin lipit raftlarında bulunur. N-bağlı glikozilasyon için iki konsensüs sekansı içerir ve PrP^{C} 'nin glikozile olmamış, mono ve di-glikozile edilmiş versiyonları hücrede aynı anda bulunur. Proteinin düzgün bir şekilde katlanması için Cys 179 ve Cys 214 arasındaki bir disülfid bağı esastır. Oktapeptid tekrar bölgesi ise, birkaç nedenden dolayı dikkate değerdir. İlk olarak oktatekrar içinde yer alan dört bakır bağlama bölgesi ile bakır bağlama yeteneğine sahiptir ve bakırın, PrP^{C} 'nin endositozunu indüklediği bilinmektedir. İkincisi, oktatekrar bölgesinin genişlemesi genetik prion hastalığına neden olur [54]. PrP^{C} 'nin, konformeri olan scrapie prion proteine (PrP^{Sc}) dönüşmesi ise birtakım hastalıklara neden olur. PrP^{C} çoğunlukla α sarmal içerirken yanlış katlanma sonucu β tabaka zengini PrP^{Sc} 'ye dönüşür ve protein kinazlara karşı dirençli olan bu formu hücre içinde birikerek çeşitli hastalıklara neden olur [55]. Bu hastalıklar, Creutzfeldt-Jakob hastalığı (CJD), Gerstmann-Sträussler sendromu (GSS), kuru ve ölümcül ailesel insomnia (FFI), insanlarda scrapie ve sığır süngerimsi ensefalopatisini içeren bir bulaşıcı nörodejeneratif hastalık grubudur [56]. PrP^{C} , tüm omurgalılar arasında yüksek oranda korunmasına rağmen memeliler ve memeli olmayan canlılar arasında dizi benzerlikleri düşüktür [7]. Prion, beyinde yüksek seviyelerde eksprese edilir. Ayrıca, lenfoid hücreler, akciğer, kalp, böbrek, gastrointestinal sistem kasları ve meme bezleri gibi çeşitli organlarda da ifadelenir [57].



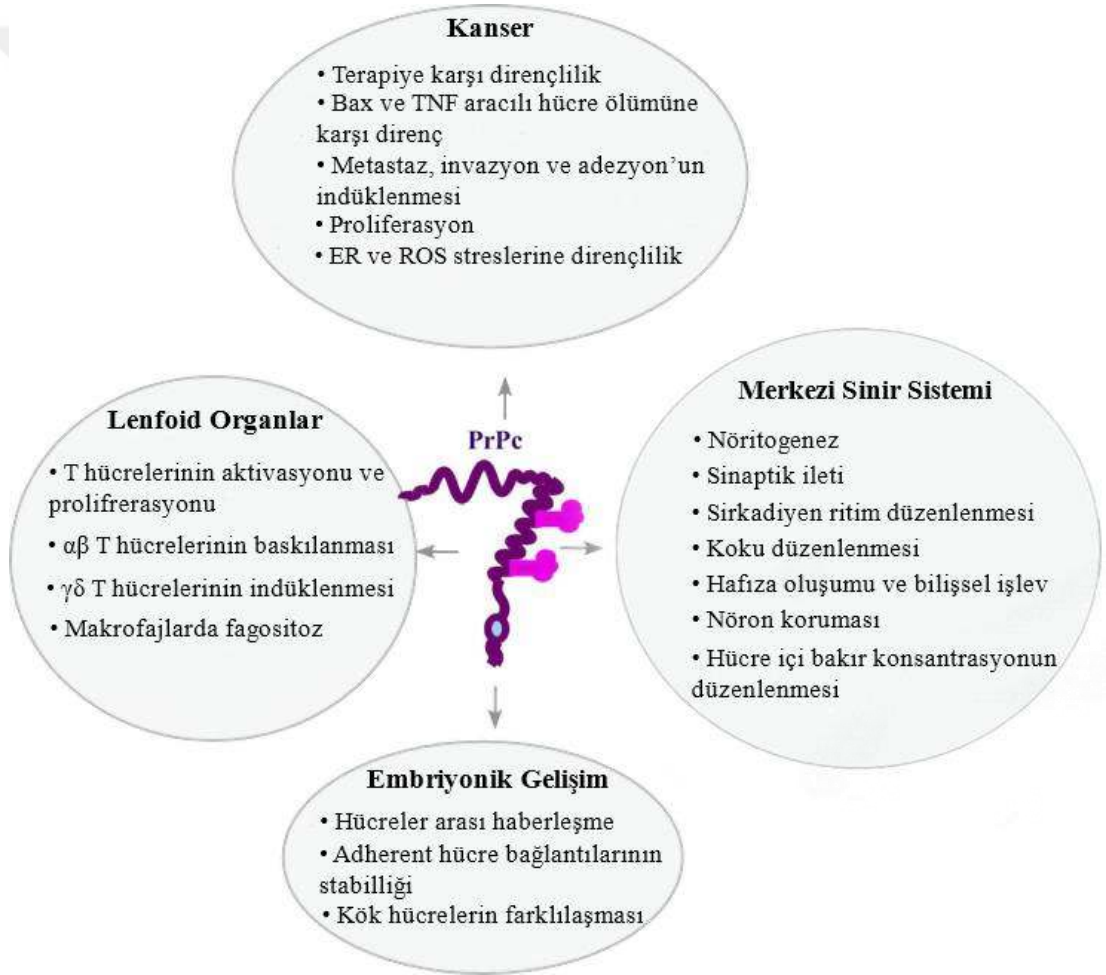
Şekil 2.6: PrP^C ve PrP^{Sc} üçüncül yapıları [58].

Prion gen ailesi, *Prnp*, *Prnd*, *Prnt* ve *Sprn* olmak üzere dört üyeden oluşur (Şekil 2.7) [7]. *Prnd*, hem yapısı hem de topolojisi açısından *Prnp*'ye benzerlik gösteren Doppel'i kodlar. *Prnt* ise, üç alternatif ekleme transkriptini kodlar ve sadece yetişkin testislerinde eksprese edilir. Bu genin bir protein kodlamadığı düşünülmektedir. SPRN (Shadoo), Prion genomik lokusunun bir parçası değildir, ancak sırasıyla fareler ve insanlarda 7. ve 10. kromozomlar üzerinde bulunur. *Sprn* ekspresyonu beyin ile sınırlıdır [54].



Şekil 2.7: Prion ailesi proteinlerin sekonder yapıları ([54] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

PrP^C'nin şimdiye kadar önerilmiş çeşitli fonksiyonları arasında; oksidatif stres, bağışıklık modülasyonu, farklılaşma, bakır gibi metallerin translokasyonu, hücre adezyonu ve transmembran sinyalleme yer almaktadır (Şekil 2.8) [54,59-63]. PrP^C'nin hücreleri oksidatif strese karşı nasıl koruduğu ise belirsizliğini korumaktadır. Bir olasılık, PrP^C'nin kendisinin Süper Oksit Dismutaz (SOD) aktivitesine sahip olması ve böylece antioksidan fonksiyonuna aracılık etmesidir [54]. Ancak bu olasılığı kabul etmeyen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar da bulunmaktadır [64,65]. İkinci bir hipotez, PrP^C'nin, ROS'u detoksifiye eden Cu²⁺-Zn²⁺ SOD veya glutatyon redüktaz gibi diğer proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücreleri oksidatif strese karşı dolaylı olarak etkileyebilmesidir [54,66].



Şekil 2.8: PrP^C'nin rol aldığı fizyolojik olaylar [54,67].

2.5.1 Prion Proteini ve Programlı Hücre Ölümü

PrP^C'nin hücre ölüm tipleri ile yakından ilişkili olduğuna dair çeşitli kanıtlar mevcuttur [7]. Yapılan çalışmalar PrP^C'nin mitokondride kaspaz bağımlı apoptotik yollar üzerinden hareket eden önemli bir apoptotik protein olduğunu göstermiştir [68]. Örneğin, aşırı miktarda PrP^C eksprese eden transgenik farelerde prion proteini mitokondride lokalize olmakta ve nöronal apoptozise neden olduğu ileri sürülmektedir [69]. PrP^C'nin mitokondriyal lokalizasyonu mitokondriyal membran potansiyeli kaybına, sitokrom *c* salınımına ve kaspaz 3 aracılı apoptozise neden olmaktadır [70]. Öte yandan son çalışmalar PrP^C'nin Bax-aracılı nöronal apoptozise karşı bir direnç gösterdiğini ortaya koymuştur [71,72]. Yabani tip ve PrP^C noksan farelerin hipokampal nöronlarından türetilen hücre hatlarında, serum yoksunluğunda PrP^C eksikliği çeken hücreler hızlı bir şekilde ölmüş, ancak yabani tip hücreler serum yoksunluğuna dayanabilmiştir [9]. PrP^C, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik Bax ve Bak üyelerinde bulunan Bcl-2 homoloji alanı 2 (BH2) ile önemli bir amino asit dizisi benzerliği taşır. PrP^C'nin pro-apoptotik protein Bax'ın aktivasyonu için gerekli konformasyonel anahtarı inhibe ettiği, böylece apoptozise aracılık etmek için gerekli olan yüksek dereceli Bax oligomerleri ve mitokondriyal dış zar potansiyelini bozduğu bulunmuştur. Diğer yandan, PrP^C'nin azalan ekspresyonu Bcl-2 ekspresyonunun azalmasına neden olurken, Bcl-xL ve Mcl-1 gibi diğer hayatta kalma yanlısı Bcl-2 aile üyelerini etkilememiştir [57]. Bununla birlikte PrP^C, Bax aracılı apoptozisi inhibe edebilir, ancak Bak veya tBid aracılı apoptozisi inhibe edemez [10]. Yapılan çalışmalar PrP^C'nin aynı zamanda TRAIL aracılı hücre ölümünü inhibe ettiğini ve susturulması ile hücrelerin hassaslaştığı göstermiştir [73,74].

Prion proteininin otofaji ile ilişkisi çeşitli patolojik durumlarda gözlenmiştir. Deneysel olarak TSE oluşturulmuş kemirgen nöronlarında ve scrapie prion ile enfekte kültüre hücrelerde otofajik vakuoller gösterilmiştir [75,76]. Prion hastalıklarına ek olarak, PrP noksan farelerin (Zürich I *Prnp*^{0/0}) hipokampal nöronlarında yabani tipe göre artmış LC3-II (otofajik belirteç olan bir protein) ekspresyonu ve otofagozom birikimi tespit edilmiştir [77]. H₂O₂ ile muamele edilmiş *Prnp*^{-/-} hücrelerde otofajik akış bozulma gösterirken, yabani tip hücrelerde gelişmiş bir otofajik akış gözlenmiştir [78]. Başka bir çalışmada ise PrP^C eksikliği sonucunda bozulan otofajik akış dolayısı ile otofagozom ve lizozom birleşmesinin inhibe olduğu ve materyallerin sindirilemediği gösterilmiştir [79]. Bununla birlikte, T98G insan glioma hücrelerinde,

PrP^C'nin susturulması, LC3-II, Beclin-1'in upregülasyonu ve eşzamanlı bir p62, Bcl-2 ve fosforile edilmiş 4E-BP1 azalması sonucunda otofajiye bağlı hücre ölümüne yol açmıştır [8]. Ek olarak, PrP^C'nin amiloid β_{42} indüklenen strese karşı Beclin-1 ile etkileşerek otofajinin aktivasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir [80]. Bu çalışmalar, PrP^C'nin otofajinin düzenlenmesi ve normal olarak işlev görmesinde önemli bir rol oynadığını açıkça göstermektedir.

2.5.2 Prion Proteini ve Kanser

Prion'un hücre adezyonu, göç, çoğalma, farklılaşma, iyon homeostazı ve sinyal iletimi gibi fonksiyonlarındaki değişimlerin tümör oluşumunda rol oynayabileceği gösterilmiştir [7]. Bu sebeple PrP^C, birçok kanserde protein seviyesinde yüksek oranda eksprese edilir [57]. PrP^C'nin sinyal yollarının düzenlenmesindeki rolü, kanser metastazı için oldukça önemlidir. PrP^C'nin aşırı ekspresyonu, PI3K/Akt fosforilasyonu ve Akt yolunun aktivasyonu ile mide kanseri hücre hatlarında adhesif, istilacı ve *in vivo* metastatik fenotipini önemli ölçüde destekler. Ayrıca, aktive edilmiş Akt'ın MAP kinaz ERK1/2'yi fosforile ettiği ve böylece mide ve pankreas kanseri hücrelerinde matriks metalloproteinaz 11'in (MMP11) artmış ekspresyonunu teşvik ettiği bilinmektedir [57,81]. Kolorektal kanserlerde ise PrP^C'nin susturulması ile kanser kök hücrelerinde tümörigenez kapasitesi ve metastaz baskılanmış ve PrP^C'nin epitelden mezankimale geçişi (EMT) desteklediği gösterilmiştir [82]. Aynı zamanda, kanser hücrelerinde ER stresine bağlı olarak *Prnp* ekspresyonunun arttığı ve hücre ölümünün geciktiği gözlenmiş ve PrP^C'nin ER stresine karşı sağkalımı desteklediği gösterilmiştir [83,84]. Pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC) ve melanoma hücrelerinde ise PrP^C'nin GPI-sinyal dizisi ile birlikte bulunduğu (pro-PrP) ve bu dizi sayesinde filamin A'ya (FLNa) bağlanarak *in vivo* ve *in vitro* 'da tümör hücrelerini daha agresif ve istilacı hale getirdiği rapor edilmiştir [85,86]. Bir başka çalışmada, TNF α ile tetiklenen NF- κ B sinyalleşmesi ve TNF α üretimi için PrP^C ekspresyonunun gerekli olduğu bulunmuş ve PrP^C'nin, enflamasyona ve tümörigeneze katkıda bulunabilecek proinflamatuvar sitokin üretimini teşvik ederek TNF α 'ya verdiği yanıtları arttırdığı gösterilmiştir [87].

PrP^C'nin tümör hücrelerinde oksidatif stres için serbest radikal temizleyici ve/veya sensör molekülü olarak hareket edebileceği öne sürülmüştür. Bir çalışmada, glioma tümör sferoidlerinde büyüme faktörleri ve TNF- α ile tedavinin, hücre içi ROS seviyesindeki yükselmenin bir sonucu olarak PrP^C'nin arttığını göstermiştir. PrP^C'nin

artması, hücrelerin antioksidan kapasitesini arttırmak ve oksidatif stres ile rekabet etmek için bir stres tepkisi olarak ortaya çıktığı söylenebilir [54,88]. PrP^C'nin aşırı ekspresyonu, anti-kanser ilaçlara karşı doğal direnç geliştirilmesine neden olurken, PrP^C'nin baskılanması veya azalan ekspresyonu, anti-kanser ilaçlara karşı duyarlılığa neden olur [54,89-91]. Son zamanlarda, PrP^C'nin P-glikoprotein ile etkileşime girdiği ve meme kanseri hücrelerinde ilaç direnci için gerekli olduğu gösterilmiştir [92]. Ayrıca, memeli prionlarına karşı etkili olan anti-prion ilaç klorpromazinin, kanser hücrelerinde iyonlaştırıcı radyasyona ve anti-tümör ilaçlarına direnç gelişimini önlediği gösterilmiştir [57].



3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmada kullanılan materyaller, cihazlar ve sarf malzemeleri aşağıdaki tablolarda listelenmiştir (Tablo 3.1 ve 3.2).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan materyaller.

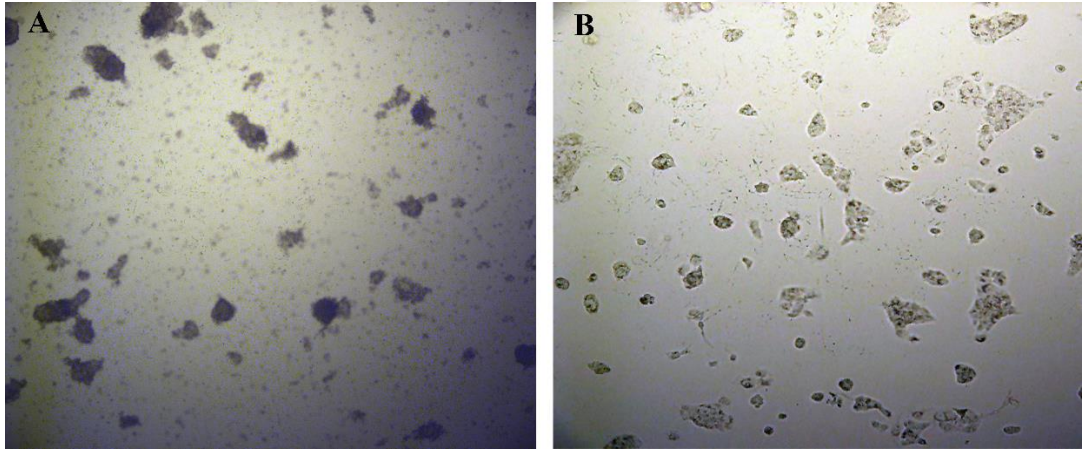
Materyaller	Katalog Numarası	Üretici Firma
PrP siRNA	AM16708	Ambion
RealQ Plus 2X Master Mix Green	A323402	Ampliqon
H69	HTB-119	ATCC
H69AR	CRL-11351	ATCC
RPMI-1640	30-2001	ATCC
Agaroz	AGA001	BioShop
FBS	A3840002	Gibco
Penisilin-Streptomisin	15070063	Gibco
%0,25 Trypsin-EDTA	25200-072	Gibco
Opti-MEM	31985062	Gibco
PBS	10010023	Gibco
L-Glutamine	25030081	Gibco
Lipofektamin RNAi Max	13778150	Invitrogen
Tripan mavisi	T8154	Sigma
MTT	M5655	Sigma
Doksorubisin hidroklorit	D1515	Sigma
DMSO	276855	Sigma
GeneJet RNA Purification Kit	K0731	Thermo Scientific
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	K1622	Thermo Scientific
RiboRuler High Range RNA Ladder	SM 1821	Thermo Scientific
DPEC-treated Water	R0601	Thermo Scientific
50X TAE Buffer	BE 10	TİBO

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri.

Cihazlar ve Sarf Malzemeleri	Üretici Firma
Pipetörler (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf, ABD
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Santrifüj	Hettich, Almanya
Hücre Sayım Cihazı	Invitrogen, ABD
Laminar Hava Akımlı Sınıf II Kabin	Metisafe, Türkiye
CO ₂ İnkübatör	NuAire, ABD
Hücre Kültür Flaskları (25, 75 cm ²)	Orange Sci. Belçika
Hücre Kültür Plakaları (6, 24, 96 kuyucuklu)	Orange Sci. Belçika
Steril Serolojik Pipet (1, 5, 10, 25 ml)	Orange Sci. Belçika
Konik Tüp (15, 50 ml)	Orange Sci. Belçika
Mikroplaka Okuyucu	Tecan, İsviçre
Real Time PCR	Thermo Scientific
Spektrofotometre	Thermo Scientific
Inverted Mikroskop	ZEISS, Almanya

3.2 Hücre Hatlarının Temini ve İdamesi

İnsan küçük hücreli akciğer karsinoma hücre hatları (Small Cell Lung Carcinoma: SCLC) H69 (HTP-119TM) ve H69AR (CRL-11351TM) American Type Culture Collection (ATCC[®], ABD) firmasından temin edilmiştir (Şekil 3.1). NCI-H69 [H69], IGF II reseptör ekspresyonunun yanı sıra yüksek seviyede *N-myc* ekspresyonu gösterir [93,94]. Ancak, *c-myc* ifadenmesi sadece mRNA düzeyindedir [95]. NCI-H69AR [H69AR] ise, H69 hücrelerinin 14 ay boyunca Doksorubisinin artan konsantrasyonlarında seçilmesi ile elde edilen, ilaca dirençli hücre hattıdır. H69'a göre hücre-hücre adezyonu daha fazla olsa da *in vitro* büyüme hızı ve farede tümör oluşturma potansiyeli benzerdir [96]. H69AR hücrelerinde çoklu ilaç direnci proteinleri (MRP) yüksek seviyede ifade edilirken gelişmiş bir p-glikoprotein ifadenmesi göstermez [96,97].



Şekil 3.1: H69 (A) ve H69AR (B) hücrelerinin inverted mikroskop altındaki görüntüsü. H69 süspansiyeli ve kümelenmiş bir halde bulunurken H69AR adesif özellik taşır.

Hücre kültür işlemleri, çalışma öncesi UV ile sterilize edilen ve ardından alkol ile temizlenen laminar hava akımlı sınıf II biyogüvenlik kabinlerinde gerçekleştirildi. Teslim alınan hücreler 37°C su banyosunda çözündürüldü ve ardından 9 ml besiyeri ile birlikte santrifüjlendi. Oluşan pelet 5 ml besiyeri ile çözündürülerek 25 cm²'lik filtreli hücre kültür flaskına alındı. Hücreler, L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyerine %0,5 Penisilin-Streptomisin ve H69 için %10, H69AR için %20 FBS eklenerek 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde (NuAire, ABD) çoğaltıldı. Hücreler, inverted mikroskop altında canlılık, çoğalma ve kontaminasyon yönünden gözlemlendi ve %60-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanarak yeni flasklara aktarıldı. Hücrelerin dondurulması için %95 FBS ve %5 DMSO ile hazırlanan dondurma ortamı kullanıldı ve hücreler -80°C veya sıvı nitrojen tankında saklandı.

3.3 Hücrelerin Sayımı

Tripan mavisi ile müdahale edilen hücreler canlı ise membran bütünlüğü bozulmadığı için hücrenin etrafı boyanır. Ölü hücrelerde ise bu bütünlük bozulduğu için boya hücre içerisine girerek hücrenin tamamını boyar. Bu şekilde canlılık hesabı için hücreler 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırılırdı ve otomatik sayım cihazında (Countess, Invitrogen, ABD) hücre sayımı yapıldı.

3.4 Kimyasalların Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Doksorubisin: 10 mg toz Doksorubisin (Sigma, ABD) 17,242 ml DMSO içerisinde çözülerek 1 mM'lik stok solüsyon hazırlandı. Daha sonrasında sterilizasyon için 0,22 µm'lik filtreden geçirilen çözelti 100 µl'lik alikotlar halinde -20°C'de saklandı.

DNaz I 10X Reaksiyon Tamponu (pH: 7,5): 4 ml nükleaz-free su içinde 63,04 mg Tris-HCl (100 mM), 9,52 mg MgCl₂ (25 mM) ve 0,45 mg CaCl₂ (1 mM) çözündürülerek hazırlandı.

50 mM EDTA: 10 ml ultra saf su içinde 186,12 mg EDTA çözündürülerek hazırlandı.

3.5 Deney Gruplarının Oluşturulması

Her bir hücre hattı için 4'er grup oluşturuldu (Tablo 3.3). Kontrol grubu için hiçbir uygulama yapılmadı. Doksorubisin grubu için Doksorubisin IC₅₀ dozu ile 48 saat inkübe edilen hücre kültürleri kullanıldı. PrP^C siRNA grubu için siRNA ile 48 saat boyunca inkübe edilmiş hücre kültürleri kullanıldı. Doksorubisin ve PrP^C siRNA grubu için hücreler siRNA ile en az 12 saat muamele edildikten sonra Doksorubisin IC₅₀ dozu ile 48 saat inkübe edildi.

Tablo 3.3: Tasarlanan deney grupları ve bu çalışmada kullanılan kısaltmaları.

Hücre Hattı	Uygulama	Kısaltma
H69	Kontrol	H-k
	Doksorubisin IC ₅₀	H-d
	PrP ^C siRNA	H-s
	Doksorubisin IC ₅₀ + PrP ^C siRNA	H-ds
H69AR	Kontrol	HR-k
	Doksorubisin IC ₅₀	HR-d
	PrP ^C siRNA	HR-s
	Doksorubisin IC ₅₀ + PrP ^C siRNA	HR-ds

3.6 MTT Canlılık Ölçüm Testi

Canlı hücrelerin kantitatif analizi genellikle MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-yl]2,5-difeniltetrazolyum bromit) gibi tetrazolyum tuzlarının formazan boya oluşturma prensibi ile yapılır. MTT testi hücre canlılığını radyoizotop kullanmaksızın spektrofotometrik olarak belirlenmesine olanak sağlar. MTT canlılık testi, Doksorubisin'in IC₅₀ dozunun belirlenmesinde kullanılmıştır.

IC₅₀ dozunun belirlenmesi için Doksorubisin'in 100 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM ve 0,01 µM'lık seri dozlar kullanıldı. MTT testi için ilk gün 96 kuyucuklu plakalara 100'er µl 1x10⁵ derişiminde hücre ekildi. İkinci gün belirlenen dozlarda Doksorubisin 3'er tekrarlı olarak 100 µl eklendi ve inkübatöre (%96 nem, %5 CO₂, 37°C) kaldırılan hücreler 48 saat bekletildi. Geçen 48 saatin sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT boyası eklendi inkübatöre kaldırıldıktan sonra 4 saat beklendi. Daha sonrasında santrifüjlenerek süpernatant çekildi ve her bir kuyucuğa 200 µl DMSO konuldu. Renk oluşumu için çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandıktan sonra mikro plaka okuyucuda 570 nm absorbands değerinde ölçüm yapıldı. Kör olarak 3'er tekrarlı olarak 200 µl DMSO kullanıldı.

Aşağıdaki formül ile hesaplanan canlılık yüzdeleri GraphPad Prism (Ver. 6.0) programına girilerek Doksorubisin'in IC₅₀ değeri hesaplandı. Bu değer daha sonraki uygulamalar için baz alındı.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{İlaçlı Kuyucukların Absorbans Ortalaması} - \text{Kör}) / \text{Pozitif Kontrol Kuyucuklarının Absorbans Ortalaması} - \text{Kör} \times 100$$
 formülü ile hesaplandı.

3.7 PrP^C'nin siRNA Transfeksiyonu ile Susturulması

RNA interferans, ökaryotik hücrelerde korunmuş bir yolaktır. RNAi sürecinde, çift zincirli küçük interferans RNA (siRNA) RNA-indüklenen susturucu kompleks (RISC) tarafından tanınır. siRNA'nın antisens zinciri homolog diziyi bulunduran hedef mRNA'ya bağlanır ve RISC içindeki Ago2 proteini mRNA'nın bozunmasını sağlar. Böylece, mRNA'nın transkripsiyonu inhibe edilir [98]. Bu yolak ile hedef genin baskılanması yöntemi ilk olarak Elbashir ve ark. tarafından 2001 yılında kullanılmış [99] ve günümüzde de laboratuvar çakışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Transfeksiyon, üretici firmanın önerdiği yöntem doğrultusunda, Lipofectamine™

RNAiMAX (Invitrogen™, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi ve süspanse özellikteki H69 hücre hattı için “reverse”, adherent özellikteki H69AR hücre hattı için “forward” transfeksiyon yöntemleri izlenmiştir.

3.7.1 Forward Transfeksiyon

1. Bir gün sonra %30-50 konfluent olacak şekilde 2,5 ml hücre 6 kuyucuklu platelere ekildi.
2. 5 µl Lipofektamin, son hacmi 250 µl olacak şekilde Opti-MEM medyum içinde seyreltildi.
3. 30 pmol dizayn edilmiş RNAi¹ çifti (Silencer® Pre-designed, Validated, and custom Designed siRNA, Ambion, part number: AM16708), son hacmi 250 µl olacak şekilde Opti-MEM medyum içinde seyreltildi.
4. Seyreltilmiş Lipofektamin ve RNAi birbirlerine eklendi ve hafifçe karıştırıldıktan sonra 10-20 dakika inkübe edildi.
5. Hücreler, bu karışım üzerlerine eklendikten sonra 24-48 saat 37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

3.7.2 Reverse Transkripsiyon

1. Plate içinde 30 pmol RNAi çifti 500 µl Opti-MEM içinde seyreltildi.
2. 5 µl Lipofektamin karışım üzerine eklenerek oda sıcaklığında 10-20 dakika inkübe edildi.
3. Bir gün sonra %30-50 konfluent olacak şekilde 2,5 ml hücre platelere ekildi. Süspanse hücreler için 2-5.10⁴ hücre kullanıldı.
4. Hücreler 24-72 saat 37°C’de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

3.8 RNA’nın İzolasyonu

RNA izolasyonu GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific™, ABD) ile yapıldı. RNA izolasyonu, üretici firmanın belirlediği protokolü temel alınarak gerçekleştirilmiş ve aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. 1 x 10⁷ hücre 5 dakika 250 x g’de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı.
2. Hücreler 600 µl Lysis Buffer ile resüspanse edildi ve 10 sn. vortekslendi.

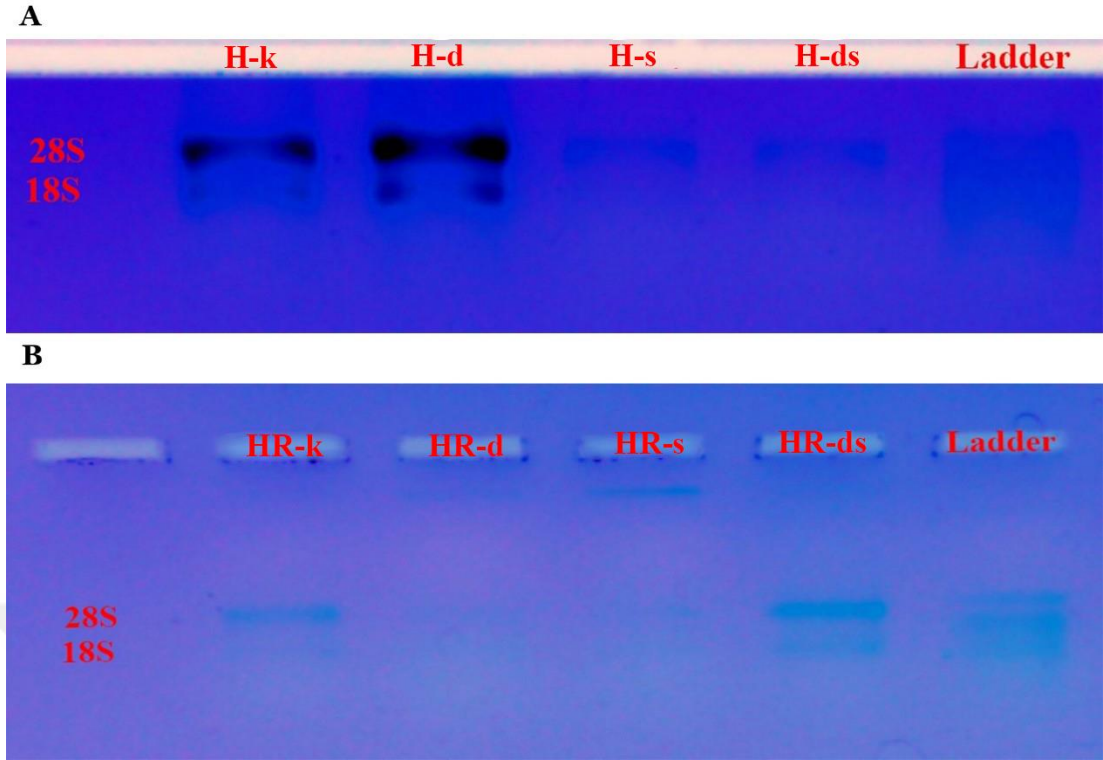
¹ RNAi dizisi: ggcagcugaaaaguuuu (siRNA ID #: 8299)

3. Ardından 360 µl etanol (%96-100) eklenerek pipetleme yapıldı.
4. 700 µl hücre lizati, toplama tüpüne yerleştirilmiş saflaştırma kolonuna aktarıldı ve kolon 1 dakika, en az 12000 x g'de santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı ve saflaştırma kolonu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Tüm lizat kolona transfer oluncaya kadar işlem tekrarlandı. Son olarak kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
5. 700 µl Wash Buffer 1 kolona aktarıldı ve en az 12000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Ardından toplama tüpü boşaltıldı ve saflaştırma kolonunu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
6. 600 µl Wash Buffer 2 kolona aktarıldıktan sonra kolon 1 dakika, en az 12000 x g'de santrifüj edildi ve toplama tüpü boşaltılarak saflaştırma kolonunu tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
7. 250 µl Wash Buffer 2 kolona aktarıldı ve kolon 2 dakika, en az 12000 x g'de santrifüj edildi.
8. Kolon membranının merkezine gelecek şekilde 50 µl nukleaz-free su eklendi ve 1 dakika, en az 12000 x g'de santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha edilerek RNA izolasyonu tamamlanır.

İzole edilen RNA'lar 20 µl'lik alikotlar halinde -80°C ve -20°C derin donduruculara kaldırıldı. -20°C'de muhafaza edilen RNA'nın miktarını ve kalitesini belirlemek amacıyla spektrofotometrede (Nanodrop™ 2000C, Thermo Scientific™, ABD) analizi yapıldı. A260/A280 oranları 2,0-2,1 arasında olan RNA'lar sonraki aşamalar için kullanıldı.

3.9 RNA Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen RNA'ların kalitatif analizi %1'lik denatüre edici agaroz jelde yapıldı. 1X TAE tamponu ile hazırlanmış jelde denatüre edici ajan olarak %1 çamaşır suyu kullanıldı [100]. Marker olarak RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Scientific™, ABD) kullanıldı. Örnekler, yükleme yapılmadan önce Ladder içerisinde bulunan yükleme boyası ile 1/1 oranında karıştırılarak 70°C'de 10 dakika boyunca denatüre edildi ve buz üstüne alınarak jele yüklendi. 40V'de yaklaşık 45 dakika boyunca yürütüldükten sonra jel görüntülendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: H69 (A) ve H69AR (B) örneklerinden elde edilen RNA'ların agaroz jel görüntüleri.

3.10 cDNA'nın Sentezlenmesi

cDNA sentezi RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™, ABD) ile yapıldı. cDNA sentezi, üretici firmanın belirlediği protokolü temel alınarak gerçekleştirilmiş ve aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. RNA örnekleri içindeki genomik DNA'ların uzaklaştırılması için DNaz I uygulandı. Bunun için H69 için 950 ng, H69AR için 605 ng RNA tüplere eklendi. Ardından 1'er µl DNaz I ve 10X Reaksiyon Tamponu eklenerek son hacim nükleaz-free su ile 10 µl'ye tamamlanarak 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
2. DNaz I aktivitesinin durdurulması için 1 µl 50 mM EDTA eklenerek 10 dakika boyunca 65°C'de inkübe edildi ve cDNA sentezi aşamasına geçildi.
3. 10 µl RNA buz üzerindeki nükleaz-free tüplere eklendi. Ardından kitin içinde bulunan 0,5 µl Oligo (dT)₁₈ primer ve 0,5 µl Random hekzamer primer eklenip son hacim nükleaz-free su ile 12 µl'ye tamamlandı.
4. RNA GC-zengin ya da ikincil yapıları içermeye ihtimaline karşı, karışım sonraki aşamaya geçmeden önce 65°C'de 5 dakika inkübe edildi ve buz üzerinde soğutuldu.

5. Tüp içine 4 µl 5X Reaksiyon tamponu, 1 µl RiboLock RNase İnhibitörü, 2 µl 10 mM dNTP Mix ve 1 µl RevertAid M-MuLV RT eklendi.
6. PCR cihazı 25°C’de 5 dakika, 43°C’de 60 dakika ve 70°C’de 5 dakika şeklinde ayarlandı.

İşlem sonucunda elde edilen cDNAlar -80°C derin dondurucuda saklandı.

3.11 Real Time Kantitatif PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR, PikoReal 96 (Thermo Scientific, ABD) cihazında SYBR Green yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla RealQ Plus 2X Master Mix Green (Ampliqon, Danimarka) kullanıldı. PCR reaksiyon karışımı otoklavlanmış 96 kuyucuklu platelerde hazırlandı. Toplamda 4 grup, 1 no template control (NTC), 4 hedef gen ve 1 referans gen (G6PD) ile iki tekrarlı olmak üzere plateler dizayn edildi. Kullanılan primer dizileri Tablo 3.4’de gösterilmiştir.

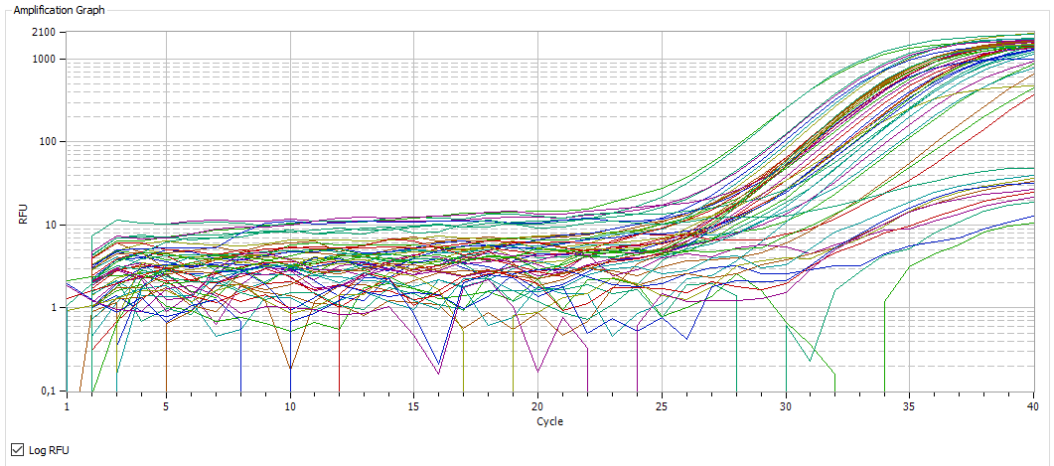
Tablo 3.4: Kullanılan hedef ve referans genlerin primer dizileri.

Gen	Forward	Reverse
<i>Prnp</i>	AGTGGAACAAGCCGAGTAAGC	GTCAGTCCGAAATGTATGATG
<i>Bax</i>	CTTTTGCTTCAGGGTTTCATC	GACACTCGCTCAGCTTCTT
<i>Becn1</i>	AACCAGATGCGTTATGCCCA	CTGTCCACTGTGCCAGATGT
<i>CD44</i>	TGGAGCAAACACAACCTCTG	GCTTTTCTTCTGCCACAC
<i>G6PD</i>	CGGCAACAGATACAAGAACG	AGCAGTGGGGTGAAAATACG

Reaksiyon karışımı son hacim 20 µl olacak şekilde 10 µl RealQ Plus 2X Master Mix, 0,8 µl 5 µM Forward ve Reverse primer, 6,4 µl PCR-grade H₂O ve 2 µl cDNA ile hazırlandı. Plateler hazırlandıktan sonra üzeri adhesive film ile kapatıldı ve PCR cihazına yerleştirildi. Floresan verisi uzama evresinde okunacak şekilde cihaz ayarlandı ve Tablo 3.5’de belirtilen döngü ve adımlar girildi ve floresan veriler elde edildi (Şekil 3.3).

Tablo 3.5: Real Time PCR cihazına girilen döngü ve adımlar.

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	95°C	5 d	1
Denatürasyon	95°C	15 s	
Bağlanma	56,5°C	30 s	40
Uzama	72°C	30 s	
Erime eğrisi	60-95°C	-	-



Şekil 3.3: Real Time PCR sırasında oluşan dsDNA'nın² yaydığı floresan ışımaya verilerinin logaritmik ışımaya/döngü grafiği.

3.12 İstatiksel Analiz

Gen ifadenin analizinde, elde edilen Cq (Ct) verilerinden yararlanılır. Cq, arkaplan floresan seviyesine göre belirlenmiş bir eşik çizgisi ile örneğin amplifikasyon eğrisinin kesiştiği noktaya denk gelen döngü sayısıdır. Bu noktadan sonra örnek, üssel olarak amplifike olmaya başlar. Gen ifadelerinin hesaplanması ve değerlendirilmesinde ise $2^{-\Delta\Delta Cq}$ metodundan faydalanıldı. qRT-PCR sonucunda elde edilen veriler kullanılarak LinReg (versiyon 2017.1) yazılımı ile Cq değerleri saptandı. Yöntem doğrultusunda, hedef gen ile referans gen arasındaki farkı belirleyen ΔCq hem deney hem de kontrol grubu için ayrı ayrı hesaplandı. Her bir deney örneğine ait ΔCq değerlerinin $2^{-\Delta Cq}$ formülü ile üssel dönüşümü yapılarak ekspresyon değerleri bulunduktan sonra $2^{-\Delta\Delta Cq}$ değerini bulmak için her replikanın ortalaması alınarak bu değerler kontrol grubuna bölündü. Böylece ekspresyon değerlerinin kontrol grubuna göre hangi oranda değişim gösterdiği saptandı.

Kullanılan eşitlikler;

$$\Delta Cq = Cq(\text{hedef gen}) - Cq(\text{referans gen})$$

$$2^{-\Delta\Delta Cq} = 2^{-\Delta Cq_{\text{deney(ort)}}} / 2^{-\Delta Cq_{\text{kontrol(ort)}}}$$

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi için $2^{-\Delta Cq}$ değerleri kullanılarak one-way ANOVA yönteminden yararlanıldı. LSD post-hoc testleri ile gruplar arasındaki farklılıklar listelendi. Bunun için IBM SPSS® Statistics (versiyon 25) programı kullanıldı. Anlamlı farklılık için p değeri 0,05 ve altı olarak belirlendi.

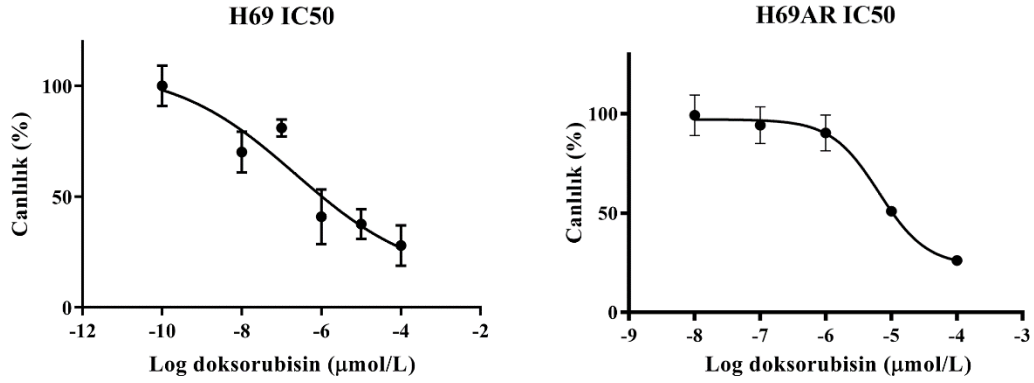
² Çift zincirli DNA (double strand DNA)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 H69 ve H69AR Hücre Kültürlerinde Doksorubisin'in Doz Cevap Eğrisi

H69 ve H69AR hücre kültürlerinde Doksorubisin'in farklı konsantrasyonları IC₅₀ değerlerinin belirlenebilmesi için 48 saat süre ile doza bağlı olarak çalışıldı.



Şekil 4.1: H69 ve H69AR hücre kültürlerinde Doksorubisin'in farklı konsantrasyonlarının 48. saatteki sitotoksik etkileri.

H69 ve H69AR hücre kültürlerinde 48. saatin sonunda Doksorubisin'in uygulanan konsantrasyonlarında anlamlı bir sitotoksik etki gözlemlendi (Tablo 4.1). Yapılan analizler sonucunda Doksorubisin'in IC₅₀ değeri, H69 hücre kültürü için 0.23 µmol/L, H69AR hücre kültürü için ise 6,7 µmol/L olarak bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.1).

Tablo 4.1: H69 ve H69AR hücre hatlarında Doksorubisin dozları uygulandığında belirlenen canlılık oranlarının tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları. (KT: Kareler Toplamı, sd: serbestlik derecesi, KO: Kareler Ortalaması)

		KT	sd	KO	F	p
H69	Gruplar Arasında	12105,703	5	2421,141	31,39	0
	Gruplar İçinde	925,558	12	77,13		
	Toplam	13031,261	17			
H69AR	Gruplar Arasında	12368,159	4	3092,04	18,9	0
	Gruplar İçinde	1637,027	10	163,703		
	Toplam	14005,186	14			

4.1.2 H69 ve H69AR Hücrelerinden Elde Edilen Total RNA'ların A260/A280 Oranları

H69 ve H69AR hücrelerinden izole edilen ve qRT-PCR yönteminde kullanılmış total RNA'ların miktar ve A260/A280 absorbans oranları Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Örneklerden elde edilen total RNA'ların miktar ve A260/A280 değerleri.

Örnek	Miktar (µg/µl)	A260/A280
H-k	521	2,07
H-d	633	2,07
H-s	130	2,10
H-ds	119	1,98
HR-k	185	2,10
HR-d	75,6	2,06
HR-s	80	1,99
HR-ds	340	2,07

4.1.3 *Prnp*, *Bax*, *Becn1* ve *CD44* Genlerinin İfadeleme Değişimleri

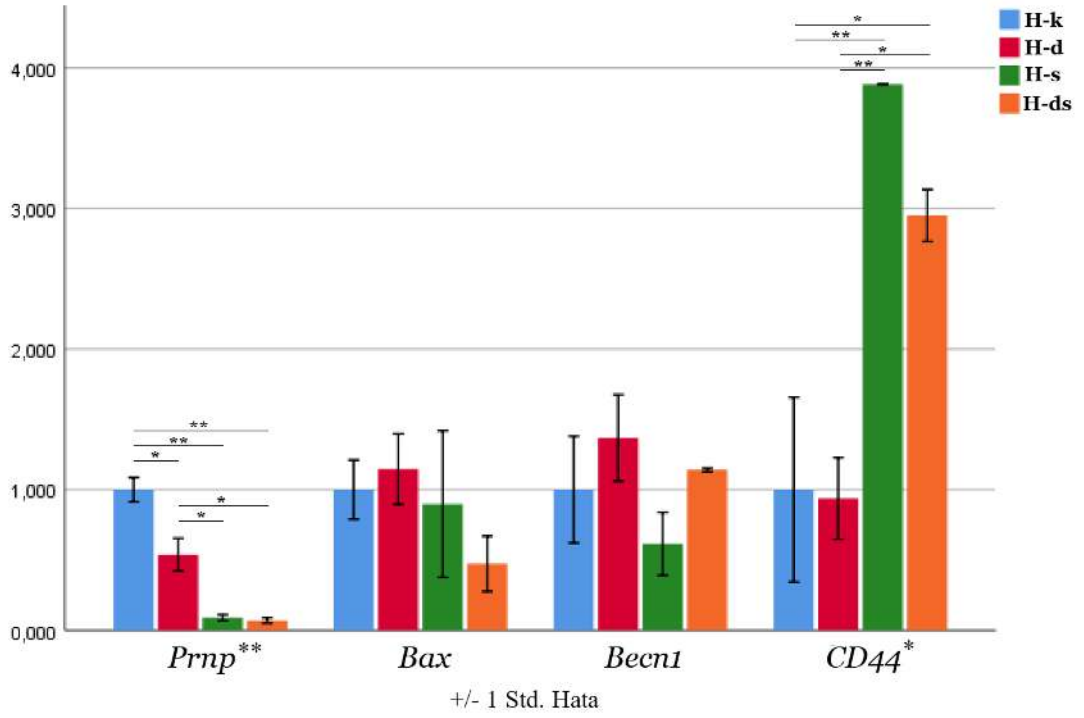
Prnp, *Bax*, *Becn1* ve *CD44* genlerinin ifade düzeyleri kontrol ve uygulama gruplarında qRT-PCR yöntemi ile gözlemlendi. Elde edilen Cq verileri $2^{-\Delta\Delta Cq}$ yöntemi ile değerlendirildi ve One-way Anova ile genlerin ifadelerinde anlamlı değişimlerin olup olmadığı analiz edildi. Her bir gen için deney grupları arasındaki farklılıkların belirlenmesi için LSD post-hoc testi kullanıldı.

4.1.3.1 H69 Hücre Hattında Genlerin İfadeleme Değişimleri

H69 hücre hattı ile oluşturulmuş kontrol ve deney gruplarından elde edilen veriler değerlendirildikten ve istatistiksel analizi yapıldıktan sonra *Prnp* ve *CD44* genlerinin ifadelemesinde anlamlı değişimler saptanmıştır ($p < 0,05$). *Bax* ve *Becn1* genlerindeki ifadeleme değişimi ise anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 4.2). Gruplar içindeki ifadeleme değişimleri ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3: H69 hücre hattında gen ifadeleme düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları. (KT: Kareler Toplamı, sd: serbestlik derecesi, KO: Kareler Ortalaması)

		KT	sd	KO	F	p
<i>Prnp</i>	Gruplar Arasında	3,034	3	1,011	35,503	0,002
	Gruplar İçinde	0,114	4	0,028		
	Toplam	3,148	7			
<i>Bax</i>	Gruplar Arasında	0,273	3	0,091	0,803	0,554
	Gruplar İçinde	0,454	4	0,114		
	Toplam	0,727	7			
<i>Becn1</i>	Gruplar Arasında	0,109	3	0,036	1,387	0,368
	Gruplar İçinde	0,105	4	0,026		
	Toplam	0,214	7			
<i>CD44</i>	Gruplar Arasında	3,116	3	1,039	15,580	0,011
	Gruplar İçinde	0,267	4	0,067		
	Toplam	3,383	7			



Şekil 4.2: H69 hücrelerinde gen ifadenme değişimlerinin gösterimi (*= $p<0,05$, **= $p<0,01$).

H69 hücrelerinde, *Prnp* ifadenme düzeyleri PrP^C siRNA uygulanan gruplarda (H-s ve H-ds) başarılı bir şekilde baskılanmıştır. Doksorubisin IC₅₀ uygulanan grupta ise (H-d) *Prnp* ifadenme düzeyi diğer gruplardan farklılaşmış ve kontrol grubu (H-k) ile karşılaştırıldığında ifadenme düzeyinde yarı yarıya bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.2). *Prnp* ifadenme düzeyleri için grupların istatistiksel verileri ve gruplar arasındaki p değerleri sırasıyla Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4: H69 hücre gruplarında *Prnp* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Min	Maks
H-k	2	1,61277	0,19791	0,13995	1,473	1,753
H-d	2	0,86769	0,26548	0,18773	0,680	1,055
H-s	2	0,14303	0,04841	0,03423	0,109	0,177
H-ds	2	0,11121	0,04421	0,03126	0,080	0,142
Toplam	8	0,68367	0,67062	0,23710	0,080	1,753

Tablo 4.5: H69 hücre gruplarında *Prnp* ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.

	H-k	H-d	H-s	H-ds
H-k	-	0,012	0,001	0,001
H-d	0,012	-	0,013	0,011
H-s	0,001	0,013	-	0,860
H-ds	0,001	0,011	0,860	-

Bax ifadelenme düzeylerinde herhangi bir anlamlı değişime rastlanılmamıştır. Ancak PrP^C siRNA ve Doksorubisin IC₅₀ uygulanmış gruptaki *Bax* ifadelenmesindeki düşüş dikkat çekmiştir (Şekil 4.2). *Bax* ifadelenme düzeyleri için grupların istatistiksel verileri ve gruplar arasındaki p değerleri sırasıyla Tablo 4.6 ve Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.6: H69 hücre gruplarında *Bax* ifadelenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Min	Maks
H-k	2	0,73689	0,218392	0,154426	0,582	0,891
H-d	2	0,84474	0,261443	0,184868	0,66	1,03
H-s	2	0,6618	0,544271	0,384857	0,277	1,047
H-ds	2	0,34822	0,204359	0,144504	0,204	0,493
Toplam	8	0,64791	0,322352	0,113969	0,204	1,047

Tablo 4.7: H69 hücre gruplarında *Bax* ifadelenme değişimlerinin p değerleri tablosu.

	H-k	H-d	H-s	H-ds
H-k	-	0,765	0,835	0,313
H-d	0,765	-	0,616	0,215
H-s	0,835	0,616	-	0,405
H-ds	0,313	0,215	0,405	-

Becn1 ifadelenme düzeylerine herhangi bir anlamlı değişime rastlanılmamıştır. Ancak PrP^C siRNA uygulanmış gruptaki *Becn1* ifadelenmesindeki düşüş dikkat çekmiştir (Şekil 4.2). *Becn1* ifadelenme düzeyleri için grupların istatistiksel verileri ve gruplar arasındaki p değerleri sırasıyla Tablo 4.8 ve Tablo 4.9’da gösterilmiştir.

Tablo 4.8: H69 hücre gruplarında *Becn1* ifadelenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Min	Maks
H-k	2	0,4261	0,228827	0,161805	0,264	0,588
H-d	2	0,58329	0,184847	0,130706	0,453	0,714
H-s	2	0,26202	0,134994	0,095455	0,167	0,357
H-ds	2	0,48587	0,008235	0,005823	0,48	0,492
Toplam	8	0,43932	0,174778	0,061793	0,167	0,714

Tablo 4.9: H69 hücre gruplarında *Becn1* ifadelenme değişimlerinin p değerleri tablosu.

	H-k	H-d	H-s	H-ds
H-k	-	0,387	0,368	0,731
H-d	0,387	-	0,118	0,58
H-s	0,368	0,118	-	0,239
H-ds	0,731	0,58	0,239	-

CD44 ifadelenme düzeylerinde kontrol grubuna göre Doksorubisin IC₅₀ uygulanmış grupta farklılaşma belirlenmemiştir. PrP^C siRNA uygulanan grupta ise *CD44* ifadelenmesi kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat artmışken PrP^C siRNA ve Doksorubisin IC₅₀ uygulanmış grupta yaklaşık 3 kat artış gözlenmiştir (Şekil 4.2). *CD44* ifadelenme düzeyleri için grupların istatistiksel verileri ve gruplar arasındaki p değerleri sırasıyla Tablo 4.10 ve Tablo 4.11’de gösterilmiştir.

Tablo 4.10: H69 hücre gruplarında *CD44* ifadelenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Min	Maks
H-k	2	0,49240	0,45753	0,32352	0,169	0,816
H-d	2	0,46179	0,20175	0,14266	0,319	0,604
H-s	2	1,91178	0,00141	0,00100	1,911	1,913
H-ds	2	1,45248	0,12904	0,09124	1,361	1,544
Toplam	8	1,07961	0,69517	0,24578	0,169	1,913

Tablo 4.11: H69 hücre gruplarında *CD44* ifadelenme değişimlerinin p değerleri tablosu.

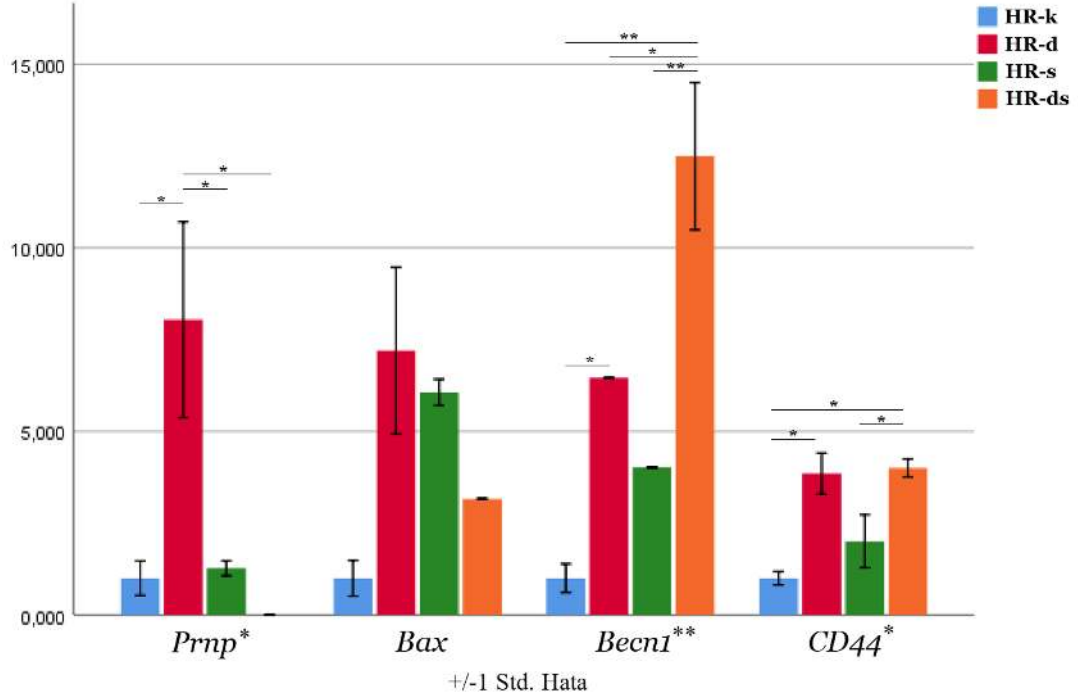
	H-k	H-d	H-s	H-ds
H-k	-	0,911	0,005	0,021
H-d	0,911	-	0,005	0,019
H-s	0,005	0,005	-	0,150
H-ds	0,021	0,019	0,150	-

4.1.3.2 H69AR Hücre Hattında Genlerin İfadelenme Değişimleri

H69AR hücre hattı ile oluşturulmuş kontrol ve deney gruplarından elde edilen veriler değerlendirildikten ve istatistiksel analizi yapıldıktan sonra *Prnp*, *Becn1* ve *CD44* genlerinin ifadelenmesinde anlamlı değişimler saptanmıştır ($p < 0,05$). *Bax* geninin ifadelenme değişimi ise deney gruplarında kontrol grubuna göre artış gösterse de anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 4.12). Gruplar içindeki ifadelenme değişimleri ise Şekil 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.12: H69AR hücre hattında gen ifadelenme düzeylerinin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları. (KT: Kareler Toplamı, sd: serbestlik derecesi, KO: Kareler Ortalaması)

		KT	sd	KO	F	p
Prnp	Gruplar Arasında	0,127	3	0,042	7,345	0,042
	Gruplar İçinde	0,023	4	0,006		
	Toplam	0,150	7			
Bax	Gruplar Arasında	0,162	3	0,054	5,723	0,063
	Gruplar İçinde	0,038	4	0,009		
	Toplam	0,200	7			
Becn1	Gruplar Arasında	0,522	3	0,174	22,781	0,006
	Gruplar İçinde	0,031	4	0,008		
	Toplam	0,553	7			
CD44	Gruplar Arasında	0,839	3	0,280	9,185	0,029
	Gruplar İçinde	0,122	4	0,030		
	Toplam	0,961	7			



Şekil 4.3: H69AR hücrelerinde gen ifadenme değişimlerinin gösterimi (*= $p<0,05$, **= $p<0,01$).

H69AR hücrelerinde, PrP^C siRNA uygulanan gruptaki PrP^C'nin baskılanmasına rağmen *Prnp* ifadenme düzeylerinde anlamlı bir farklılaşma gözlenmemiştir. Doksorubisin IC₅₀ uygulanan grupta ise *Prnp* ifadenme düzeyi kontrol grubuna göre yaklaşık 8 kat artış göstererek diğer gruplardan farklılaşmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.3). *Prnp* ifadenme düzeyleri için grupların istatistiksel verileri ve gruplar arasındaki p değerleri sırasıyla Tablo 4.13 ve Tablo 4.14'te gösterilmiştir.

Tablo 4.13: H69AR hücre gruplarında *Prnp* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Min	Maks
HR-k	2	0,03952	0,02634	0,01862	0,021	0,058
HR-d	2	0,31783	0,14917	0,10548	0,212	0,423
HR-s	2	0,05023	0,01147	0,00811	0,042	0,058
HR-ds	2	0,00000	0,00000	0,00000	0,000	0,000
Toplam	8	0,10189	0,14649	0,05179	0,000	0,423

Tablo 4.14: H69AR hücre gruplarında *Prnp* ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.

	HR-k	HR-d	HR-s	HR-ds
HR-k	-	0,022	0,895	0,630
HR-d	0,022	-	0,024	0,014
HR-s	0,895	0,024	-	0,545
HR-ds	0,630	0,014	0,545	-

Bax ifadelenme düzeylerinde ise belirgin artışların gözlenmesine rağmen bu artışlar anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.3). *Bax* ifadelenme düzeyleri için grupların istatistiksel verileri ve gruplar arasındaki p değerleri sırasıyla Tablo 4.15 ve Tablo 4.16’da gösterilmiştir.

Tablo 4.15: H69AR hücre gruplarında *Bax* ifadelenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Min	Maks
HR-k	2	0,05847	0,040282	0,028484	0,03	0,087
HR-d	2	0,42102	0,187797	0,132792	0,288	0,554
HR-s	2	0,3546	0,029529	0,02088	0,334	0,375
HR-ds	2	0,18473	0,001414	0,001	0,184	0,186
Toplam	8	0,2547	0,168972	0,05974	0,03	0,554

Tablo 4.16: H69AR hücre gruplarında *Bax* ifadelenme değişimlerinin p değerleri tablosu.

	HR-k	HR-d	HR-s	HR-ds
HR-k	-	0,02	0,038	0,264
HR-d	0,02	-	0,532	0,072
HR-s	0,038	0,532	-	0,155
HR-ds	0,264	0,072	0,155	-

Becn1 ifadelenme düzeyinin Doksorubisin IC₅₀ uygulanmış grupta kontrol grubuna göre yaklaşık 6,5 kat arttığı ve PrP^C siRNA uygulanan grup hariç diğerlerinden farklılaştığı gözlenmiştir. PrP^C siRNA uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat artış gözlenmesine rağmen *Becn1* ifadelenmesi sadece Doksorubisin IC₅₀ ve PrP^C siRNA uygulanan gruptan farklılaşmıştır. Doksorubisin IC₅₀ ve PrP^C siRNA uygulanan grupta ise *Becn1* ifadelenmesi kontrol grubuna göre yaklaşık 12,5 kat artmış ve diğer gruplardan farklılaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.3). *Becn1* ifadelenme düzeyleri için grupların istatistiksel verileri ve gruplar arasındaki p değerleri sırasıyla Tablo 4.17 ve Tablo 4.18’de gösterilmiştir.

Tablo 4.17: H69AR hücre gruplarında *Becn1* ifadelenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Min	Maks
HR-k	2	0,06051	0,033311	0,023555	0,037	0,084
HR-d	2	0,39054	0,001414	0,001000	0,390	0,392
HR-s	2	0,24307	0,000321	0,000227	0,243	0,243
HR-ds	2	0,75600	0,171613	0,121349	0,635	0,877
Toplam	8	0,36253	0,281007	0,099351	0,037	0,877

Tablo 4.18: H69AR hücre gruplarında *Becn1* ifadelenme değişimlerinin p değerleri tablosu.

	HR-k	HR-d	HR-s	HR-ds
HR-k	-	0,020	0,105	0,001
HR-d	0,020	-	0,167	0,014
HR-s	0,105	0,167	-	0,004
HR-ds	0,001	0,014	0,004	-

CD44 ifadenme düzeyinin Doksorubisin IC₅₀ uygulanmış grupta kontrol grubuna göre yaklaşık 4 arttığı ve kontrol grubu hariç diğer gruplardan farklılaşmadığı gözlenmiştir. PrP^C siRNA uygulanan grupta *CD44* ifadenmesi kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat artmış, ancak sadece Doksorubisin IC₅₀ ve PrP^C siRNA uygulanan gruptan farklılaşmıştır. Doksorubisin IC₅₀ ve PrP^C siRNA uygulanan grupta ise *Becn1* ifadenmesi kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat artmış ve Doksorubisin IC₅₀ uygulanan grup hariç diğerlerinden farklılaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.3). *CD44* ifadenme düzeyleri için grupların istatistiksel verileri ve gruplar arasındaki p değerleri sırasıyla Tablo 4.19 ve Tablo 4.20’de gösterilmiştir.

Tablo 4.19: H69AR hücre gruplarında *CD44* ifadenmesinin istatistiksel verileri.

	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Min	Maks
HR-k	2	0,25633	0,066340	0,046910	0,209	0,303
HR-d	2	0,98683	0,202186	0,142967	0,844	1,130
HR-s	2	0,51454	0,261961	0,185234	0,329	0,700
HR-ds	2	1,02568	0,088874	0,062843	0,963	1,089
Toplam	8	0,69584	0,370487	0,130987	0,209	1,130

Tablo 4.20: H69AR hücre gruplarında *CD44* ifadenme değişimlerinin p değerleri tablosu.

	HR-k	HR-d	HR-s	HR-ds
HR-k	-	0,014	0,213	0,012
HR-d	0,014	-	0,054	0,835
HR-s	0,213	0,054	-	0,043
HR-ds	0,012	0,835	0,043	-

4.2 Tartışma

Dünya genelinde, kanser nedeni ile ölümlerin yaklaşık %18'ini oluşturarak ilk sırada yer alan akciğer kanseri, 2018 yılında 1,7 milyon hastanın ölümüne neden olmuşken yaklaşık 2 milyon yeni vakada tanımlanmıştır [2]. Yayılmacı ve hızla metastatik evreye ulaşabilen küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK) ise akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %14-17'sini oluşturur ve 1 yıllık sağkalım oranı %20-40 iken 5 yıllık sağkalımı yaklaşık %6'dır [11,101,102]. Böylesine düşük sağkalım oranlarına sahip KHAK, oldukça riskli bir kanser türüdür ve bu araştırmacıları yeni tedavi yaklaşımları geliştirmeye itmiştir. Günümüzde, KHAK için uygulanan klasik kemoterapi ve radyoterapi yaklaşımları ilk tedavide yüksek bir cevap alınmasını sağlasa da hastaların birçoğunda 6 ay içinde yeniden nüksetme gözlenir [102]. Yeni tedavi yaklaşımlarının çoğu ise beklenen sonuçları vermemiş ve klasik platin temelli tedavilerin etkinliğini aşılamamışlardır [22,102]. Tedavi yolunda aşılması gereken en önemli problemlerden biri de kanser hücrelerinin çoklu ilaç direnci (MDR) olarak bilinen bir olgu ile tedaviye karşı direnç geliştirebilmesidir. Bu sebeple günümüzde, direnç mekanizmasında rol oynayan P-gp gibi moleküllerin ve bu mekanizmaya dolaylı yoldan etki eden potansiyel hedeflerin yanı sıra hücre ölümünü baskılayan moleküllerin hedef alınması ile daha etkin ve daha az yan etki gösteren yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi hedef alınmaktadır [103-107]. Tümörigenez ve sağkalım ile güçlü ilişkileri bulunan Prion Proteini (PrP) aynı zamanda MDR fenotipini desteklemesi dolayısı ile tedavi için potansiyel hedeflerden biri haline gelmiş ve yapılan çalışmalarla bu engelin aşılabileceği gösterilmiştir [91,92,108-110].

Bu çalışmada, H69 (HTB-119TM) ve bunun Doksorubisin ile seçilerek çoklu ilaç direnç fenotipi kazandırılmış formu olan H69AR (CRL-11351TM) KHAK hücre hatlarında PrP^C anlatımı sürdürülmüş ve hücre ölümüne nasıl bir etkisinin olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Antikanser ilaç olarak ise sıkça kullanılan Doksorubisin seçilmiştir. Yapılan sitotoksitesite testi sonucunda 48 saat içinde H69AR hücrelerinin yarısını elimine etmek için gerekli olan Doksorubisin dozunun dirençsiz olmayan hücre hattına göre yaklaşık 25 kat daha fazla olması gerektiği belirlenmiştir.

Prnp ifadenmesinin, Doksorubisin uygulandığında hassas H69 hücrelerinde kontrol grubuna (H-k) göre yaklaşık %50 azaldığı gözlemlenmiştir. Her ne kadar *Prnp* ifadenmesinin artması ile kolon ve meme kanserlerinde Doksorubisin aracılı ölümü

engellense de PrP^C'nin farklı tip hücrelerde farklı işlevler gösterdiği bilinmektedir [7]. Ancak, H69 hücre hattında Doksorubisin ile PrP^C arasında nasıl bir ilişkinin olduğu bilinmemektedir. Buna karşılık, aynı Doksorubisin uygulanmış grupta (H-d) bulunan H69 hücrelerinde *Bax* ve *Becn1* gen ifadelerinde hafif bir artış gözlenmesine rağmen anlamlı bir değişimin belirlenmemesi hücre ölümünün farklı yollarla tetiklendiğini düşündürmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada ise Doksorubisin'in farklı yollarla hücre ölümünü tetikleyebileceği ve *Bax* seviyelerinde artışın gerçekleşmediği gösterilmiştir [111]. Benzer şekilde, *Prnp* ifadenmesinin baskılandığı gruplarda bulunan (H-s [PrP^C siRNA] ve H-ds [PrP^C siRNA+Doksorubisin]) H69 hücrelerinde ise *Bax* ve *Becn1* gen ifadelerinde anlamlı bir değişim belirlenmemiştir. Bu sonuçlar ise PrP^C'nin baskılanması ve/veya Doksorubisin'in, H69 hücrelerinde *Bax* ve *Becn1* ifadenme düzeylerinde anlamlı bir değişiklik yaratmadığını göstermiştir. Yapılan çalışmalarda Bax-aracılı apoptoziste PrP^C'nin Bax'ın fonksiyonel aktivitesi için gerekli olan konformasyonel değişikliğe gitmesine engel olduğu ve BCL2 ekspresyonunu arttırarak anti-apoptotik bir süreç oluşturduğu ileri sürülmüştür [112,113]. Çalışmamızda PrP^C'nin baskılandığı H-s ve H-ds gruplarında *Bax* ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmaması ve Doksorubisin uygulaması ile anlamlı olmayan çok hafif bir artış göstermesi H69 hücrelerinde hücre ölümünün Bax aracılı olmadığını düşündürülebilir. Bunun yanında, PrP^C baskılanmasının glial tümör hücrelerinde *Becn1* gen ürünü olan Beclin-1 ekspresyonunda bir artışa neden olduğu ve BCL2 downregülasyonu ile birlikte giden otofajik bir süreci başlattığı ileri sürülmüştür [114]. Buna karşın çalışmamızda PrP^C transfeksiyonu sonucunda *Becn1* düzeyi anlamlı olmasa da bir düşüş gösterirken PrP^C susturulması ardından Doksorubisin uygulanması ile kontrol grubuna göre bir artış göstermesi H69 hücrelerde PrP^C baskılanmasının Doksorubisin aracılığı ile otofajik bir yolağı aktive edebileceğini düşündürmüştür (Şekil 4.2). Yine de H-s grubunda *Becn1* ve H-ds grubunda ise *Bax* ifadenmelerinde dikkat çeken düşüşlerin protein düzeyindeki etkilerinin anlaşılabilmesi için bu verilerin protein seviyelerinin belirlenmesi ile desteklenmesi gerekmektedir.

CD44 ifadenmesinin ise Doksorubisin uygulanmış grupta (H-d) değişmediği, ancak *Prnp* ifadenmesinin baskılandığı gruplarda, kontrol grubuna (H-k) göre, 3-4 kat arttığı gözlenmiştir. Kanseri hücrelerinde işgalci ve metastatik fenotipin temel elemanlarından olan *CD44*'ün aynı zamanda çoklu ilaç direnci ile de ilişkili olduğu

bilinmektedir [52,115,116]. Bununla birlikte, MCF7 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada PrP^C ile CD44'ün etkileşim halinde olduğu *Prnp* baskılanması ile *CD44* ifadenmesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir [110]. Çalışmamızda ise bu bulguların tersine *CD44* ifadenmesinin PrP^C siRNA uygulaması ve transfeksiyon sonrası Doksorubisin uygulaması (H-s ve H-ds) sonrasında anlamlı bir artış gösterdiği ortaya konmuştur. Kolorektal kanser üzerine yapılan bir başka çalışmada CD44⁻ veya PrP^C⁻ hücrelerde CD44⁺PrP^C⁺ hücrelere göre metastaz kapasitesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [82]. Bu iki çalışmadaki veriler bulgularımız ile birlikte ele alındığında bize PrP^C baskılanmasının *CD44* üzerine doğrudan veya dolaylı yollarla etki edebileceğini göstermiştir. Ancak, artan *CD44* ifadenmesinin hücre üzerinde nasıl bir etkisinin olabileceği tartışma konusudur. PrP^C gibi, metastaz, tümör büyümesi ve oksidatif stresten korunma sağlayabilen *CD44* ve varyantlarının [117-119] PrP^C baskılandığında benzer işlevleri yerine getirebilmek için ifadenmesinin artması söz konusu olabilir.

Çoklu ilaç direncine sahip olan H69AR hücre hattında *Prnp* ifadenmesinin Doksorubisin uygulanan hücrelerde (HR-d) kontrol grubuna göre (HR-k) yaklaşık 8 kat arttığı gözlenmiştir. Ancak, *Prnp* ifadenme değişim seviyeleri, PrP'nin baskılandığı grupta (HR-s) kontrol grubuna göre neredeyse hiç değişmemiş ve PrP baskılanmasının ardından Doksorubisin uygulanan grupta (HR-ds) çok düşük seviyelerde meydana gelmesine rağmen, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamsız düzeyde gerçekleşmiştir. *Prnp*'nin birçok ilaca dirençli hatlarda yüksek düzeyde ifade edilmesinin yanı sıra Doksorubisin bağımlı hücre ölümüne karşı dirençlilik gösterdiğini belirleyen diğer çalışmalara paralel olarak Doksorubisin uygulanan grupta (HR-d) *Prnp* ifadenmesinde anlamlı bir artış görülmektedir [7,110,120]. Ayrıca, yakın zamanda yapılan bir çalışmada PrP^C'nin hücre dışına salınması ile Doksorubisini Cu²⁺ aracılığı ile kendine bağladığı ve böylece Doksorubisin direncine aracılık ettiği gösterilmiştir [121]. Bu veriler ışığında, H69AR hücre hattında da PrP^C'nin benzer bir işlev gösterdiği söylenebilir. Diğer yandan, PrP^C'nin baskılandığı grupta (HR-s) siRNA uygulanmasına rağmen *Prnp* ifadenmesinde anlamlı bir değişimin gözlenmemesi PrP^C'nin H69AR ilaca direnç mekanizması için elzem olduğunu ve eksikliğini gidermek için *Prnp* geninin upregüle edilmiş olabileceğini düşündürmüştür. Benzer bir diğer olasılık ise *Prnp* ifadenmesinin endoplazmik retikulum (ER) stresi ile indüklenebilmesidir [83].

Kanser hücrelerinin yüksek proliferasyon oranlarının proteinlerin katlanma ve taşınma merkezi olan ER’da stres oluşturduğu bilinmektedir [122,123]. Bu sebeple, *Prnp* geninin baskılanması ile birlikte oluşan strese cevap olarak *Prnp* ifadenmesinin tekrar indüklenebileceği varsayılabilir.

Pro-apoptotik belirteçlerden biri olan *Bax* ifadenmelerinde ise belirgin artışların gözlenmesine rağmen bu değişimler istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Yakın zamanlı yapılan bir çalışmada Doksorubisine dirençli bir kolon karsinoma hücre hattında simvastatin ile kombine phenothiazine türevlerinin anti apoptotik Bcl-2 düzeyini düşürürken *Bax* düzeylerini arttırdığı bulunmuştur [124]. Çalışmamızda *Bax* ifadenmesinin Doksorubisin uygulanan grupta artış göstermesi ve PrP^C siRNA ile PrP^C siRNA+Doksorubisin uygulanan gruplarda azalarak devam etmesi, ilaca dirençli H69AR hücrelerde siRNA baskılanmasının *Bax* ifadenmelerinde Doksorubisin uygulanan gruba oranla bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir (Şekil 4.3). Buna paralel olarak özellikle *Becn1* ifadenmesinin siRNA trasfeksiyonu ardından Doksorubisin uygulanan grupta anlamlı olarak artış göstermesi özellikle bu hücreleri *Bax* aracılı hücre ölümünden çok Beclin-1 aracılı otofajik bir sürece yönlendirdiği düşünülebilir. Gerçekten, PrP^C’nin baskılandığı grupta (HR-s) gözlenen *Becn1* artışı, Doksorubisin uygulanan gruba (HR-d) benzer şekilde olmasına rağmen istatistiksel olarak HR-d ile kontrol grubu (HR-k) arasında konumlanmıştır. Otofajik süreçte temel elemanlardan biri olan Beclin1 proteini çekirdek kompleksinin oluşumunda yer alarak otofajik vakuollerin oluşum sürecini başlatır [34]. Ayrıca, Doksorubisin’e dirençlilik sırasında otofajinin etkin bir rol oynadığı bilinmektedir [125]. Bu sebep ile HR-d ve HR-ds gruplarında artan *Becn1* ifadenmelerinin, H69AR hücrelerinde, Doksorubisin’e karşı gösterilen dirençte etkin bir rol oynadığı söylenebilir. Buna ek olarak, yapılan bir çalışmada PrP^C’nin Beclin1 ile etkileştiği ve otofajinin başlatılmasında rol oynadığı gösterilmiştir [80]. Aynı zamanda, birçok çalışmada *Prnp* yokluğunda otofagozom birikimi ve otofajik akışta bozulmalar gözlenmiş, bunun sonucunda hücrelerin stres koşullarına karşı hassaslaştığı gösterilmiştir [8,9,77-79]. Bu veriler ile birlikte PrP^C’nin baskılandığı gruptaki (HR-s) *Becn1* ifadenmesinin PrP^C’nin susturulması sonucu otofajik akışın kısmen bozulması ile meydana gelen birikimden kaynaklı olabileceğini göstermiştir. Ek olarak, otofajinin ER stresi ile indüklenebilmesi [126,127], HR-s grubundaki *Prnp* ifadenmesinin davranışı göz alınırsa, *Becn1* ifadenmesindeki değişimin olası bir ER stresi kaynaklı olabileceği

ihtimali vardır. Tüm bu veriler ele alındığında, PrP^C baskılanmasının ardından Doksorubisin uygulanan grupta (HR-ds) *Becn1* ifadenmesinde gözlenen yüksek seviyedeki artışın, PrP^C yokluğunda düzensizleşen otofajik akış sonucunda oluşan birikmenin ve dolayısı ile Beclin1 düzeylerinde beklenen bir artışın ispatı olduğu söylenebilir. Ayrıca, bozulan otofajik akışın hücreyi ölüme götürebilmesi ile [8], PrP^C susturulmasının ardından uygulanan Doksorubisin'in H69AR hücrelerinde otofajik hücre ölümüne neden olabileceği tahmin edilmektedir. Laboratuvarımızda, yakın zamanda, H69AR hücre hattı ile gerçekleştirilen bir çalışmada, Beclin-1'in immünohistokimyasal analiz sonuçları ile bulgularımızın örtüşmesi bu savı güçlendirmektedir. [128].

H69AR hücrelerindeki *CD44* ifadenme değişimleri ise anlamlı düzeyde gerçekleşmiş ve *Becn1* ile benzer motifleri içermektedir. Doksorubisin uygulanan gruplarda (HR-d [Doksorubisin] ve HR-ds [Doksorubisin+PrP^C siRNA]) *CD44* ifadenmeleri benzer düzeylerde gerçekleşmişken, PrP^C'nin baskılandığı grupta (HR-s) bu ifadenme düzeyi istatistiksel olarak HR-d ve kontrol grubu (HR-k) arasında konumlanmıştır. Bulgularımızda, *CD44* ifadenmelerinin Doksorubisin uygulanmış H69AR hücre gruplarında (HR-d ve HR-ds) H69'a kıyasla gösterdiği farklı davranışlar *CD44*'ün ilaca dirençli hücrelerde Doksorubisin'e dirençlilikte önemli bir yer tutabileceğini düşündürmüştür. *CD44*, P-gp (MDR1) ile birlikte çoklu ilaç direnci (MDR) mekanizmasında etkin bir rol oynasa da [52,116] H69AR hücrelerinde MDR1'den ziyade MRP1 ifadenmesinin yüksek seviyelerde olduğu bilinmektedir [129,130]. Bu durum, *CD44*'ün Doksorubisin'e verdiği tepkinin farklı bir yolak üzerinde ilerleyebileceğini göstermiştir. Buna ek olarak hipoksi ve TGF- β gibi stres şartlarında indüklenen otofajinin, epitelden mezenkimale geçişi (EMT) desteklediği ve bunun yanı sıra *CD44* ifadenmesinin artmasına sebep olarak kanser kök hücresi (CSC) benzeri özelliklerin gözlenmesine neden olduğu gösterilmiştir [131]. Bu durumda, H69AR hücrelerinde, *CD44*'ün H69 hücre hattındaki tahmin edilen etkilerinin yanı sıra otofaji ve sağkalım ile de ilişkili olabileceği öngörülmektedir. Özellikle, PrP^C baskılanmasının ardından Doksorubisin uygulanmış gruptaki (HR-ds) *CD44* ve otofaji belirteci olan *Becn1* arasındaki ifadenme değişimlerinin farklılığı *CD44*'ün otofaji ve/veya stres koşulları altında sınırlı bir şekilde indüklenebileceğini düşündürmektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Elde ettiğimiz veriler, Prion proteinin (PrP) sağkalım ve ilaca dirençlilik mekanizmasında etkin bir rol oynadığını açıkça göstermektedir. Özellikle, H69'a kıyasla aynı hücre hattının ilaca dirençli formu olan H69AR'de gözlenen değişimler, PrP^C'nin zor çevresel koşullarda etkin bir koruyucu ve düzenleyici bir protein olduğunu göstermekle birlikte otofaji süresince önemli bir yer aldığını ortaya koymaktadır. Aynı zamanda, H69AR hücre hattında, PrP^C baskılanmasının düzensiz otofajik akışa sebep olması nedeni ile hücre ölümüne yol açabilme ihtimalini göstermektedir.

Küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK) hücre hatlarında PrP^C ve otofaji arasındaki ilişkiye dair bulgularımız ve yapılan diğer çalışmalar [8,9,77-79], yüksek çevresel stres ve besin kıtlığı şartlarında devamlılığını sağlamak için otofajik faaliyetlerden yararlanan kanser hücrelerinde PrP^C'nin önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. Bu veriler ışığında, başta KHAK olmak üzere diğer benzer koşulları taşıyan kanser türlerinde, PrP^C'nin susturulması ile birlikte gelişim ve çoğalma hızlarının azaltılabileceğinin yanı sıra kanserde bir gerilemeye neden olabileceği de öngörülmektedir.

Çoklu ilaç direnci (MDR) özelliği kazanmış kanserlerde her ne kadar kemoterapinin yüksek dozlarında ilaca dirençlilik kırılabilir olsa da beraberinde, yan etkilerinin şiddetini de arttırmaktadır [45,132,133]. Bu yüzden, PrP^C gibi sağkalım ve MDR ile ilişkili potansiyel hedeflerin araştırılmasının, yüksek doz gereksinimin azaltılabilmesi ve daha verimli tedavilerin geliştirilmesindeki önemi bir kez daha vurgulanmalıdır. Hali hazırda, ilaç alımı ile eş zamanlı olarak *Prnp*'nin susturulması üzerine bir çalışma da mevcuttur [103]. Bu ve bunun gibi yeni tedavi yaklaşımları aracılığı ile gelecekte PrP^C'nin etkin bir rol üstlendiği belirlenen kanser türlerinde tedavinin verimli ve etkin bir şekilde sürdürülebileceği öngörülmektedir.

Çalışmamızda, programlı hücre ölümü ve çoklu ilaç dirençliliğine odaklanmış olsak da PrP^C'nin diğer birçok işlev ve etkileşimleri hakkındaki bilgi birikimimiz oldukça kısıtlıdır. Birçok kanser türünde görev üstlenen bu proteinin [7] olası potansiyel etkilerinin incelenmesi ile kanser biyolojisindeki fizyolojisinin daha net anlaşılması, birçok bilinmeze ışık tutacağı gibi yeni yaklaşımların da doğmasına sebep

olacaktır. Biz de elde ettiğimiz veriler ve vardığımız sonuçlar doğrultusunda, KHAK hücre hatları olan H69 ve H69AR’lerde PrP^C’nin işlev ve etkileşimlerinin bir kısmını aydınlatmaya çalıştık. Bu doğrultuda, apoptotik ve otofajik temelli daha geniş paneller ve teknolojiler (örneğin CRISPR/Cas9 genom düzenleme mekanizmaları) kullanarak yeni araştırmaların yapılması PrP^C’nin özellikle ilaca direnç gösteren kanserlerdeki rolünün daha iyi anlaşılması ve PrP^C odaklı anti-kanser stratejilerinin geliştirilmesi açısından yararlı olacaktır.



KAYNAKLAR

1. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018, 68(6), 394-424.
3. Bertram J. S. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 2001, 21(6), 167-223.
4. Haanen C., Vermes I. Apoptosis: Programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1996, 64(1), 129-133.
5. Hanahan D., Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, 144(5), 646-674.
6. Liberski P. P. Cell Death and Autophagy in Prion Diseases. In: Liberski P. P., ed. *Prion Diseases*. Vol 129. New York, NY: Springer New York; 2017:145-158.
7. Yang X., Zhang Y., Zhang L., He T., Zhang J., Li C. Prion protein and cancers. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2014, 46(6), 431-440.
8. Barbieri G., Palumbo S., Gabrusiewicz K., et al. Silencing of cellular prion protein (PrPC) expression by DNA-antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells. *Autophagy*. 2011, 7(8), 840-853.
9. Kuwahara C., Takeuchi A. M., Nishimura T., et al. Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature*. 1999, 400, 225.
10. Roucou X., Giannopoulos P. N., Zhang Y., Jodoin J., Goodyer C. G., LeBlanc A. Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death & Differentiation*. 2005, 12(7), 783-795.
11. Weinberger S. E., Cockrill B. A., Mandel J. *Principles of Pulmonary Medicine*. 7 ed. Philadelphia: Elsevier; 2019.
12. Gaspar L. E., McNamara E. J., Gay E. G., et al. Small-Cell Lung Cancer: Prognostic Factors and Changing Treatment Over 15 Years. *Clinical Lung Cancer*. 2012, 13(2), 115-122.
13. Tartarone A., Giordano P., Leroise R., Rodriquez M. G., Conca R., Aieta M. Progress and challenges in the treatment of small cell lung cancer. *Medical Oncology*. 2017, 34(6).
14. Gersten O., Wilmoth J. R. The Cancer Transition in Japan since 1951. *Demographic Research*. 2002, 7(5), 271-306.
15. Omran A. R. The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change. *The Milbank Quarterly*. 2005, 83(4), 731-757.
16. Alberg A. J., Brock M. V., Ford J. G., Samet J. M., Spivack S. D. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest*. 2013, 143(5), e1S-e29S.
17. Brennan P., Hainaut P., Boffetta P. Genetics of lung-cancer susceptibility. *The Lancet Oncology*. 2011, 12(4), 399-408.
18. Jiang S.-X., Sato Y., Kuwao S., Kameya T. Expression of bcl-2 oncogene protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *The Journal of Pathology*. 1995, 177(2), 135-138.

19. Semenova E. A., Nagel R., Berns A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes & Development*. 2015, 29(14), 1447-1462.
20. George J., Lim J. S., Jang S. J., et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015, 524(7563), 47-53.
21. Yokomizo A., Tindall D. J., Drabkin H., et al. PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene*. 1998, 17, 475-479.
22. Tsoukalas N., Aravantinou-Fatorou E., Baxevasanos P., et al. Advanced small cell lung cancer (SCLC): new challenges and new expectations. *Annals of Translational Medicine*. 2018, 6(8), 145-145.
23. Zangemeister-Wittke U., Schenker T., Luedke G., Stahel R. Synergistic cytotoxicity of bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines. *British Journal of Cancer*. 1998, 78(8), 1035-1042.
24. Renehan A. G. What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal*. 2001, 322(7301), 1536-1538.
25. Parzych K. R., Klionsky D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014, 20(3), 460-473.
26. Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972, 26(4), 239-257.
27. Pistritto G., Trisciuglio D., Ceci C., Garufi A., D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 2016, 8(4), 603-619.
28. Wong R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2011, 30(1), 87.
29. Schneider P., Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmaceutica Acta Helveticae*. 2000, 74(2000), 281-186.
30. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*. 2007, 87(1), 99-163.
31. Mijaljica D., Prescott M., Devenish R. J. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011, 7(7), 673-682.
32. Massey A., Kiffin R., Cuervo A. M. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004, 36(12), 2420-2434.
33. Yorititsu T., Klionsky D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation*. 2005, 12(2), 1542-1552.
34. Kang R., Zeh H. J., Lotze M. T., Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2011, 18(4), 571-580.
35. Gross A., McDonnell J. M., Korsmeyer S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*. 1999, 13(15), 1899-1911.
36. Kluck R. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*. 2010, 2010(2), 9-22.
37. Lavrik I. Death receptor signaling. *Journal of Cell Science*. 2005, 118(2), 265-267.
38. Muñoz-Pinedo C., Martin S. J. Autosis: a new addition to the cell death tower of babel. *Cell Death & Disease*. 2014, 5(7), e1319.

39. Levine B., Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 2008, 132(1), 27-42.
40. White E., DiPaola R. S. The Double-Edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009, 15(17), 5308-5316.
41. Apel A., Zentgraf H., Büchler M. W., Herr I. Autophagy-A double-edged sword in oncology. *International Journal of Cancer*. 2009, 125(5), 991-995.
42. Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2007, 7(12), 961-967.
43. Lu Z., Luo R. Z., Lu Y., et al. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2008, 118(12), 3917-3929.
44. Arcamone F., Cassinelli G., Fantini G., et al. Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1969, 6, 1101-1110.
45. Carvalho C., Santos R., Cardoso S., et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, 16(25), 3267-3285.
46. Franco Y., Vaidya T., Ait-Oudhia S. Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2018, 10, 131-141.
47. Friedman R. Drug resistance in cancer: molecular evolution and compensatory proliferation. *Oncotarget*. 2016, 7(11), 11746-11755.
48. Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D. B., Johnston P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*. 2013, 13(10), 714-726.
49. Wang R., Jin C., Hu X. Evidence of drug-response heterogeneity rapidly generated from a single cancer cell. *Oncotarget*. 2017, 8(25), 41113-41124.
50. Rueff J., Rodrigues A. S. *Cancer drug resistance: overviews and methods*. New York: Humana Press; 2016.
51. Gottesman M. M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Review of Medicine*. 2002, 53(1), 615-627.
52. Miletto-González K. E., Chen S., Muthukumaran N., et al. The CD44 Receptor Interacts with P-Glycoprotein to Promote Cell Migration and Invasion in Cancer. *Cancer Research*. 2005, 65(15), 6660-6667.
53. Nussinov R., Tsai C.-J., Jang H. A New View of Pathway-Driven Drug Resistance in Tumor Proliferation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2017, 38(5), 427-437.
54. Mehrpour M., Codogno P. Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Letters*. 2010, 290(1), 1-23.
55. Smirnovas V., Baron G. S., Offerdahl D. K., Raymond G. J., Caughey B., Surewicz W. K. Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2011, 18(4), 504-506.
56. Prusiner S. B. The Prion Diseases. *Brain Pathology*. 1998, 8(3), 499-513.
57. Antony H., Wiegmans A. P., Wei M. Q., Chernoff Y. O., Khanna K. K., Munn A. L. Potential roles for prions and protein-only inheritance in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2012, 31(1-2), 1-19.
58. Atkinson C. J., Zhang K., Munn A. L., Wiegmans A., Wei M. Q. Prion protein scrapie and the normal cellular prion protein. *Prion*. 2016, 10(1), 63-82.
59. Bertuchi F. R., Bourgeon D. M. G., Landemberger M. C., Martins V. R., Cerchiaro G. PrPC displays an essential protective role from oxidative stress

- in an astrocyte cell line derived from PrPC knockout mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012, 418(1), 27-32.
60. Das D., Luo X., Singh A., et al. Paradoxical Role of Prion Protein Aggregates in Redox-Iron Induced Toxicity. *PLoS ONE*. 2010, 5(7), e11420.
 61. Lee Y. J., Baskakov I. V. The cellular form of the prion protein guides the differentiation of human embryonic stem cells into neuron-, oligodendrocyte-, and astrocyte-committed lineages. *Prion*. 2014, 8(3), 266-275.
 62. Panigaj M., Glier H., Wildova M., Holada K. Expression of Prion Protein in Mouse Erythroid Progenitors and Differentiating Murine Erythroleukemia Cells. *PLoS ONE*. 2011, 6(9), e24599.
 63. Pauly P. C., Harris D. A. Copper Stimulates Endocytosis of the Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273(50), 33107-33110.
 64. Hutter G., Heppner F. L., Aguzzi A. No Superoxide Dismutase Activity of Cellular Prion Protein in vivo. *Biological Chemistry*. 2003, 384(9), 1279-1285.
 65. Jones S., Batchelor M., Bhelt D., Clarke Anthony R., Collinge J., Jackson Graham S. Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. *Biochemical Journal*. 2005, 392(2), 309-312.
 66. Brown D. R., Schulz-Schaeffer W. J., Schmidt B., Kretzschmar H. A. Prion Protein-Deficient Cells Show Altered Response to Oxidative Stress Due to Decreased SOD-1 Activity. *Experimental Neurology*. 1997, 146(1), 104-112.
 67. Lee Y. J., Baskakov I. V. The cellular form of the prion protein is involved in controlling cell cycle dynamics, self-renewal, and the fate of human embryonic stem cell differentiation. *Journal of Neurochemistry*. 2013, 124(3), 310-322.
 68. Kim B. H., Lee H. G., Choi J. K., et al. The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Molecular Brain Research*. 2004, 124(1), 40-50.
 69. Hachiya N. S., Yamada M., Watanabe K., et al. Mitochondrial localization of cellular prion protein (PrPC) invokes neuronal apoptosis in aged transgenic mice overexpressing PrPC. *Neuroscience Letters*. 2005, 374(2), 98-103.
 70. Wang X., Dong C. F., Shi Q., et al. Cytosolic prion protein induces apoptosis in human neuronal cell SH-SY5Y via mitochondrial disruption pathway. *BMB Reports*. 2009, 42(7), 444-449.
 71. Bounhar Y., Zhang Y., Goodyer C. G., LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276(42), 39145-39149.
 72. Roucou X., Gains M., LeBlanc A. C. Neuroprotective functions of prion protein. *Journal of Neuroscience Research*. 2004, 75(2), 153-161.
 73. Meslin F., Hamaï A., Gao P., et al. Silencing of Prion Protein Sensitizes Breast Adriamycin-Resistant Carcinoma Cells to TRAIL-Mediated Cell Death. *Cancer Research*. 2007, 67(22), 10910-10919.
 74. Park J.-Y., Jeong J.-K., Lee J.-H., et al. Induction of cellular prion protein (PrPc) under hypoxia inhibits apoptosis caused by TRAIL treatment. *Oncotarget*. 2015, 6(7), 5342-5353.
 75. Boellaard J. W., Kao M., Schlote W., Diringer H. Neuronal autophagy in experimental scrapie. *Acta Neuropathol*. 1991, 82(3), 225-228.
 76. Boellaard J. W., Schlote W., Tateishi J. Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. *Acta Neuropathol*. 1989, 78(4), 410-418.
 77. Oh J.-M., Shin H.-Y., Park S.-J., et al. The involvement of cellular prion protein in the autophagy pathway in neuronal cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2008, 39(2), 238-247.

78. Oh J.-M., Choi E.-K., Carp R. I., Kim Y.-S. Oxidative stress impairs autophagic flux in prion protein-deficient hippocampal cells. *Autophagy*. 2012, 8(10), 1448-1461.
79. Shin H.-Y., Park J.-H., Carp R. I., Choi E.-K., Kim Y.-S. Deficiency of prion protein induces impaired autophagic flux in neurons. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2014, 6.
80. Nah J., Pyo J.-O., Jung S., et al. BECN1/Beclin 1 is recruited into lipid rafts by prion to activate autophagy in response to amyloid β 42. *Autophagy*. 2013, 9(12), 2009-2021.
81. Pan Y., Zhao L., Liang J., et al. Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer. *The FASEB Journal*. 2006, 20(11), 1886-1888.
82. Du L., Rao G., Wang H., et al. CD44-Positive Cancer Stem Cells Expressing Cellular Prion Protein Contribute to Metastatic Capacity in Colorectal Cancer. *Cancer Research*. 2013, 73(8), 2682-2694.
83. Déry M.-A., Jodoin J., Ursini-Siegel J., et al. Endoplasmic reticulum stress induces PRNP prion protein gene expression in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2013, 15(2), R22.
84. Déry M.-A., LeBlanc A. C. Luman contributes to brefeldin A-induced prion protein gene expression by interacting with the ERSE26 element. *Scientific Reports*. 2017, 7(1), 42285.
85. Li C., Yu S., Nakamura F., et al. Binding of pro-prion to filamin A disrupts cytoskeleton and correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2009, 119(9), 2725-2736.
86. Yang L., Gao Z., Hu L., et al. Glycosylphosphatidylinositol Anchor Modification Machinery Deficiency Is Responsible for the Formation of Pro-Prion Protein (PrP) in BxPC-3 Protein and Increases Cancer Cell Motility. *Journal of Biological Chemistry*. 2016, 291(8), 3905-3917.
87. Wu G.-R., Mu T.-C., Gao Z.-X., Wang J., Sy M.-S., Li C.-Y. Prion protein is required for tumor necrosis factor α (TNF α)-triggered nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling and cytokine production. *Journal of Biological Chemistry*. 2017, 292(46), 18747-18759.
88. Sauer H., Wefer K., Vetrugno V., et al. Regulation of intrinsic prion protein by growth factors and tnfr- α : the role of intracellular reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003, 35(6), 586-594.
89. Lee J. H., Yun C. W., Han Y.-S., et al. Melatonin and 5-fluorouracil co-suppress colon cancer stem cells by regulating cellular prion protein-Oct4 axis. *Journal of Pineal Research*. 2018, 65(4), e12519.
90. Yun C. W., Kim S., Lee J. H., Lee S. H. Melatonin Promotes Apoptosis of Colorectal Cancer Cells via Superoxide-mediated ER Stress by Inhibiting Cellular Prion Protein Expression. *Anticancer Research*. 2018, 38(7), 3951-3960.
91. Yun C. W., Yun S., Lee J. H., et al. Silencing Prion Protein in HT29 Human Colorectal Cancer Cells Enhances Anticancer Response to Fucoidan. *Anticancer Research*. 2016, 36(9), 4449-4458.
92. Li Q.-Q., Cao X.-X., Xu J.-D., et al. The role of P-glycoprotein/cellular prion protein interaction in multidrug-resistant breast cancer cells treated with paclitaxel. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009, 66(3), 504-515.
93. Kiefer P. E., Bepler G., Kubasch M., Havemann K. Amplification and expression of protooncogenes in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Research*. 1987, 47(23), 6236-6242.

94. Schardt C., Rotsch M., Erbil C., Göke R., Richter G., Havemann K. Characterization of Insulin-like Growth Factor II Receptors in Human Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Experimental Cell Research*. 1993, 204, 22-29.
95. Rygaard K., Spang-Thomsen M., Vindelø L. L. Expression of myc family oncoproteins in small-cell lung-cancer cell lines and xenografts. *International Journal of Cancer*. 1993, 54(1), 144-152.
96. Mirski S. E. L., Gerlach J. H., Cole S. P. C. Multidrug Resistance in a Human Small Cell Lung Cancer Cell Line Selected in Adriamycin. *Cancer Research*. 1987, 47, 2594-2598.
97. Hipfner D. R., Gauldie S. D., Deeley R. G., Cole S. P. C. Detection of the Mr 190,000 Multidrug Resistance Protein, MRP, with Monoclonal Antibodies. *Cancer Research*. 1994, 54, 5788-5792.
98. Zhang W., Xu H. Tailoring the RNAi efficiency of polyplexes. *Bioengineered*. 2014, 5(3), 152-154.
99. Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001, 411(6836), 494-498.
100. Aranda P. S., LaJoie D. M., Jorcyk C. L. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *ELECTROPHORESIS*. 2012, 33(2), 366-369.
101. Kahnert K., Kauffmann-Guerrero D., Huber R. M. SCLC—State of the Art and What Does the Future Have in Store? *Clinical Lung Cancer*. 2016, 17(5), 325-333.
102. Koinis F., Kotsakis A., Georgoulas V. Small cell lung cancer (SCLC): no treatment advances in recent years. *Translational lung cancer research*. 2016, 5(1), 12.
103. Butt A. M., Amin M. C. I. M., Katas H., Abdul Murad N. A., Jamal R., Kesharwani P. Doxorubicin and siRNA Codelivery via Chitosan-Coated pH-Responsive Mixed Micellar Polyplexes for Enhanced Cancer Therapy in Multidrug-Resistant Tumors. *Molecular Pharmaceutics*. 2016, 13(12), 4179-4190.
104. Cheng W., Liang C., Wang X., et al. A drug-self-gated and tumor microenvironment-responsive mesoporous silica vehicle: “four-in-one” versatile nanomedicine for targeted multidrug-resistant cancer therapy. *Nanoscale*. 2017, 9(43), 17063-17073.
105. Peng J., Wang Q., Liu H., Ye M., Wu X., Guo L. EPHA3 regulates the multidrug resistance of small cell lung cancer via the PI3K/BMX/STAT3 signaling pathway. *Tumor Biology*. 2016, 37(9), 11959-11971.
106. Tang Y., Soroush F., Tong Z., Kiani M., Wang B. Targeted multidrug delivery system to overcome chemoresistance in breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, 12, 671-681.
107. Wang J., Seebacher N., Shi H., Kan Q., Duan Z. Novel strategies to prevent the development of multidrug resistance (MDR) in cancer. *Oncotarget*. 2017, 8(48), 84559-84571.
108. Zhao Y., You H., Liu F., et al. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells. *Cancer Letters*. 2002, 185(2), 211-218.
109. Liang J., Ge F., Guo C., et al. Inhibition of PI3K/Akt partially leads to the inhibition of PrPC-induced drug resistance in gastric cancer cells. *FEBS Journal*. 2009, 276(3), 685-694.

110. Cheng Y., Tao L., Xu J., et al. CD44/Cellular prion protein interact in multidrug resistant breast cancer cells and correlate with responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Molecular Carcinogenesis*. 2014, 53(9), 686-697.
111. Bruynzeel A. M. E., Abou El Hassan M. A., Torun E., Bast A., van der Vijgh W. J. F., Kruyt F. A. E. Caspase-dependent and -independent suppression of apoptosis by monoHER in Doxorubicin treated cells. *British Journal of Cancer*. 2007, 96(3), 450-456.
112. Roucou X., Giannopoulos P. N., Zhang Y., Jodoin J., Goodyer C. G., LeBlanc A. Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells. *Cell Death & Differentiation*. 2005, 12(7), 783-795.
113. Du J., Pan Y., Shi Y., et al. Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. *International Journal of Cancer*. 2005, 113(2), 213-220.
114. Barbieri G., Palumbo S., Gabrusiewicz K., et al. Silencing of cellular prion protein (PrPC) expression by DNA-antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells. *Autophagy*. 2011, 7(8), 840-853.
115. Mayr L., Pirker C., Lötsch D., et al. CD44 drives aggressiveness and chemoresistance of a metastatic human osteosarcoma xenograft model. *Oncotarget*. 2017, 8(69), 114095-114108.
116. Pokharel D., Padula M., Lu J., Jaiswal R., Djordjevic S., Bebawy M. The Role of CD44 and ERM Proteins in Expression and Functionality of P-glycoprotein in Breast Cancer Cells. *Molecules*. 2016, 21(3), 290.
117. Mahalingaiah P. K. S., Singh K. P. Chronic Oxidative Stress Increases Growth and Tumorigenic Potential of MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2014, 9(1), e87371.
118. Hiraga T., Nakamura H. Comparable roles of CD44v8-10 and CD44s in the development of bone metastases in a mouse model. *Oncology Letters*. 2016, 12(4), 2962-2969.
119. Yoshida G. J., Saya H. Inversed relationship between CD44 variant and c-Myc due to oxidative stress-induced canonical Wnt activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014, 443(2), 622-627.
120. Chieng C. K.-L., Say Y.-H. Cellular prion protein contributes to LS 174T colon cancer cell carcinogenesis by increasing invasiveness and resistance against doxorubicin-induced apoptosis. *Tumor Biology*. 2015, 36(10), 8107-8120.
121. Wiegman A. P., Saunus J. M., Ham S., et al. Secreted cellular prion protein binds doxorubicin and correlates with anthracycline resistance in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation Insight*. 2019, 4(6), e124092.
122. Yadav R. K., Chae S.-W., Kim H.-R., Chae H. J. Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer. *Journal of Cancer Prevention*. 2014, 19(2), 75-88.
123. Urrea H., Dufey E., Avril T., Chevet E., Hetz C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends in Cancer*. 2016, 2(5), 252-262.
124. Sroda-Pomianek K., Michalak K., Palko-Labuz A., et al. The Combined Use of Phenothiazines and Statins Strongly Affects Doxorubicin-Resistance, Apoptosis, and Cox-2 Activity in Colon Cancer Cells. *International Journal of Molecular Science*. 2019, 20(4).
125. Chen C., Lu L., Yan S., et al. Autophagy and doxorubicin resistance in cancer. *Anti-Cancer Drugs*. 2018, 29(1), 1-9.

126. Nie T., Yang S., Ma H., et al. Regulation of ER stress-induced autophagy by GSK3 β -TIP60-ULK1 pathway. *Cell Death & Disease*. 2016, 7(12), e2563-e2563.
127. Song S., Tan J., Miao Y., Zhang Q. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *Journal of Cellular Physiology*. 2018, 233(5), 3867-3874.
128. Öztel Z. Prion Protein Anlatımı Baskılanmış İlaça Dirençli H69 Hücre Hattında Hücre Ölüm Tiplerinin Araştırılması. Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji, Manisa, 2018, 98. (Yüksek Lisans Tezi)
129. Cole S., Bhardwaj G., Gerlach J., et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992, 258(5088), 1650-1654.
130. Slovak M. L., Ho J. P., Bhardwaj G., Kurz E. U., Deeley R. G., Cole S. P. C. Localization of a Novel Multidrug Resistance-associated Gene in the HT1080/DR4 and H69AR Human Tumor Cell Lines. *Cancer Research*. 53, 3221-3225.
131. Smith A. G., Macleod K. F. Autophagy, cancer stem cells and drug resistance: Autophagy in stem cells and drug resistance. *The Journal of Pathology*. 2019, 247(5), 708-718.
132. Speth P. A. J., van Hoesel Q. G. C. M., Haanen C. Clinical Pharmacokinetics of Doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics*. 1988, 15(1), 15-31.
133. Mohajeri M., Sahebkar A. Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2018, 122, 30-51.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hayrettin KADINŞAH

Doğum Yeri ve Yılı : Ahmetli/MANİSA, 1993

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : hyrttnkdnsh@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Ahmet Avcı Anadolu Öğretmen Lisesi, Eşme/UŞAK 2007-2011

Lisans : Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 2011-2015

Yüksek Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı 2015-2019