

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA TRAIL VE BORTEZOMİB'İN  
APOPTOZ YOLAĞI GENLERİNİN mRNA VE PROTEİN EKSPRESYONLARI  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Mehmet Ali ERKOÇ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ABD DOKTORA PROGRAMI**

**DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Davut ALPTEKİN**

**ADANA-2018**

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNSAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA TRAIL VE BORTEZOMİB'İN  
APOPTOZ YOLAĞI GENLERİNİN mRNA VE PROTEİN EKSPRESYONLARI  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Mehmet Ali ERKOÇ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ABD DOKTORA PROGRAMI**

**DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Davut ALPTEKİN**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından  
TDK-2015-2609 no'lu proje olarak desteklenmiştir.**

**Tez No:**

**ADANA-2018**

## KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan  
“İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında TRAIL ve Bortezomib'in Apoptoz Yolağı  
Genlerinin mRNA ve Protein Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Araştırılması” adlı  
çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

03/08/2018

### TEZ SINAV JÜRİSİ

**Prof.Dr. Davut ALPTEKİN**  
Çukurova Üniversitesi  
Başkan

**Prof.Dr. H. Ümit LÜLEYAP**  
Çukurova Üniversitesi  
Üye

**Prof.Dr. İ. Oğuz KARA**  
Çukurova Üniversitesi  
Üye

**Prof.Dr. Etem AKBAŞ**  
Mersin Üniversitesi  
Üye

**Dr. Öğr. Üyesi M. Ertan AY**  
Mersin Üniversitesi  
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun ...../...../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile  
kabul edilmiştir.

**Prof.Dr. Behice DURGUN**  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## **TEŞEKKÜR**

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Davut Alptekin'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Doktora eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazımında her türlü desteklerinden dolayı Doç. Dr. M. Bertan Yılmaz'a özellikle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TDK-2015-2609 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Son olarak manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürler.

## **ETİK KURUL KARARI**



## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY</b>	iii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iv
<b>ETİK KURUL KARARI</b>	v
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	ix
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	x
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xii
<b>ÖZET</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	2
2.1. Akciğer Kanseri	2
2.1.1. Tanım	2
2.1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji	2
2.1.3. Patoloji, Patogenez ve Patofizyoloji	4
2.2. Apoptoz	6
2.2.1. Tanım	6
2.2.2. Apoptoz Yolakları	7
2.2.3. TRAIL Apoptoz Yolağı	8
2.2.3.1. TRAIL ve DISC Kompleksi	11
2.2.3.2. TRAIL ve Bcl-2 Ailesi	12
2.2.3.3. TRAIL ve NF-κB Yolağı	14
2.2.3.4. TRAIL Yolağı ve Bortezomib İlişkisi	16
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	20
3.1. Araç ve Gereçler	20
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	20
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	21
3.2 Yöntem	23
3.2.1. Hücre Kültürü	24

3.2.1.1 Hücre Kültürü ve Alt kültür	24
3.2.1.2 Hücrelerin 6-well plate'e aktarılması	24
3.2.2. Hücre hattı gruplarına rTRAIL ve Bortezomib uygulanması	25
3.2.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	27
3.2.4. Real Time PCR Reaksiyonları	29
3.2.5. Protein İzolasyonu	32
3.2.6. Western Blot Deneyleri	33
3.2.7. Hücre Canlılık Testi	34
3.2.8. Apoptoz Assay	35
3.2.9. İstatistiksel Analiz	36
<b>4. BULGULAR</b>	37
4.1. Real Time PCR Sonuçları	37
4.2. Western Blot Sonuçları	51
4.2.1. TRAIL Protein Sonuçları	51
4.2.2. TRAIL-R1 (DR4) protein sonuçları	51
4.2.3. TRAIL-R2 (DR5) protein sonuçları	52
4.2.4. TRAIL-R3 (DcR1) protein sonuçları	53
4.2.5. TRAIL-R4 (DcR2) protein sonuçları	54
4.2.6. Osteoprotegerin (OPG) protein sonuçları	55
4.2.7. NFKB protein sonuçları	56
4.2.8. BCL-2 protein sonuçları	57
4.2.9. BAX protein sonuçları	58
4.2.10. BCL-XL protein sonuçları	59
4.3. Hücre Canlılık Testi (Cell Viability Assay) ve Flow Sitometri Sonuçları	60
<b>5. TARTIŞMA</b>	62
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	69
<b>7. KAYNAKLAR</b>	73
EKLER	83
ÖZGEÇMİŞ	85

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1</b>	TRAIL Apoptoz yolağı	9
<b>Şekil 3.1</b>	Deney akış şeması	23
<b>Şekil 3.2</b>	Örnek 6-well plate şablonu	25
<b>Şekil 4.1</b>	TRAIL western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	51
<b>Şekil 4.2</b>	TRAIL western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	52
<b>Şekil 4.3</b>	TRAIL-R2 western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	53
<b>Şekil 4.4</b>	TRAIL-R3 western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	54
<b>Şekil 4.5</b>	TRAIL-R4 western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	55
<b>Şekil 4.6</b>	OPG western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	56
<b>Şekil 4.7</b>	NFKB western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	57
<b>Şekil 4.8</b>	Bcl-2 western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	58
<b>Şekil 4.9</b>	Bax western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	59
<b>Şekil 4.10</b>	Bcl-XL western blot görüntüsü ve protein seviyesi grafiğı	60
<b>Şekil 4.11</b>	Canlı ve ölü hücrelerin mikroskop altındaki görüntüsü	60



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1</b>	Uygulanan TRAIL ve Bortezomib konsantrasyonları	26
<b>Çizelge 3.2</b>	Master mix için kullanılan bileşenler ve miktarları	28
<b>Çizelge 3.3</b>	cDNA sentezi için kullanılan sıcaklıklar	29
<b>Çizelge 3.4</b>	Ekspresyon seviyesi belirlenen genler	29
<b>Çizelge 3.5</b>	Kullanılan primerler	30
<b>Çizelge 3.6</b>	Real Time PCR reaksiyon bileşenleri	31
<b>Çizelge 3.7</b>	Real Time PCR ısı döngüleri	31
<b>Çizelge 3.8</b>	Resolving Jel	33
<b>Çizelge 3.9</b>	Stacking Jel	33
<b>Çizelge 4.1</b>	Real Time PCR sonuçları ile ilgili bilgiler	37
<b>Çizelge 4.2</b>	Real Time PCR sonuçları ile ilgili bilgiler	38
<b>Çizelge 4.3</b>	Real Time PCR sonuçları ile ilgili bilgiler	38
<b>Çizelge 4.4</b>	Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri.	39
<b>Çizelge 4.5</b>	Örnek 2 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	40
<b>Çizelge 4.6</b>	Örnek 3 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	41
<b>Çizelge 4.7</b>	Örnek 4 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	42
<b>Çizelge 4.8</b>	Örnek 5 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	43
<b>Çizelge 4.9</b>	Örnek 6 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	44
<b>Çizelge 4.10</b>	Örnek 7 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	45
<b>Çizelge 4.11</b>	Örnek 8 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	46
<b>Çizelge 4.12</b>	Örnek 9 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	47
<b>Çizelge 4.13</b>	Örnek 10 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	48
<b>Çizelge 4.14</b>	Örnek 11 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	49
<b>Çizelge 4.15</b>	Örnek 12 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri	50
<b>Çizelge 4.16</b>	Bortezomib uygulamaları sonrası hücre canlılık oranlarının histogram grafiği	61

**Çizelge 4.17** Çizelge 4.12: Bortezomib uygulamaları sonrası apoptotik hücre oranı (%) 61



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>BSA</b>	Bovin Serum Albumine
<b>CD8+T</b>	Sitotoksik T Hücresi
<b>cDNA</b>	Complementer DNA
<b>cFLIP</b>	FLICE benzeri inhibitör protein
<b>DcR1</b>	TRAIL Reseptörü 3
<b>DcR2</b>	TRAIL Reseptörü 4
<b>DISC</b>	Death-Inducing Signaling Complex
<b>dk</b>	Dakika
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DR4</b>	TRAIL Reseptörü 1
<b>DR5</b>	TRAIL Reseptörü 2
<b>EDTA</b>	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FADD</b>	Ölüm Domaini İçeren Fas-ilişkili Protein
<b>Fas L</b>	Fas Ligand
<b>Fas R</b>	Fas Reseptörü
<b>FBS</b>	Fetal Bovin Serum
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>g</b>	Gram
<b>GAPDH</b>	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrejenaz
<b>IAP</b>	Apoptoz İnhibitör Protein
<b>IKB</b>	Kappa B inhibitörü
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>KOAH</b>	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
<b>L</b>	Litre
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar

<b>MPER</b>	Mammalian Protein Extraction Reagent
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>NFKB</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>ng</b>	Nanogram
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NSCLC</b>	Non-small Cell Lung Carcinoma
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PI</b>	Propidium İyodür
<b>RPM</b>	Rotatiton Per Minute
<b>rTRAIL</b>	Rekombinant TRAIL
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>sn</b>	Saniye
<b>TBS</b>	Tris Buffered Saline
<b>TBS-T</b>	Tris Buffered Saline Tween-20
<b>TNF</b>	Tümör Nekroz Faktör
<b>TNF-a</b>	Tümör Nekroz Faktör Alfa
<b>TNFR1</b>	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü 1
<b>TRADD</b>	TNF receptör-1 ilişkili ölüm domaini
<b>TRAIL</b>	TNF-ilişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
<b>XIAP</b>	x-linked apoptoz inhibitörü
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>BSA</b>	Bovin Serum Albumine

## ÖZET

### İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattında TRAIL ve Bortezomib'in Apoptoz Yolağı Genlerinin mRNA ve Protein Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Akciğer kanseri görülme sıklığı ve mortalitesi en yüksek oranda görülen bir hastalıktır. Uzun yıllardır yapılan çalışmalarda çoğu akciğer kanserinde kullanılan tedaviler başarısız olmuştur.

Bu çalışmada; küçük hücreli akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücrelerinde, TNF-bağımlı apoptoz-uyarıcı ligand (TRAIL) ile uyarılan apoptoz yolağında görev alan genlerin ekspresyon profillerinin ve bu genlerle ilgili protein miktarlarının incelenmesi; rekombinant TRAIL (rTRAIL) ve Bortezomib antitümör ajanların çeşitli kombinasyonlarının bu yolak gen ekspresyonunu ve protein miktarlarını nasıl etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Amacımıza yönelik olarak insan akciğer kanser hücre hattı (A549)'nın hücre kültürleri yapılmış, hücre kültürleri 3 gruba ayrılarak sürdürülmüştür. İlk grup kontrol grubudur. İkinci gruba dışardan rekombinant TRAIL proteini (rTRAIL) uygulaması yapılmış, üçüncü grup ise rTRAIL ve Bortezomib ile muamele edilmiştir. Bunun sonucunda TRAIL bağımlı apoptoz yolağında görevli genlerin ekspresyon düzeyleri ve protein seviyeleri belirlenmiştir. TRAIL bağımlı apoptoz yolağında görev alan genlerin ekspresyon düzeyleri Real Time PCR, protein seviyeleri ise Western Blot yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca kültür hücrelerinde apoptoz oranı apoptoz assayle kontrol edilmiştir.

Çalışmamızda TRAIL ve Bortezomib uygulaması yapılan hücrelerde TRAIL, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, OPG, Bcl-2, Bax, Bcl-XL genlerinin RNA ve protein ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Gen ekspresyonu, NSCLC, Real Time PCR, TRAIL, Western Blot

## **ABSTRACT**

### **Researching Effects of TRAIL and Bortezomib on Apoptosis Pathway Genes mRNA and Protein Expressions Human Lung Cancer Cell Line**

**Lung cancer is the most common disease with the highest incidence and mortality rate. Many years of studies have failed in most lung cancer treatments.**

**In this study; examination of the expression profiles of genes involved in the apoptosis pathway induced by the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and the genes related to these genes in A549 cells. The aim of this study was to determine how various combinations of recombinant TRAIL (rTRAIL) and Bortezomib antitumor agents affected this pathway gene expression and protein quantities. For this purpose, expression and protein profiles of TRAIL-related apoptosis pathways were investigated which is plays important role on pathogenesis of lung cancer. Also effects of antitumoral agents TRAIL and Bortezomib has been investigated on apoptosis pathway. Human lung cancer cell line (A549) cell cultures was make fora aim of the study and, the cell cultures divided into 3 groups; first group is control, TRAIL protein applied externally to the second group, TRAIL protein and Bortezomib applied to the third group. Then, protein and expression levels of genes, which are functionary in apoptosis pathway, determined by Western Blot method. Ratio of apoptosis controlled by apoptosis assays. The aim of study is to acquire more information about effect of apoptosis pathway dependent TRAIL induced on obtained data in emphysema and lung cancer and effects of antitumoral agents on apoptosis pathways.**

**In our study, no significant statistical difference were observed between the control and treatment groups for TRAIL, TRAIL- R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, OPG, Bcl-2, Bax, Bcl-XL gene and protein expressions.**

**Key Words: Gene expression, NSCLC, Real Time PCR, TRAIL, Western Blot**

# 1. GİRİŞ

Akciğer kanseri görülme sıklığı ve mortalitesi en yüksek oranda görülen bir hastalıktır. Uzun yıllardır yapılan çalışmalarda çoğu akciğer kanserinde kullanılan tedaviler başarısız olmuştur. Akciğer kanserleri histolojik özelliklerine göre iki ana gruba ayrılabilirler: Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC; örneğin adenokarsinom, skuamoz hücre karsinomu ve büyük hücreli karsinoma gibi). Akciğer kanser vakalarının %85’den fazlasını NSCLC oluşturmaktadır ve bu vakaların yaklaşık %40’ına cerrahi olarak müdahale edilememektedir (1-6).

Yapılan çalışmalarda kanser hücre türlerinin %50’den fazlasının TRAIL-bağımlı apoptoz yoluna dirençli olduğu gösterilmiştir. Farklı çalışmalar TRAIL bağımlı apoptoz yolu direnciyle aşağı yolak proteinler arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (7-10). Örneğin Bcl-2’nin aşırı ekspresyonu ile TRAIL bağımlı apoptoz inhibisyonu ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda dirençli hücrelerin kemoterapötik ajanlarla muamele sonrası daha duyarlı hale geldiği gösterilmiştir(10-13). Son zamanlarda çeşitli tümör hücre tiplerinde Bortezomib gibi proteozom inhibitörleriyle TRAIL’in çeşitli kombinasyonlarının, TRAIL ile uyarılan apoptoza duyarlılık sağladığı rapor edilmiştir (10-13).

Bu Tez çalışmasında; küçük hücreli akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücrelerinde, TNF-bağımlı apoptoz-uyarıcı ligand (TRAIL) ile uyarılan apoptoz yolunda görev alan genlerin ekspresyon profillerinin ve bu genlerle ilgili protein miktarlarının incelenmesi; rekombinant TRAIL (rTRAIL) ve Bortezomib antitümör ajanların çeşitli kombinasyonlarının bu yolak gen ekspresyonunu ve protein miktarlarını nasıl etkilendiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Akciğer Kanseri**

#### **2.1.1. Tanım**

Akciğer kanseri histolojik olarak SCLC ve NSCLC olarak iki sınıfa ayrılır. Akciğer kanserinin en yaygın semptomları öksürük, nefes darlığı, solunum güçlüğü ve kilo kaybı gibi sistemik semptomlardır. NSCLC akciğer dokusundan kaynaklanan üç tip kanserden oluşmaktadır. Bu üç tip kanser adenokarsinoma, skuamoz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur (1).

#### **2.1.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji**

Akciğer kanseri dünya çapında kanser kaynaklı ölümlerin başında gelmektedir. Amerika'da yapılan istatistiklere göre her yıl prostat, meme ve kolon kanserinin toplamından daha fazla sayıda insan akciğer kanseri sebebiyle ölmektedir. Akciğer kanseri dünya çapında 1985'den beri en yaygın kanser türüdür; aynı şekilde görülme sıklığı ve ölüm oranı en yüksek kanser türüdür. Gelişmekte olan ülkelerde görülen vakalarda diğer ülkelere göre bir bir artış görülmektedir. Akciğer kanseri vakaları 1985 yılına göre %51 artış göstermiştir (6, 9).

Nöroendokrin karakteristikte hücrelerden meydana gelen ve yüksek derecede malignant olan SCLC, vakaların %15'ini oluşturur. Diğer bir grup olan NSCLC; adenokarsinoma, skuamoz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinoma olarak üç alt gruba ayrılır. Tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %38'lik kısmını Adenokarsinoma, %20'kısını skuamoz hücreli karsinoma, %3'lük kısmını büyük hücreli karsinoma oluşturmaktadır (6-7). Son birkaç 10 yıllık sürede adenokarsinoma görülme sıklığı büyük bir artış göstererek en çok görülen NSCLC türü olarak skuamoz hücreli karsinomunun yerini almıştır. 2001-2007 yılları arasında Amerika'da yapılan istatistiklere göre akciğer kanserinin 5 yıllık hayatta kalma oranı %15,6'dır (9).



Sigara içiminin yaşa bağlı ölüm oranını erkeklerde %70, kadınlarda biraz daha az oranda artırması ile ilişkilendirilmiştir. Aynı şekilde sigara içimi erkeklerde akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Sigara içimi akciğer kanseri oluşumuna neden olan diğer faktörlere göre ağır basmaktadır. Akciğer kanseri riski sigara içimi boyunca artış göstermektedir ve günlük olarak kaç sigara içildiğiyle ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda ortalama miktarda sigara içen erkeklerde akciğer kanseri riskinin 9-10 kat arttığı, ağır içicilerde ise 20 kat arttığı bulunmuştur (7-9).

Sigara dumanı çeşitli gazlardan ve partiküllerden oluşan kompleks bir bileşiktir. Sigara dumanı ana duman ve yan akım dumanı olarak iki bileşenden oluşmaktadır. Ana duman sigaranın soluma yoluyla hava yoluna doğru giden dumandır ve sigara içen bireyin maruz kaldığı ana dumandır. Yan akım dumanı ise sigaranın soluma aralarında için için yanmasıyla oluşur. Sigara dumanından nikotin ve suyun çıkarılmasından sonra geriye kalan katı parçacıklar katranı oluşturur (6-8). Katran ile maruziyetin akciğer kanser riskinin ana kaynağı olduğu düşünülmektedir. Ana dumanın bileşimi sigara içen bireyin soluma yoğunluğu, filtre türü, soluma hızı gibi farklı etmenler yüzünden çok farklılık göstermektedir. Sigara dumanı 4000'den fazla farklı kimyasal içermektedir. Ana sigara dumanı polisiklik aromatik karbonlar (PAH), aromatik aminler, N-nitrözaminler gibi potansiyel karsinojenler ile benzen, vinil klorit, arsenik ve kromium gibi inorganik kimyasallar içerir. PAH'lar ve N-nitrözaminler metabolik olarak aktivasyon sonucu karsinojen hale gelirler. Aynı zamanda metabolik olarak detoksifikasyonla bu bileşenler uzaklaştırılır. Bu aktivasyon-detoksifikasyon arasındaki denge bireysel kanser riskini oluşturur (6-8).

Tütüne özgü bulunan N-nitrözamin gibi karsinojenler ve sigara dumanında bulunan PAH'lar DNA'ya kovalent olarak bağlanarak DNA eklentileri oluştururlar. DNA tamir mekanizmaları sırasında bu eklentiler uzaklaştırılabilir veya hasar görmüş hücreler apoptoza yönlendirilir. DNA tamir mekanizmalarının bu eklentileri çıkarmakta başarısız olması sonucu kalıcı mutasyonlar ortaya çıkabilir. N-nitrözaminler kritik onkogenleri düzenleyen mekanizmaları etkileyerek aktivasyona yol açabilir; bunun sonucunda kontrolsüz hücre çoğalması ve tümörögeneze yol açabilir (6-8).

Sigara içen 9 bireyden bir tanesinde akciğer kanseri gelişmektedir. Uzun süreli sigara içen bireylerde hiç sigara içmemiş bireylere göre akciğer kanseri oluşma riskinin 10-30 kat arttığı öne sürülmüştür (7). Ağır içiciler arasında akciğer kanseri gelişme riski %30 gibi yüksek bir oranda iken, bu risk hiç sigara içmeyen kişilerde %1'den azdır (9). Akciğer kanseri gelişme riski günlük sigara tüketimi, sigaraya başlama yaşı, sigara solunum derecesi, sigaranın nikotin ve katran oranı, filtresiz sigara kullanıp kullanmama gibi birçok faktöre göre değişmektedir. Sigara içen bütün bireylerde akciğer kanseri gelişimi görülmemesi, kansere yatkınlığın genetik faktörler gibi diğer faktörlerden etkilendiğini ortaya koymaktadır(1,3, 7).

Sonuç olarak akciğer kanseri ölümlerinin büyük bir çoğunluğunun sigara içimi olduğu görüşü yadsınamaz ve sigara içme oranlarının azaltılması zorunludur. Akciğer kanserinin epidemiyolojisini ve nedensel faktörlerini anlamak, hastalığın önlenmesi için ek bir temel sağlayabilir. Akciğer kanserinde tütünün etiyolojik faktör olarak rolü, iyonlaştırıcı radyasyon ve belirli mesleki maruziyetlerin kanserojen olarak kabul edilmesi gibi inandırıcı şekilde belirlenmiştir (1-2, 6-8).

### **2.1.3. Patoloji, Patogenez ve Patofizyoloji**

Akciğer kanserleri histolojik özelliklerine göre iki ana gruba ayrılabilirler: SCLC ve NSCLC (örneğin adenokarsinoma, skuamoz hücre karsinomu ve büyük hücreli karsinoma). Akciğer kanser vakalarının %85'ini NSCLC oluşturmaktadır ve bu vakaların yaklaşık %40'ına cerrahi olarak müdahale edilememektedir (9). Adenokarsinoma ilk olarak akciğerlerin periferik veya dış bölgelerinde görülen ve yavaş büyüyen bir kanser türüdür. Sıklıkla sigara içimiyle meydana gelir fakat sigara içmeyen kişilerde de yaygın görülen bir kanser türüdür. Skuamoz hücreli karsinom genellikle akciğerlerin merkezinde ortaya çıkar ve sigara içen bireylerde gelişir. Büyük hücreli karsinom ise akciğer dokusunun herhangi bir bölgesinde gelişir ve diğer kanser türlerine göre daha hızlı gelişim gösterir. NSCLC akciğer kanserlerinin %80-85'ini oluşturmaktadır (10-12). SCLC neredeyse her zaman bronş ve havayollarının merkezinde görülmesi ve sigara kullanmayan bireylerde nadiren

görülmesi ile NSCLC'dan ayrılır. SCLC diğer organlara NSCLC'ya göre diğer organlara daha hızlı metastaz yapar ve mikroskobik olarak daha küçük hücrelerden oluşmaktadır. Metastaz yapmış NSCLC'ye göre SCLC tedavi edilmezse birkaç hafta içinde ölümcül olabilir.

Akciğer kanserinin patogenezi diğer kanser türlerindeki gibi karsinojenle karşılaşma sonrası başlangıç, bunu takiben uzun periyotta gelişim ve çok basamaklı bir seyir hali görülür. Sigara içiminin akciğer kanserinin en büyük nedeni olduğu düşünülmektedir. Sigara içimi karsinogenezi başlatır ve ilerlemesini teşvik eder. Sigara içimi akciğer epitelyumunda alan etkisi yaratır, başlatıcı hücrelerin oluşmasının ve transformasyon olasılığının artmasına sebep olur. Devam eden sigara maruziyeti kronik iritasyon ve sigara dumanında bulunan teşvik ediciler (nikotin, fenol ve formaldehit) sebebiyle yeni mutasyonların birikmesine sebep olur(12). Sigara içimiyle kanser oluşumu arasında tipik olarak uzun bir süre vardır, kanser oluşumu için 20-25 yıllık bir süre gereklidir. Kanser riski sigara alışkanlığı bırakıldıktan sonra azalır fakat hâlihazırda bulunan başlatıcı hücreler diğer karsinojenlerin varlığında akciğer kanseri gelişimine sebep olabilir (11-12).

Sigara dumanına maruz kalıp/kalmama sonucu belirli tipte akciğer kanseri gelişim riski veya bireysel olarak biyolojik terapilere cevap verip/vermeme gibi durumlar sebebiyle akciğer kanseri patogenezinde genetik bileşenleri vardır. Genetik yatkınlığa sebep olduğu öne sürülen çok sayıda aday gen çalışması vardır. Bu çalışmalar akciğer dokusunda karsinojenlerin absorpsiyon, metabolizması, tütün veya diğer kaynaklı karsinojenlerin birikmesinde rol oynayan genler üzerine yoğunlaşmıştır (10-12). Örneğin PAH'lar, nitrozaminler ve aromatik aminler gibi bileşiklerin aktivasyonunu sağlayan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizimler ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. Bu bileşenlerin metabolizması faz I enzimleri (oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz) veya faz II (konjugasyon) enzimleri aracılığıyla yapılmaktadır. Sıklıkla çalışılan enzimlerden bazıları sitokrom P450 1A1 (CYP1A1), Glutasyon S-transferaz (GST), mikrozomal epoksit hidrolaz (mEH), miyeloperoksidaz (MPO) ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat kinin oksidoredüktaz (NQO1)'dir. CYP1A1 polimorfizimleri ile akciğer kanser riski arasındaki ilişki tartışmalıdır (12).

## 2.2. Apoptoz

### 2.2.1 Tanım

Apoptoz çok hücreli canlıların gelişiminde ve hücre homeostazisinin sağlanmasında kilit rol oynayan programlı hücre ölümüdür. Apoptoz dokularda gelişim ve yaşlanma sırasında hücre popülasyonlarının kontrol edilmesinde homeostatik mekanizma olarak işleyen normal bir süreçtir. Apoptoz aynı zamanda zararlı etkenler veya hastalık tarafından hasar görmüş hücrelerin elenmesinde veya immün sistem reaksiyonları sonucunda savunma mekanizması olarak kullanılabilir (17-20). Patolojik ve fizyolojik birçok uyarı ve durumun apoptoza zemin hazırlamasına rağmen, bütün hücreler aynı uyarıyla ölüme yönlendirilmek zorunda değildir. Bazı hücreler ilaçlar veya radyasyon gibi DNA hasarı yapan ajanlarla p53 bağımlı yolak üzerinden apoptotik hücre ölümüne yönlendirilebilir. Bazı hücreler Fas ve TNF reseptörleri gibi ligand bağlanan ve hücre içi yolaklarında ki proteinlerle etkileşim halinde olan reseptörler eksprese ederler. Diğer hücre tiplerinde ise hormonlar ve büyüme faktörleri gibi sağ kalma faktörleri tarafından bloke edilmiş hücre ölüm yolları vardır (17-20).

Apoptozun hücrenin fiziksel veya kimyasal ajanlara maruz kalması sonucunda patolojik bir sürecin sonucu olarak hücre ölümüyle sonuçlanan nekrozdan ayrılması gereklidir. Nekroz sırasında membran bütünlüğü bozulur. Mitokondri gibi intraselüler organellerin yapısı bozulur ve bütün hücre içeriği ekstraselüler sıvıya dağılır. Apoptozda ise sitoplazma, organeller, nükleus ve plazma membranında bir seri planlı biyokimyasal değişiklik meydana gelir (14-16). Kromatin kondense hale gelir, nükleusun periferine doğru konumlanır ve nükleus kromatin parçalarını içeren kısımlara ayrılır. Mitokondri zarında apoptozla ilişkili porlar oluşmasına rağmen diğer organeller yapısal olarak bütün halde kalır. Hücre daha yuvarlak hale gelir ve diğer komşu hücrelerden ayrılır. Daha sonra hücre içeriği membran tarafından sarılmış halde apoptotik cisimcikler halinde parçalara bölünür ve fagositozla bu cisimcikler parçalanır (15).

### 2.2.2 Apoptoz Yolakları

Apoptoz yolları iç kaynaklı ve dış kaynaklı olmak üzere iki ana yolağa ayrılabilir. Dış kaynaklı apoptoz sinyal yolağın da, transmembran reseptör aracılı etkileşimlerle apoptoz süreci başlatılır. Bu yolağa katkıda bulunan ölüm reseptörleri Tümör Nekrozis Faktör (TNF) superailesindedir. Bu TNF reseptör ailesi üyeleri sistence zengin benzer bir ekstraselüler bölge içerirler ve ölüm bölgesi olarak adlandırılan 80 amino asitlik sitoplazmik bir bölgeleri vardır. Bu ölüm bölgesinin hücre yüzeyinden, intraselüler sinyal yollarına ölüm sinyalinin iletilmesi gibi kritik bir görevi vardır. Şu an için en iyi bilinen ligand-ölüm reseptörü çiftleri FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4'dür (10-12, 14).

FasL/FasR ve TNF- $\alpha$ /TNFR1 yolları üzerinden dış kaynaklı apoptoz yolağında gerçekleşen bir dizi olay iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Bu modelde homolog trimer ligandına bağlanmış reseptör kümesi vardır. Ligandın reseptöre bağlanması sonucu reseptörün intraselüler ölüm bölgesine bağlanmasıyla sitoplazmadaki adaptör proteinler görev almaya başlar (10-12). Örneğin Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması sonucu FADD adaptör proteininin bağlanmasıyla, TND ligandının TNF reseptörüne bağlanması ise TRADD adaptör proteininin bağlanmasıyla ve FADD ve RIP proteinlerinin reseptöre bağlanmasıyla sonuçlanır. FADD daha sonra ölüm domaininin dimerizasyonu aracılığıyla prokaspaz-8 ile etkileşime girer. Bu noktada ölüm indükleyici sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex, DISC) oluşur ve prokaspaz-8'in kendi kendini katalizlemesiyle otokatalitik aktivasyon gerçekleşir. Kaspaz-8 aktive olduktan sonra apoptozun ileri aşamaları tetiklenmiş olur. cFLIP olarak adlandırılan protein reseptör aracılı apoptozu FADD ve kaspaz-8'e bağlanarak inhibe edebilir (10-15).

İç sinyal yolağı reseptör aracılı olmayan uyarılarla düzenlenen, intraselüler sinyallerin direk hedef üzerinde etkili olduğu ve mitokondri ile apoptozun başlatıldığı bir sinyal yolağıdır. İç yolağı uyaran uyarıcılar pozitif veya negatif bir şekilde etki gösterebilen intraselüler sinyaller üretirler. Negatif sinyaller; büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler gibi belirli sinyallerin yokluğunda apoptozun tetiklenmesine sebep olan hücre ölüm

programlanmasının baskılanmasında bozulmaya yol açar. Radyasyon, hipoksi, hipertermi, toksinler, serbest radikaller ve viral enfeksiyon gibi sınırlı sayıda pozitif sinyaller vardır (12, 14).

Bütün bu uyarıcılar mitokondrinin iç zarındaki bir porun (mitochondrial permability transition pore) açılmasına sebep olur, bunun sonucu olarak mitokondriyal transmembran potansiyeli kaybolur. Daha sonrasında mitokondri hücre membranlarının arasında proapoptotik olarak bulunan iki ana grup proteinin sitosole salınması gerçekleşir. İlk grup kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive eden sitokrom-C, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi proteinleridir. Sitokrom-C apoptozom oluşumuna yol açan Apaf-1 proteinine bağlanarak aktive eder. Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi proteinlerinin IAP'ı (apoptoz inhibitör proteinleri) inhibe ederek apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (10-14).

İkinci grup proapoptotik moleküller apoptoz sırasında mitokondriden salınan AIF, endonükleaz G ve CAD proteinleridir. AIF proteini nükleusa translokasyon yapar ve periferal nükleer kromatinin 50-300 kb arasında fragmentlere ayrılmasında görev alır. Endonükleaz G'de nükleusa transloke olarak kromatinin oligonükleotit DNA fragmentlerine ayrılması için kesim görevi yapar. Daha sonradan mitokondriden salınan CAD proteini ise nükleusta oligo nükleotit DNA fragmentlerinin daha fazla parçalanması ve kondensasyonunda görev alır (10-14).

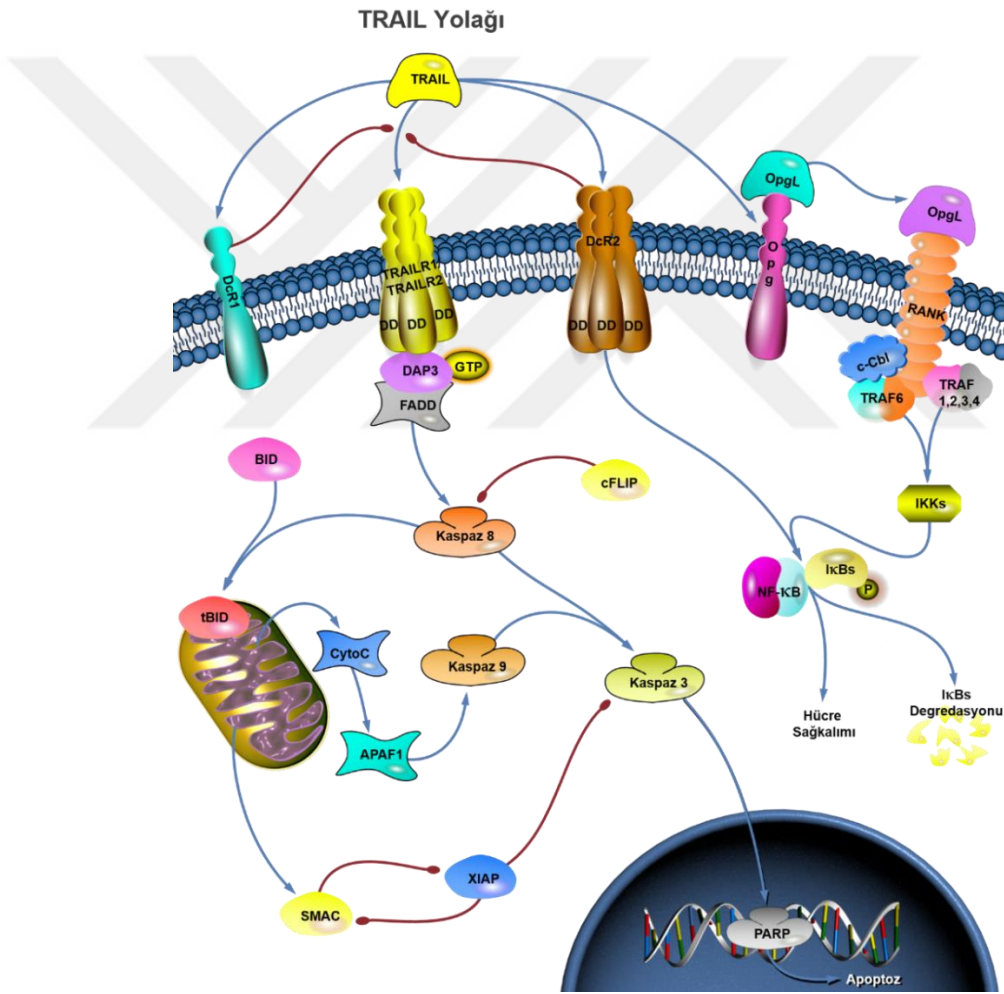
Mitokondriyal apoptotik olayların kontrolü ve düzenlenmesi Bcl-2 ailesi proteinleri ile yapılır. Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol ederek antiapoptotik veya pro-apoptotik olarak görev alabilir. Bcl-2 ailesinde Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG gibi antiapoptotik; Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk gibi pro-apoptotik 25 farklı gen tanımlanmıştır (10-15).

### **2.2.3 TRAIL Apoptoz Yolağı**

TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) veya TNF ailesinin diğer üyeleriyle yüksek homoloji göstermesinden dolayı Apo2L olarak adlandırılan bu protein, hızlı bir şekilde apoptozu uyarabilmektedir (15-17). İnsanlarda 281 aminoasitten meydana

gelir ve kısa bir N-terminal uç ile uzun bir ekstraselüler C-terminal reseptör bölgesi vardır. TRAIL viral ve onkogenik transforme hücrelerin NK ve T hücre aracılı öldürülmesi veya belirli T hücrelerinin homeostazı gibi çoğu immün sistem hücrelerinde eksprese edilir (15-19).

Şekil 2.1: TRAIL Apoptoz yolağı



TRAIL proteini, TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL R2 (DR5) olarak adlandırılan iki reseptöre bağlanabilir. Bunun yanında TRAIL proteini, apoptotik sinyalin iletilmesi görevi üstlenebilen TRAIL-R3 (DcR1) ve TRAIL-R4 (DcR2) olarak adlandırılan hücreye bağlı iki

reseptöre ve osteoprotegerin (OPG) olarak adlandırılan çözünür durumdaki reseptörlere bağlanabilir (15-18).

TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörleri yüksek oranda sekans homolojisi gösterir ve birbirinden farklı fonksiyonları kesin olarak tanımlanmamıştır. Bu reseptörlerin sitoplazmik bölgeleri CD95 ve TNF-R1 proteinleriyle anlamlı bir homoloji gösterdiği rapor edilmiştir ve bu bölgeleri ölüm domaini olarak adlandırılır. Sisteince zengin bölgeler bu reseptörlerin diğer bir ortak özelliğidir. TRAIL-R1'deki bazı mutasyonlar mesane kanseri, kronik lenfositik lökemi ve manto hücreli lenfoma gibi çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir (15-19). TRAIL-R2'nin iki farklı splice varyantı vardır ve birbirinden ekstraselüler domaindeki 23 aminoasitlik farklılık vardır. Bu iki splice varyantının farklı roller üstlenip üstlenmediği bildirilmemiştir. Bu reseptörün p53-bağımlı yolakla upregüle edildiği gösterilmesine rağmen etoposide, proteozom inhibitörleri ve 5-florourasil gibi antikanser ilaçlarıyla p53-bağımsız bir yolakla da upregüle edilebileceği bildirilmiştir (20, 21, 34).

Tuzak reseptörler (Decoy receptor) olarak da adlandırılan TRAIL-R3 (DcR1) ve TRAIL-R4 (DcR2) reseptörleri diğer iki reseptörün aksine apoptotik sinyalin hücre içine iletilmesini gerçekleştirmezler. Her iki reseptör de (DcR1 ve DcR2) apoptoz indükleyici reseptörlerin ekstraselüler bölgeleriyle yüksek oranda sekans homolojisi gösterirler. DcR1 reseptöründe diğer reseptörlerin intraselüler ve transmembran bölgeleri yoktur (23-25). GPI çapasıyla hücre membranına bağlanmış durumdadır. Yapılan çalışmalarda DcR1 reseptörünün aşırı ekspresyonu ile TRAIL-hassas hücrelerde apoptozun engellenebileceği gösterilmiştir. DcR2 reseptöründe apoptozu uyarabilme kapasitesine sahip değildir. DcR1 reseptörünün aksine DcR2 reseptöründe intraselüler ölüm domainin kısa bir parçası vardır. Yapılan çalışmalarda bu reseptörünün aşırı ekspresyonu ile DcR1 reseptörü gibi apoptozu engelleyici rol oynadığı gösterilmiştir. DcR2 reseptörünün Nükleer Faktör Kappa B (NF- $\kappa$ B) gibi antiapoptotik genleri uyararak TRAIL-aracılı apoptozu karşı hücreleri koruyabileceği gösterilmiştir (22-25).

Osteoprotegerin (OPG) diğer reseptörlerin aksine salgılanan bir reseptördür. OPG kemik yeniden yapılanmasında osteoklast hücrelerinin gelişimi ve aktivasyonunda kritik rol



oyun ve bu aktivite TRAIL ile etkileşim sebebiyle değildir. OPG'nin yüksek afinite ile bağlanan ligandı TNF-benzeri sitokin olan TRANCE/RANKL'dir ve bu ligand NF-κB reseptörüne de bağlanır. TRAIL-OPG arasındaki etkileşim henüz net değildir (24-25).

### 2.2.3.1 TRAIL ve DISC Kompleksi

TRAIL proteinin TRAIL-R1 veya TRAIL-R2 reseptörüne bağlanmasıyla ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumu için trimerizasyon gerçekleşir (26). FADD 208 aminoasite sahip bir adaptör proteindir. Trimerizasyon sonucu FADD proteini DISC kompleksine transloke olur ve bu proteinin ölüm domaini TRAIL-R1 veya TRAIL-R2'nin ölüm domainiyle direk etkileşim halindedir. Bu etkileşim sonucu FADD apoptotik sinyalin iletilmesinde kritik rol oynayan prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 ile etkileşim kurarak otokatalitik aktivitelerini tetikler. DISC kompleksinin başlatıcı kaspazları nasıl aktive ettiği tam olarak açıklanamamıştır (26-31).

Bu aktivasyon için güncel olarak 3 hipotez vardır. İndüklenmiş-yakınlık modeli olarak isimlendirilen ilk hipoteze göre; reseptör kompleksinin oluşumu sonrası FADD adaptör proteini, kaspaz zymogen kristalleriyle yakın mesafede olması sebebiyle kaspazların otokatalitik aktivasyonunu tetiklediği görüşünü öne sürmektedir. Dolayısıyla aktive olan bu kaspazlar birbirine yakın mesafede olması sebebiyle de birbirini aktive ettiği öne sürülmüştür. Yapılan deneylerle dimerizasyon domainine zorla yaklaştıran kaspazların DISC'de ki fizyolojik şartlara benzemediği gösterilmiştir (26-31).

$SO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$  ve  $Br^-$  gibi kosmotropik tuzlarla yapılan deneyler sonucunda yakınlık ile indüklenmiş dimerizasyon hipotezini ortaya çıkarmıştır. Bu hipoteze göre dimer oluşumu kaspazların aktivasyonuna yol açar ve adaptör protein kompleksi başlatıcı kaspazların bölgesel olarak konsantrasyonunu artırarak dimerizasyonu teşvik ettiği öne sürülmüştür. Zymogen kristallerinin aktivasyonu için kritik faktör kesilmesinin aksine dimerizasyondur (26-31).

Öne sürülen diğere bir hipotez ise uyarılmış konformasyon model hipotezidir. Bu hipoteze göre; başlatıcı kaspazların aktivasyonu için kritik faktör adaptör protein kompleksi ile direk etkileşim halinde olan başlatıcı kaspazların aktif bölgesinin konformasyonudur. Bu hipotez apoptozomda kaspaz-9'un aktivasyonu üzerine yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Kaspaz-9'un aktif bölgesinin aktivasyonu uyaran apoptozom tarafından kararlı hale getirdiği gösterilmiştir (26-31).

DISC'de kaspaz-8 ve 10'un aktivasyonu cFLIP (FLICE-benzeri inhibitör protein) tarafından inhibe edilebilir (36). FLICE kaspaz-8'e verilen eski isimdir. cFLIP'de kaspaz-8 ve 10 gibi iki efektör ölüm domaini vardır. cFLIP<sub>L</sub>, cFLIP<sub>S</sub> ve cFLIP<sub>R</sub> olarak isimlendirilen bilinen 3 farklı splice varyantı vardır. cFLIP<sub>L</sub> ve cFLIP<sub>S</sub>, DISC ile efektör ölüm domainleri arasındaki ilişki kurar. Aynı zamanda cFLIP<sub>S</sub>'nin FADD ile yarışma halinde DISC kompleksine bağlanarak kaspaz-8'in aktivasyonu ve işlenmesini engellediği yönünde bulgular vardır. cFLIP<sub>L</sub>'in DISC kompleksinde cFLIP<sub>S</sub> ile benzer bir rol üstlendiği öne sürülmesine rağmen DISC kompleksindeki işlevi hala tartışmalıdır (32-36). Bazı çalışmalar cFLIP<sub>L</sub>'nin cFLIP<sub>S</sub>'in apoptoz engelleyici molekül olarak analogu olduğunu göstermesine rağmen bazı çalışmalar DISC kompleksinde prokaspaz-8'i aktive ederek proapoptotik bir molekül olarak davrandığını ortaya koymuştur (32-36).

### **2.2.3.2 TRAIL ve Bcl-2 Ailesi**

İç kaynaklı apoptoz yolağı Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından regüle edilir ve bu aile üyeleri Bcl-2 homoloji (BH) domaini olarak adlandırılan dört (BH1-BH4) karakteristik domaine sahiptir ve buna göre üç alt gruba ayrılabilirler (37-39). BH domainleri Bcl-2 ailesi üyelerinin fonksiyonu için kritik öneme sahiptir ve bu domainlerin delesyonu gibi olaylar hayatta kalma/apoptoz oranı etkiler. Bcl-2 ve Bcl-XL gibi antiapoptotik proteinler dört BH domainine de sahiptir. Proapoptotik Bcl-2 proteinleri Bax ve Bad gibi birkaç BH domainine; Bid, Bim ve Bad gibi sadece BH3 domainine sahip olması gibi BH domaini özelliklerine göre alt gruplara ayrılabilir (37-39).

Bcl-2 veya Bcl-XL gibi antiapoptotik Bcl ailesi üyeleri mitokondri dış membranı ile ilişki halindedir ve mitokondri bütünlüğünün korunmasını sağlarlar. Bu antiapoptotik proteinler görevlerini; apoptoz sırasında proapoptotik faktörlerin membranların arasındaki boşluğa salgılanmasını sağlayan Bak, Bax ve Bok gibi proapoptotik faktörlerin, mitokondri dış membranıyla ilişki kurmasını engelleyerek yaparlar (28, 31, 37-38). Proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri sadece BH3 domainine sahip olan Bid, Bim ve PUMA gibi proapoptotik proteinler tarafından aktive edilirler. Bu özelliklerinin yanında antiapoptotik Bcl-2 üyeleriyle ilişki kurarak onları nötralize ederler (38).

Hücreler mitokondriyal yolağa bağlı olarak apoptoza girmelerine göre Tip I ve II olarak iki hücre tüpüne ayrılabilirler (23-25). Tip I hücrelerde Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu hücre ölümüyle ilişkili mitokondri değişikliklerini bloke etmesine rağmen CD95 ve TRAIL aktivasyonu ile apoptoza girebilirler. Bu durumun DISC'te ki kaspaz-8'lerin çoğunluğunun aktive olmasıyla ileri aşamalarda gerekli olan kaspazların aktive olması sebebiyle gerçekleşebileceği öne sürülmüştür. Tip II hücrelerde yetersiz DISC oluşumu gerçekleşir ve apoptoza uğrayabilmeleri için mitokondri ile ilişkili efektör kaspazların amplifikasyonu ile yeterli miktarda aktivasyonu gereklidir (23-25).

Ölüm reseptörü aracılı dış apoptoz yolağı ve mitokondri ilişkili iç kaynaklı apoptoz yolakları sadece BH3 domaini içeren Bid proteinini substrat olarak kaspaz-8'i kullanması sebebiyle birbiriyle bağlantılıdır. DISC'te kaspaz-8'in aktivasyonu ile Bid (p22) kesilmiş formu olan tBid (p15)'e dönüşür ve mitokondriye transloke olarak Bax ve Bak'ı aktive eder. Bu durum mitokondriden sitokrom-C ve diğer proapoptotik faktörlerinin salınımını tetikler. Yapılan çalışmalarla kaspaz-10'unda Bid'i farklı bir bölgeden keserek daha kısa bir Bid formu (p13) oluşturduğu gösterilmiştir (28, 31, 37-38). Farklı kesim yapılan bu Bid proteinin Bak ve Bax ile etkileşimi belirsizdir. Bid proteininin Kazein kinaz I ve II tarafından, kaspaz-8'in tanıma bölgesine yakın Thr (59), Ser (565) ve Ser (64) bölgesini fosforile edilerek kaspaz-8 tarafından kesilmesine karşı koruduğu gösterilmiştir. Bu durumun yol açacağı fonksiyonel sonuçları hala tartışmalıdır (28, 31, 37-39).

Bax ve Bak proteinleri mitokondriyal yolakla apoptozun uyarılmasında önemli rol oynayan proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden olduğu gösterilmiştir. Bax geni mutasyona uğradığı zaman veya inaktif olduğu durumlarda, TRAIL sinyal yolağının erken safhalarında kaspaz-8 kesimi ve Bid işlenmesinin olmaması sebebiyle mitokondri zarının polarizasyonunun gerçekleşmediği, bunun sonucu olarak kaspaz-9 kesimi ve sitokrom-C salınımının bloke edildiği gösterilmiştir (35).

### **2.2.3.3 TRAIL ve NF-κB yolağı**

NF-κB ailesi üyeleri doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre proliferasyonu, gelişim ve apoptozda merkez rol oynayan; cREL, RelA (p65), RelB, p50 ve p52 alt ünitelerinden ikisinin dimerizasyonu ile oluşan transkripsiyon faktörleridir. TNF/TNFR sisteminde TNF-reseptör kompleksinin ölüm bölgesinde ligand bağlanma yoluyla Reseptör-interacting proteinin görev yaptığı (RIP) ve NF-κB ana düzenleyicisi (NEMO)/IKKγ ile ilişki kurabileceği gösterilmiştir. Bunun sonucunda IκB kinaz α (IKKα) ve IKKβ, inhibitör-κB protenlerini fosforile ederek degrade olmasını sağlar ve bu degradasyon NF-κB aktivasyonuna yol açar (39-41).

TRAIL aracılı NF-κB aktivasyonunda da benzer bir mekanizmanın etkili olduğu yönünde çalışmalar vardır. NF-κB'nin TRAIL-R1, TRAIL-R2 ve TRAIL-R4 tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. RIP proteininin TRAIL DISC kompleksinde bulunduğu ve TRAIL aracılı IKK aktivasyonunu düzenlediği gösterilmiştir. NF-κB'nin TNF aracılı aktivasyonunda; RIP'in TNF receptör-1 ilişkili ölüm domain proteininin (TRADD) TNF-R1 ile etkileşim kurarak görev yapması için, TRAF2 gibi adaptör protein olarak fonksiyon gören çeşitli sinyal moleküllerinin bağlanmasını kolaylaştırarak sağladığı bildirilmiştir. TRAF2 proteininin IKK kompleksinin oluşumunda önemli bir rolü olduğu yönünde bulgular vardır (39-41).

RIP aynı zamanda FADD ile ilişki kurabilir ama NF-κB aktivasyonunda FADD'in rolü tam olarak bilinmemektedir. FADD'ın aşırı ekspresyonunun NF-κB ilişkili raportör

genlerin ve NF- $\kappa$ B yolağındaki hedef genlerin upregülasyonunu uyardığı rapor edilmiştir. TNF-aracılı apoptozda FADD'ın zorunlu olmadığı, kaspaz-8 ve NF- $\kappa$ B aktivasyonunda kritik rolü olduğu yönünde çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda NF- $\kappa$ B'nin TRAIL ile aktivasyonunda; DISC'den ayrı olarak FADD, TRADD, RIP ve kaspaz-10'un dahil olduğu ikinci bir sitosolik sinyal kompleksinin görev yaptığını öne sürülmüştür (39-41).

Hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi çeşitli hücrel süreçlerin kontrolünde protein ubiquitinasyonu önemli bir rol oynar. IKK aktive olduğu zaman Kappa B inhibitörü (I $\kappa$ B)'yi fosforile eder, poliubiquitinlenmiş I $\kappa$ B proteozomlar tarafından degrade edilir. I $\kappa$ B'nin degrade olması sonucu NF- $\kappa$ B çekirdeğe transloke olarak hedef genleri aktive eder. Ubiquitin yedi internal lizin rezidüsüne sahiptir. Bunun yanında poliubiquitin zincirleri ise çoğunlukla Lys (48) veya Lys (63) ile bağlanır. Lys (48) ile bağlanmış poliubiquitinlerin proteozomal degradasyona karşı daha fazla yatkın olduğu rapor edilmiştir. Protein kinaz aktivitesi veya protein trafiği başlıca Lys(63) ile bağlanmış poliubiquitin zincirleri aracılığıyla düzenlenir (39-42).

Proteozomların inhibisyonu sonucunda I $\kappa$ B degrade edilemez ve NF- $\kappa$ B inaktif halde kalır, bu sebeple TRAIL aracılı apoptozun gerçekleşmesi için zemin hazırlayabilir. Proteozom inhibitörlerinin uygulanması sonucu NF- $\kappa$ B sinyal yolağının apoptozun uyarılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar NF- $\kappa$ B'nin inhibisyonunun TRAIL aracılı apoptoz için tek başına yeterli olmadığı gösterilmiştir. (20)

NF- $\kappa$ B'nin antiapoptotik fonksiyonu RelA eksikliği olan farelerle yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (39-42). Bu fareler embriyonik aşamada karaciğerde TNF ile uyarılmış hücre apoptozu sebebiyle ölmüşlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda NF- $\kappa$ B'nin cIAP-1, cIAP-2, XIAP, cFLIP, Bcl-XL ve TRAIL-R3 antiapoptotik hedef genlerinin ekspresyonunu upregule ettiği gösterilmiştir. TRAIL aracılı apoptozun inhibe edilmesinde NF- $\kappa$ B'nin hedef genleri olan bu antiapoptotik genlerin en önemlisi cFLIP genidir. NF- $\kappa$ B yolağı PKB/Akt ve MAPK gibi diğer antiapoptotik yolları da hedef almaktadır. NF- $\kappa$ B'nin antiapoptotik genleri hedef almasına rağmen hücrenin apoptoz cevabı; hücre

içindeki kaspazlar tarafından kontrol edilen proapoptotik sinyaller ile NF-κB tarafından kontrol edilen antiapoptotik sinyallerin dengesine bağlıdır. (20-21)

NF-κB aktivasyonunun apoptoz veya hayatta kalma taraflarından hangisi tarafına çalışacağı cRel ve RelA'nın aktive olmuş NF-κB molekülü içindeki görece miktarları arasında ilişki olduğu yönünde bulgular vardır. RelA alt ünitesinin aşırı ekspresyonu kaspaz-8, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 ekspresyonunu inhibe eder. cRel ekspresyon seviyesinin artması ise ters bir etki yapar. cRel ekspresyonunun artması TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin ekspresyonunun artmasına yol açar. Yapılan çalışmalarda RelA eksikliği bulunan fibroblast hücrelerinin TRAIL aracılı apoptoza duyarlı olduğu, cRel eksikliği bulunan fibroblastlarınsa TRAIL'e dirençli olduğu gösterilmiştir. RelA'nın proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu uyardığı, cRel'in antiapoptotik hedef genlerin ekspresyonunu upregüle ettiği yönünde çalışmalar vardır (39-42).

TRAIL dirençli hücrelerde TRAIL reseptöründen yayılan baskın sinyalin NF-κB'nin aktivasyonu olduğu yönünde bulgular vardır. Apoptoza direncinin, NF-κB aktivasyonu ile sonuçlanan TRAIL kaskadını ortaya çıkardığı düşünülmektedir. Kolon kansinoması gibi bazı kanser tiplerinde bu aktivasyonunun tümör metastazı ve invazyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bu tip hücrelerde NF-κB susturulmasının TRAIL aracılı apoptoza duyarlı hale getirmediği bildirilmiştir (39-42).

#### **2.2.3.4 TRAIL Yolağı ve Bortezomib İlişkisi**

Kanser hücre hatlarının %50'ye yakını TRAIL aracılı apoptoza karşı dirençlidir. Hatta dirençli tümör hücrelerinde TRAIL reseptörleri TRAIL tedavisi uygulandığında proinvazif veya prosurvival etkileri ortaya çıkarabilir (43-47). Bu prosurvival etki TRAIL reseptörleri, FADD ve reseptör ilişkili protein (RIP1), serin treonin kinazdan oluşan ikincil bir kompleks tarafından meydana getirilir. TRAIL direnci ve istenmeyen apoptoz engelleyici etkileri apoptoz sinyalini yeniden oluşturan veya güçlendiren yeni hedeflenmiş terapilerle aşılabılır. Bu etkiyi gösteren ajanlar arasında Bortezomib gibi proteozom

inhibitörleri TRAIL yolağını çeşitli aşamalarda etkileyerek hücreleri TRAIL'e duyarlı hale getirmede etkili olduğu gösterilmiştir (49-51). Bortezomib multipl myeloma ve manto hücreli lenfoma tedavisinde onaylanmış bir proteozom inhibitörüdür (44). Etkisini 26S proteozomun  $\beta 5$  alt ünitesine geri dönüşümlü olarak bağlanarak kimotripsin-benzeri proteolitik etkisini inhibe ederek gösterir. Sonuç olarak poliubiquitinlenmiş proteinlerin etkisiz olarak degrade edilmesi ve birikimi sonucu hücre siklusu durur ve apoptoz aktivasyonu gerçekleşir. İlk olarak yapılan çalışmalarda bu antitümörel aktivitenin multipl myeloma hücrelerinde gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda lökemik ve çeşitli solid tümörlerde de bortezomibin tümör hücrelerini TRAIL aracılı apoptoz yolağına karşı duyarlı hale getirerek, etkili şekilde antitümörel aktivite gösterdiği farklı çalışmalar vardır (52-61).

Bortezomib tedavisi genellikle hücre yüzeyinde TRAIL-R1 ve/veya TRAIL-R2 reseptörlerinin ekspresyonunu sıklıkla artırdığı çeşitli kanser tiplerinde gösterilmiştir. TRAIL upregülasyonunun apoptoz duyarlılığındaki kritik rolü spesifik siRNA'larla TRAIL-R2'nin susturulması ile yapılan çalışmalarda NSCLC (Non-small Cell Lung Carcinoma) hücrelerinde bortezomibe karşı duyarlılığın azaldığı çalışmalarla gösterilmiştir (51, 58). Yapılan bazı çalışmalar artmış TRAIL reseptör ekspresyonunun Bortezomib duyarlılığında kritik rolü olmayacağını göstermiştir. (23-24) Örneğin beyin tümörleriyle yapılan bir çalışmada önce TRAIL reseptörlerine bağlanması için TRAIL proteini eklenmiş, daha sonra ortamdan uzaklaştırılarak Bortezomib eklenmiştir. Sonuç olarak bortezomibe duyarlılığın devam ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada TRAIL ve Bortezomib'in birlikte varlığının daha etkili sonuçlar verdiği, bu sebeple Bortezomib'in aşağı apoptoz sinyal yollarını da uyarabildiği yönünde bulgular ortaya konmuştur (51).

Bortezomib tedavisinin önemli etkilerinden birisi TRAIL aracılı kaspaz-8 kesimi ve aktivasyonunu artırdığı sentetik kaspaz inhibitörleri ve kaspaz-8'in genetik olarak knockdown edilmesi ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (52-61). Bu çalışmalarda bu mekanizmanın kaspaz-8'in poliubiquitinilasyonu ile olabileceği gösterilmiştir. Kaspaz-8 analogu olan cFLIP'in bortezomib tarafından da regüle edilebileceği gösterilmiştir. FADD ile prokaspaz-8'e bağlanmada yarışan cFLIP<sub>L</sub> ve kaspaz-8'i inhibe eden cFLIP<sub>S</sub>, DISC'i

inhibe eder ve apoptotik sinyali bloke eder. Bortezomib tedavisi ile cFLIP<sub>L</sub> ve cFLIP<sub>S</sub> seviyelerini bazı kanser türlerinde azalttığı, bazı tümör hücre hatlarında ve primer kanser hücrelerinde sadece cFLIP<sub>L</sub> seviyesini azalttığı, bunun sonucu olarak artmış TRAIL duyarlılığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında bazı çalışmalarda da bortezomibin cFLIP<sub>L</sub> ve cFLIP<sub>S</sub> seviyelerini etkilemediği, bazı çalışmalarda da artırdığı gösterilmiştir. Bu farklı etkilerin uygulanan bortezomib konsantrasyonları ve uygulama süreleri arasındaki farklılıktan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (54-60).

NF-κB hücre proliferasyonu ve apoptozun baskılanması gibi çeşitli biyolojik olaylarda düzenleyici olarak görev alan transkripsiyon faktörüdür. NF-κB aktivitesi bu transkripsiyon faktörünü baskılayan IκB tarafından proteozom bağımlı yolla kontrol edilir. Bortezomib IκB'nin degradasyonunu engeller ve NF-κB aktivasyonunu inhibe ederek çeşitli antiapoptotik düzenleyicileri de içeren NF-κB hedef genlerinin ekspresyonunda azalmaya yol açar. Örnek olarak NSCLC hücrelerinde NF-κB aktivasyonunun baskılanmasında TRAIL'in kısmen görev aldığı gösterilmiştir (51, 58). Yapılan bir çalışmada glioblastoma hücre hatlarında yüksek NF-κB aktivitesinin, bortezomibin TRAIL aracılı apoptoza olan duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (51).

NF-κB'nin hedef genleri; cFLIP, Bcl-XL, X-linked apoptoz inhibitörü (XIAP) gibi apoptozu düzenleyen genlerdir. Bazı çalışmalarda bortezomib ile muamele sonucu azalmış cFLIP ekspresyonunun NF-κB inhibisyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (54-60). Pankreatik kanser hücrelerinde bortezomib tedavisi ile NF-κB inhibisyonunun XIAP ve Bcl-XL ekspresyonunu aşağı-regüle ettiği ve TRAIL'e duyarlılığı artırdığı ortaya konulmuştur. Multipl myeloma ve hepatoma hücrelerinde de bortezomibin XIAP seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (44, 47). Yapılan bu çalışmalar bortezomible NF-κB inhibisyonunun TRAIL duyarlılığı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Bax ve Bak gibi proapoptotik, Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-XL gibi antiapoptotik proteinleri içeren Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge ile hücre, iç yolak veya mitokondriyel apoptoz yolağından hangisine gidileceğine karar verir. BH3 homoloji domainine sahip olan Bim, Bik, Puma ve Noxa gibi proteinler spesifik ölüm sinyallerinin iletilmesi için önemlidir.



Bortezomibin Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyonunu etkileyip TRAIL aracılı apoptoza duyarlılığı artırarak mitokondriyel yolağı tetiklemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda Bortezomibin Bcl-2 ve Bcl-XL ekspresyonu üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir. Bcl-2'nin proteozomal degradasyona uğraması sebebiyle proteozom inhibisyonu ile Bcl-2 seviyesinin artması beklenmektedir. Hepatoma hücrelerinde Bortezomib uygulaması sonucunda Bcl-2'nin upregüle olduğu gösterilmiştir (47). Hepatoselüler karsinoma, renal hücreli karsinoma, nöroblastoma ve glioblastoma kanser hücrelerinde Bortezomibin Mcl-1 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (47, 56, 58).

Çeşitli kanser tiplerinde Bortezomibin Bax, Bak, Bim, Bik, Noxa ve Puma proteinlerinin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (50-60). Bik geni knockdown yapılmış kolon kanserinde Bortezomib'in TRAIL'e olan duyarlılığı kısmen engellediği ortaya konulmuştur. Bik ve Bim genleri knockdown yapılmış hücrelerde Bortezomib'in TRAIL hassasiyetini büyük oranda artırdığı gösterilmiştir. Bortezomib'in Bid C-terminal ve N-terminal ucunun kaspaz-8 ile kesiminde stabilize ederek etki gösterdiği öne sürülmüştür. N-terminal ucun tBid aktivasyonu için kritik olduğu, C-terminal ucun birikiminin ise nöroblastoma hücrelerinde TRAIL duyarlılığında önemli olduğu bildirilmiştir (53). TRAIL ve Bortezomib ile muamele edilmiş hücrelerde bortezomibin C-terminal fragmentin proteozomal degradasyonunu inhibe ederek mitokondriyel apoptoza daha etkili şekilde yönlendirdiği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar Bcl-2 ailesi proteinlerinin bortezomib ile TRAIL duyarlılığında önemli bir hedef olduğunu göstermektedir. Bunun yanında yapılan çalışmalarla Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonu üzerine Bortezomib'in etkisinin, değişken ve hücre tipine göre farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar ve teknik malzemeler temin edildikleri firmalarla birlikte aşağıda belirtilmiştir.

##### 3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
- Fetal Bovin Serum (Gibco)
- Penicillin-streptomisin (Gibco)
- L-glutamin (Gibco)
- Phosphate buffered saline (PBS) (Gibco)
- Trypsin-EDTA (Lonza)
- rTRAIL (Gibco)
- Bortezomib (Santa Cruz)
- Trizol (Invitrogen)
- İsoopropanol (Merck)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- DEPC water (Gibco)
- Primerler (Macrogen)
- Bovin Serum Albumin (Sigma)
- Primer antibodyler (Invitrogen)
- Sekonder antibodyler (Invitrogen)
- Agaroz (Sigma)
- Tris-baz (Sigma)
- Glisin (Sigma)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Tris-HCl (Sigma)

- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
- Bromfenol mavisi (Merck)
- Gliserol (Merck)
- B-merkaptoetanol (Sigma)
- Tween-20 (Sigma)
- Akrilamid (Vivantis)
- Bisakrilamid (Vivantis)
- Amonyumpersülfat (Sigma)
- TEMED (Sigma)
- Distile ve bidistile su

### **3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler**

- Soğutmalı santrifüj (Universal 16R)
- Mikrosantrifüj (Techne force 16)
- Su banyoları (Grant)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Terazi (Shimadzu 321-33557)
- pH metre (İnolab)
- Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Biorad)
- Otomatik pipetler (Gilbson, Biohit, Socorex)
- Vorteks (Nüve NM 110)
- Etüv (Dedeoğlu )
- Thermal Cyclers (Applied Biosystems)
- Real Time PCR (Qiagen)
- Elektroforez güç kaynağı (Biorad)
- Dikey Jel Dökme Sistemi (Biorad)
- Dikey elektroforez tankı (Biorad)
- Blotlama Cihazı (Thermo)
- Orbital çalkalayıcı (Stuart)

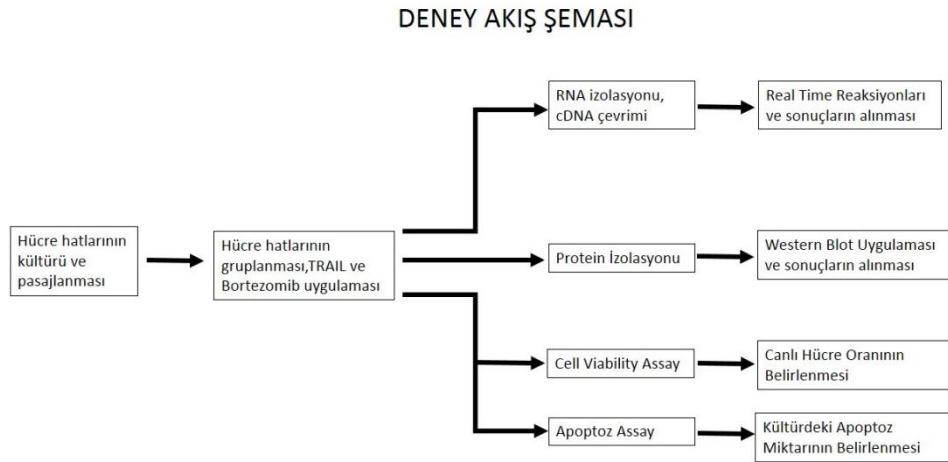
- Flow Sitometri (Beckmann Coulter)
- İvert Mikroskop (Nikon)
- Işık Mikroskobu (Nikon)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Deepfreez (Siemens, Bosch)
- Otoklav (Trans)

Araştırmanın yapıldığı Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarı, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunmaktadır.

### 3.2 YÖNTEM

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hücre hattı koleksiyonunda bulunan A549 hücre hattı (insan alveolar adenokarsinomik bazal epitel hücre hattı)  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak T75 flaskta kültüre edilmiştir (62). Hücreler yeteri kadar çoğaltıldıktan sonra tripsinize edilerek 6-well plate'lere aktarılmıştır. Hücreler bu platelerde yeterli hücre doluluk oranına ulaştıktan sonra TRAIL ve Bortezomib uygulamaları yapılmıştır. Bu uygulamalar sonrası elde edilen kültürlerden total mRNA ve protein izolasyonu yapılmıştır. mRNA izolatları cDNA'ya çevrilerek aşağıda bahsedilecek genlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek için Real Time deneylerinde; protein izolatları da aşağıda bahsedilecek protein seviyelerini belirlemek için Western Blot deneylerinde kullanılmıştır. Apoptoz oranının belirlenmesi ve ekspresyon seviyelerinin doğrulanması için Flow Cytometry'de hücreler Annexin V ile boyanarak yürütülmüştür. Aynı zamanda kullanılan kimyasalların sitotoksik etkilerinin olup olmadığını ve hücrelerin canlılığını sürdürdüğünü göstermek için, sadece ölü hücrelerin boyanması esasına dayanan Hücre Canlılık Testi (Cell Viability Assay) yöntemi olan Trypan Blue/hücre sayım yöntemi ile hücre canlılık oranı belirlenmiştir (71). Western Blot, Real Time PCR, Hücre Canlılık Testi (Cell Viability Assay) ve Apoptoz Assayler üçer tekrar halinde yapılmıştır. Deney akış şeması aşağıdaki gibidir (Şekil 3.1).

Şekil 3.1: Deney Akış Şeması



### **3.2.1 Hücre Kültürü**

#### **3.2.1.1 Hücre Kültürü ve Alt kültür**

A549 hücre hattı hücreleri -80°C'den çıkarılarak çözüldükten sonra, T75 flask içine aktarılıp 15 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kültür mediumu üzerine eklenmiştir (62). DMEM kültür mediumu kullanılmadan önce içerisine %10 Fetal Bovin Serum (FBS), %1 Penisilin/Streptomisin, 2mM L-Glutamin ilavesi yapılmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ortamında kültüre edilmiştir. Flask üreme durumuna göre medium 3-4 günde bir değiştirilerek tekrar kültüre bırakılmıştır.

İlk kültür sonrası, daha fazla hücre elde edilebilmesi için hücreler alt kültüre alındı. Alt kültür için flask içerisinde bulunan medium uzaklaştırıldı ve hücreler steril PBS ile yıkandı. Daha sonra flask içine 3 ml Tripsin-EDTA eklendi, 10-15 dk 37°C sıcaklıkta bekletilerek hücrelerin serbest hale geçmesi sağlandı. İvert mikroskop altında tüm hücrelerin flask yüzeyi bağlantısının ortadan kalktığı görüldüğü zaman, üzerine 2 ml DMEM mediumu eklendi. Flaskta bulunan medium, tripsin ve hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarılarak; 1500 RPM'de 10 dk. santrifüj yapılarak süpernatant atıldı. Pellet üzerine 5 ml DMEM mediumu eklenip, steril pastör pipeti ile homojenize hale getirildi. Daha sonra bu hücre süspansiyonu yeni flaslara eşit şekilde paylaştırılarak, üzerine yukarıda bahsedilen kültür ortamından 15 ml eklendi. Üreme durumuna göre 3-4 günde bir medium değiştirildi. Bu şekilde hücreler pasajlanmış, yeterli miktarda ve sayıda hücre kültürü elde edildi.

#### **3.2.1.2 Hücrelerin 6-well plate'e aktarılması**

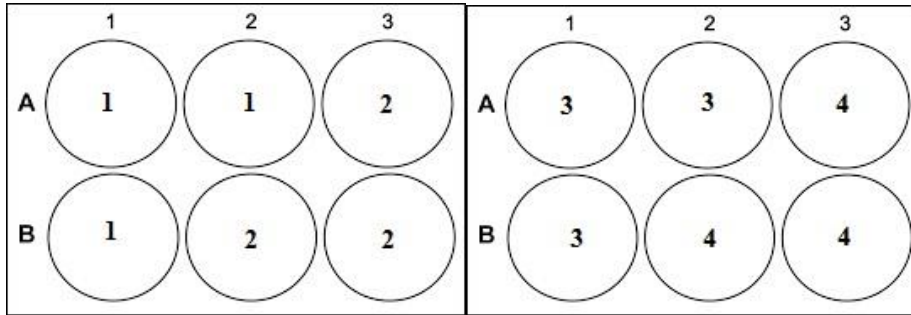
T75 flaslara  $\geq$ %90 hücre doluluk oranına ulaştıktan sonra, hücre hatları TRAIL ve Bortezomib uygulamalarının yapılabilmesi için 6-well platalere aktarıldı. Bu platalere aktarım yapılmadan hücre sayımı yapıldı, daha sonra gerekli dilüsyonlar yapılarak, eşit sayıda hücre bütün kuyucuklara aktarıldı.

Tripsin işlemlerinden sonra pellet steril bir 2 ml ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine yukarıda bahsedilen DMEM mediumundan 2 ml eklenerek hücreler homojenize edildi. Daha sonra bu hücrelerden 10 $\mu$ l alınarak Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı sonrasında gerekli dilusyonlar yapılarak, 6-well plate'teki her bir kuyucuğa 1x10<sup>6</sup> hücre aktarıldı. Üzerlerine de 2 ml DMEM mediumundan eklenip; 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ortamında kültüre edildi. Kuyucuklar  $\geq$ %80 doluluk oranına ulaştıktan sonra TRAIL ve Bortezomib uygulamalarına geçildi.

### 3.2.2 Hücre hattı gruplarına rTRAIL ve Bortezomib uygulanması

Her bir uygulama 3 tekrar olarak yapıldı; bunun için 6-well plate'de 3 ayrı kuyucuk kullanıldı (Şekil 3.2). rTRAIL dozları için Morisette ve ark. (47), bortezomib dozları için ise Taromi ve ark. (48) kullanmış olduğu aşağıda belirtilen dozlarda rTRAIL ve Bortezomib uygulaması yapıldı (Çizelge 3.1).

Şekil 3.2: Örnek 6-well plate şablonu (A1-A2-B1: Örnek no1, B2-A3-B3: Örnek no2 vb.)



Çizelge 3.1: Uygulanan TRAIL ve Bortezomib konsantrasyonları.

<b>Grup</b>	<b>Örnek Numarası</b>	<b>Uygulama</b>
Kontrol grubu	1	Uygulama yok
Grup 1	2	10ng/ml TRAIL
	3	30ng/ml TRAIL
Grup 2	4	10 ng/ml TRAIL + 10 nm Bortezomib
	5	10 ng/ml TRAIL + 50 nm Bortezomib
	6	10 ng/ml TRAIL + 100 nm Bortezomib
Grup 3	7	30 ng/ml TRAIL + 10 nm Bortezomib
	8	30 ng/ml TRAIL + 50 nm Bortezomib
	9	30 ng/ml TRAIL + 100 nm Bortezomib
Grup 4	10	10 nm Bortezomib
	11	50 nm Bortezomib
	12	100 nm Bortezomib

TRAIL uygulaması; liyofilize olarak satın alınan rekombinant human TRAIL (rTRAIL) proteini 1 mg/ml olacak şekilde steril distile su ile sulandırıldı. Daha sonra serumsuz DMEM mediumu ile gerekli konsantrasyonlarda (Çizelge 3.1) rTRAIL solüsyonları hazırlandı. Hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ortamında 18 saat kültüre edildi. Bunun sonrasında hücreler bu medium ile Tripsin-EDTA yöntemiyle flasktan ayrılarak deneylerin ileri aşamalarında kullanıldı.

TRAIL ve Bortezomib uygulaması; liyofilize olarak satın alınan rekombinant human TRAIL (rTRAIL) proteini 1 mg/ml olacak şekilde steril distile su ile sulandırıldı. Bortezomib için ise DMSO ile stok çözeltisi oluşturuldu. Daha sonra serumsuz DMEM mediumu ile gerekli konsantrasyonlarda (Çizelge 3.1) rTRAIL ve Bortezomib solüsyonları hazırlandı. Hücreler bu medium ile 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ortamında 18 saat kültüre edildi. Bunun sonrasında hücreler Tripsin-EDTA yöntemiyle flasktan ayrılarak deneylerin ileri aşamalarında kullanıldı.



### 3.2.3. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

İlgili genlerin ekspresyon seviyelerinin Real Time deneylerinde belirlenmesi için hücrelerden total mRNA izolasyonu Trizol (Invitrogen, ABD) ile üreticinin protokolüne göre yapıldı. Elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrilerek Real Time reaksiyonlarında kullanıldı.

#### **Total mRNA izolasyonu;**

- Tripsin-EDTA yöntemiyle platelerden ayrılan hücreler 50 ml'lik falcon tüplerine aktarıldı. Santrifüj ile süpernatant uzaklaştırılarak üzerine 1 ml medyum eklendi.
- Solüsyon 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktararak, 6000 rpm'de 2 dk tekrar santrifüj yapılarak süpernatant atıldı. Üzerine 1 ml TRIZOL Reagent eklenip pipetaj yapılarak, buz üzerinde 15 dk bekletildi.
- +4°C'de 14000 rpm'de 10 dk santrifüj sonrası süpernatant temiz bir ependorf tüpüne alındı. Üzerine 200 µl kloroform eklenerek 15 sn vorteks yapılarak, 10 dk buz üstünde bekletildi.
- +4°C'de 14000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı. Yarısaydam olan süpernatantın %70'lik kısmı yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı, üzerine eşit miktarda (yaklaşık 500 µl) isopropanol eklendi.
- 15 sn vortekslendikten sonra 10 dk buz üstünde bekletildi. +4°C'de 14000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı ve RNA pelleti altta görüldü.
- Sonrasında süpernatant atıldı, üzerine %70 EtOH (-20°C, DEPC su ile sulandırılmış) eklendi ve 15 sn. vortekslendi.
- +4°C'de 14000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı, süpernatant atıldı. Kapağı açık şekilde 15 dk buz üstünde bekletildi, sonrasında 20 µl DEPC su eklendi.
- Daha sonra spektrofotometre ile RNA miktarı ölçüldü.
- Elde edilen total mRNA cDNA sentezi için kullanıldı. Bir kısmı ise -20°C'de saklandı.

### cDNA sentezi;

İzole edilen total mRNA'nın Real Time reaksiyonlarında kullanılabilmesi için cDNA şekline çevrilmesi gerekmektedir. Bunun için ticari olarak satın alınan "High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Applied Biosystems) kullanıldı. Total mRNA'dan cDNA eldesi için üreticinin sağlamış olduğu protokole göre aşağıdaki aşamalar takip edildi;

- Örnek sayısına göre Çizelge 3.2 'deki gibi master mix hazırlandı.

Çizelge 3.2: Master mix için kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Hacim/Reaksiyon (µl)
10x RT buffer	2.0
25x dNTP mix (100 mM)	0.8
10x Random Primer	2.0
Multiscribe Reverse Transcriptase	1.0
RNase inhibitörü	1.0
Nuclease free-H <sub>2</sub> O	3.2
Her reaksiyon için toplam	10

- Her PCR tüpüne 10 µl master mix dağıtıldı.
- 10 µl RNA örneği (20 µl reaksiyon içinde toplamda 2 µg olacak şekilde dilue edilmiş) 2 defa pipetaj yapılarak tüpe aktarıldı.
- Tüpler Thermal Cycler cihazına koyularak aşağıdaki programa göre cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3: cDNA sentezi için kullanılan sıcaklıklar.

	1.adım	2.adım	3.adım	4.adım
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	∞

### 3.2.4. Real Time Reaksiyonları

Daha önce belirtilen uygulamalar sonrasında TRAIL bağımlı apoptoz yolağında görev alan aşağıdaki genlerin ekspresyonları belirlendi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4: Ekspresyon seviyesi belirlenen genler

Genler	Kısaltma
TNF-related apoptosis-inducing ligand	TRAIL
TRAIL reseptörü I	DR4
TRAIL reseptörü II	DR5
TRAIL reseptörü III	DcR1
TRAIL reseptörü IV	DcR2
Osteoprotegerin	OPG
Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	NFKB
B-cell lymphoma 2	Bcl-2
Bcl-2-associated X protein	Bax
B-cell lymphoma-extra large	Bcl-XL
Gliseraldehit-3-fosfat dehisrojenaz	GAPDH

Her bir örnek, her bir gen için üç tekrar olarak çalışıldı. Real Time reaksiyonlarında aşağıdaki primerler kullanıldı (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5: Kullanılan primerler.

	<b>Primerler</b>
TRAIL (63)	F 5'- AGTGAGAGAAAGAGGTCCTCAG-3' R 5'- CCAGAGCCTTTTCATTCTTGGA-3'
DR4 (64)	F 5'- GATCGATGTGGTCAGAGCTGG -3' R 5'- TGTGGATCGAGGCGTTCC-3'
DR5 (64)	F 5' - GTGCCCTTGACTCCTGGG -3' R 5'- AAGGTGTCCCTGTGGCCC -3'
DcR1 (64)	F 5'- CAGTTCCTCCCATCTTCAGGC -3' R 5'- GGCTGAATAAATCCCGTGACC -3'
DcR2 (64)	F 5'- CTCCTACAAAGGGAAGCAGCC -3' R 5'- CTAGGACCATTGGTAAGCTGCC -3'
OPG (65)	F 5'- CGTCAAGCAGGAGTGCAATC -3' R 5'- CCAGCTTGCACTCCAA -3'
NFKB (66)	F 5'- ATGGCTTCTATGAGGCTGAG -3' R 5'- GTTGTGTTGGTCTGGATGC -3'
Bcl-2 (67)	F 5'- CATGCTGGGGCCGTACAG-3' R 5'- GAACCGGCACCTGCACAC-3'
Bax (68)	F 5'- TGGAGCTGCAGAGGATGATTG -3' R 5'- GAAGTTGCCGTCAGAAAACATG -3'
Bcl-XL (67)	F 5'- TGCATTGTTCCCATAGAGTTCCA-3' R 5'- CCTGAATGACCACCTAGAGCCTT-3'
GAPDH (69)	F 5'- TGCACCACCAACTGCTTAGC -3' R 5'- GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'

Real Time reaksiyonları aşağıdaki aşamalarla gerçekleştirildi;

- Her bir gen için ayrı olarak, örnek sayısına göre Çizelge 3.6'daki gibi reaksiyonlar hazırlandı. Ticari olarak satın alınan SYBR Green üretici protokolü kullanıldı.

Çizelge 3.6: Real Time PCR reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Hacim/Reaksiyon (µl)
Power SYBR Green PCR master mix	12.5
Forward Primer (F)	1.25
Reverse Primer (R)	1.25
cDNA	2
dH <sub>2</sub> O	8
Toplam	25

- 0.2 ml PCR tüplerine her bir örnek için ayrı reaksiyonlar koyulur ve RotorGene Q cihazında Real Time reaksiyonları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7: Real Time PCR ısı döngüleri

	1.adım	2.adım	4. adım (40 döngü)		
Sıcaklık (°C)	50	95	95	60*	72
			Denaturasyon	Yapışma	Uzama
Süre	2 dk	10 dk	30 sn	30 sn	45 sn

- Yapışma (annealing) sıcaklığı her bir gen için ayrı ayrı belirlendi. Her bir gen için gradient PCR yapıldı ve en uygun sıcaklık yapışma sıcaklığı olarak kullanıldı.
- Yukarıda bahsedilen genlere ait ekspresyon düzeyleri endojen kontrol olarak kullanılan Gliseraldehid-3-fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) amplifikasyonu ile normalize edildi.

### 3.2.5. Protein izolasyonu

İlgili genlerin protein ekspresyon seviyelerini Western Blot deneylerinde belirlemek için hücrelerden total protein izolasyonu yapıldı. Bunun için ticari olarak satın alınan M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher) kullanıldı. Total protein izolasyonu için yapılan işlemler için üretici tarafından sağlanan aşağıdaki protokol kullanıldı.

- Plate içindeki medium döküldü ve flask medium artıklarının uzaklaştırılması için PBS ile yıkandı.
- Daha sonra plate içine 1 ml M-PER koyuldu ve oda ısısında 5 dk çalkalandı.
- Süre sonunda lizat ependorf tüpüne aktarıldı ve 14000 rpm'de 5-10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve deneylerin ileri aşamalarında kullanıldı.

İzole edilen protein miktarını belirlemek için BCA Protein Assay Kit (Pierce) kullanıldı. Protein miktarları aşağıdaki gibi belirlendi.

- Mikroplate kuyucuklarına 25µL standart protein dilüsyonları ve miktarı ölçülmek istenen protein koyuldu.
- Üzerine 200 µL WR (50:1, Reagent A:B) eklendi ve pipetajlandı.
- 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
- Oda sıcaklığına getirildikten sonra, 562 nm absorbans değeri plate okuyucuda okundu.
- Standart protein dilüsyonları absorbans değerlerinden, standart bir grafik çizildi ve ölçülmek istenen proteinin konsantrasyonu absorbans değerine göre bulundu.

### 3.2.6. Western Blot Deneyleri

İlgili genlerin protein ekspresyon seviyelerini belirlemek için Western Blot Yöntemi kullanıldı (70). Kullanılan primer antibadiler her bir gene ait protein için ayrı ayrı alındı. Western Blot yöntemi aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibidir.

- İzole edilen proteinlerden konsantrasyonlarına göre 60µg alındı. Üzerine 2x Laemmli buffer'dan 10 µl eklendi. Daha sonra distile su ile 20 µl'ye tamamlandı. 95°C'de 10 dk inkübe edildi.
- Proteinler denatüre edildikten sonra tamamı %10 veya %12 SDS-PAGE jele yüklendi. SDS Jel stacking jel (üst) ve resolving (alt) jel olarak iki bölüm olarak döküldü. SDS-PAGE resolving jel (Çizelge 3.8) ve stacking jel (Çizelge 3.9) aşağıdaki gibi hazırlandı.

Çizelge 3.8: Resolving jel.

Stok solusyonu	%10 SDSJel	%12 SDS jel
1 M Tris pH 8.8	3,75 ml	3,75 ml
%10 SDS	100 µl	100 µl
%30 Akrilamid-bisakrilamid	3,3 ml	4 ml
Distile su	2,7 ml	2,05 ml
%10 Amonyum persülfat	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Çizelge 3.9: Stacking jel.

Stok solusyonu	Hacim
1 M Tris pH 6.8	0,63 ml
%10 SDS	50 µl
%30 Akrilamid-bisakrilamid	0,83 ml
Distile su	3,4 ml
%10 Amonyum persülfat	50 µl
TEMED	5 µl

- Yürütme 120V 80 dk olarak yapıldı. Sonrasında yürütme jeli, distile su ile (oda sıcaklığında) 5 dakika yıkandı, sonrasında 5-10 dk transfer buffer içine alındı.
- Aynı anda PVDF membran 15 saniye metanole batırılıp, sonrasında 2 dakika distile su ile etanol uzaklaştırıldı ve 10-15 dakika transfer tamponu ile muamele edildi.
- Whatmann kağıdı-Jel-PVDF Membran-Whatmann kağıdı şeklinde sandviç sistemi hazırlanarak transfer cihazına koyuldu, sandviç sistemindeki hava alındı.
- Sonrasında transfer cihazında 25V'da 15-25 dk transfer (blotlama) yapıldı. Jelden membrana proteinlerin geçip geçmediği kontrol etmek için, Reverseble protein membran stain kit (Memcode) ile boyama yapıp protein görüntülendi. Sonrasında PBS ile membran çalkalanarak (10-15 dk) boya uzaklaştırıldı.
- Membran 60 dk membran yüzeyini kaplayacak kadar Blocking Buffer ile (%5 BSA TBS-T) membran çalkalandı.
- Sonrasında TBS + Tween20 (1000 ml TBS + 5 ml Tween 20, %10'luk) yıkama yapıldı (3 kere, 5'er dk).
- 10 µL primer antibody (her protein için ayrı) %3 BSA içeren 10 ml TBS içinde dilue edilir ve membranın üstüne döküldü. Membran 4°C'de yavaşça çalkalanarak bir gece inkübe edildi.
- Sonrasında TBS + Tween 20 ile yıkandı (3 kere, 5'er dk).
- Sonrasında 1 µL sekonder antibadi %3 Yağsız süt tozu içeren 10 ml TBS-T içinde dilue edilerek membran üstüne döküldü. 2 saat oda ısısında inkübasyon yapıldı (1. Saatin sonunda membran ters çevrildi).
- Sonrasında membran tekrar TBS-T ile yıkandı (3 kere, 5'er dk).
- West Pico Signal Detection Kit hazırlandı (1:1, Reagent A:B). Membran üstüne döküldü ve Kemilüminesans görüntüleme cihazında örnekler görüntülendi.

### **3.2.7. Hücre Canlılık Testi (Cell Viability Assay)**

Kullanılan ajanların (TRAIL, Bortezomib) sitotoksik etkilerinin olup olmadığını ve hücrelerin canlılığını sürdürdüğünü göstermek için, sadece ölü hücrelerin boyanması



esasına dayanan Cell Viability Assay kullanıldı (71). Bunun için sadece ölü hücreleri boyayan Trypan Blue kullanıldı. Deney aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibidir.

- Hücreler serumsuz medium ve 0.4% Trypan Blue solusyonu ile 1:1 oranında dilue edildi.
- Canlılığını kaybetmiş hücreler mavi boyandı, canlı hücrelerde ise boyanma görülmedi.
- Hücreler Trypan Blue ile 1:1 oranında dilüsyon yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 1-2 dk inkübasyon yapıldı. 30 dakikadan fazla inkübasyon olursa Trypan Blue toksisitesi yüzünden canlılık azalacaktır.
- Thoma lamına 10 µL örnek koyularak boyanmış ve boyanmamış hücreler sayıldı.
- Eğer hücreler çok yoğunsa dilüsyon oranı değiştirildi.

### **3.2.8. Apoptoz Assay**

Annexin V – PI Apoptosis Detection Kit (eBioscience) kullanılarak hücrelerde apoptoz varlığı belirlendi. Ticari olarak satın alınan ürünün protokolü takip edildi.

- 10x Binding bufferdan 1ml, distile sudan 9ml alınarak 1x binding buffer hazırlandı.
- Hücreler PBS ile 1 kere yıkandı ve 1x binding buffer eklendi.
- Hücreler 1x binding buffer ile  $1 \times 10^6$  konsantrasyonda olacak şekilde dilue edildi.
- 100 µl hücre süspansiyonu için 5 µl Annexin V boyası eklendi.
- Hücreler oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
- Hücreler 1x binding buffer ile yıkandı ve 200 µl 1x binding buffer ile süspense edildi.
- 5 µl Propidium iodide (PI) boyası eklendi.
- Flow sitometride analiz edildi.

### 3.2.9. İstatistiksel Analiz

Bütün deneyler 3 tekrar halinde gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Student t-test ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlı p değeri  $<0,05$  olarak alındı.



## 4. BULGULAR

### 4.1 Real Time PCR sonuçları

Bütün Real Time PCR deneyleri 3 tekrar halinde gerçekleştirildi. GAPDH housekeeping geni kullanılarak bütün ekspresyon seviyeleri normalize edildi. Real Time verilerinin değerlendirilmesi ve istatistik analiz yapılması için internet tabanlı gen ekspresyon yazılımı kullanıldı (Qiagen) Real Time PCR sonuçları aşağıdaki gibidir (Çizelge 4.1-4.10).

Çizelge 4.1: Real Time PCR sonuçları ile ilgili bilgiler.

	<b>Kontrol</b>	<b>10 ng/ml TRAIL</b>	<b>30 ng/ml TRAIL</b>	<b>10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib</b>
<b>Gen</b>	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
TRAIL	23.48 $\pm$ 0.365	23.16 $\pm$ 0.911	22.92 $\pm$ 0.560	24.61 $\pm$ 1.309
DR4	22.49 $\pm$ 0.822	22.26 $\pm$ 0.327	22.06 $\pm$ 0.043	21.98 $\pm$ 0.845
DR5	24.07 $\pm$ 0.806	24.27 $\pm$ 0.669	22.92 $\pm$ 1.085	24.41 $\pm$ 0.780
DcR1	22.77 $\pm$ 0.221	23.13 $\pm$ 0.100	20.40 $\pm$ 0.564	23.21 $\pm$ 0.228
DcR2	26.01 $\pm$ 0.105	22.27 $\pm$ 1.409	23.85 $\pm$ 0.300	24.23 $\pm$ 0.636
OPG	24.74 $\pm$ 0.604	26.23 $\pm$ 1.387	23.72 $\pm$ 0.216	24.63 $\pm$ 0.450
NFKB	24.73 $\pm$ 0.444	21.90 $\pm$ 0.705	22.86 $\pm$ 1.767	26.26 $\pm$ 0.615
Bcl-2	25.20 $\pm$ 0.219	24.91 $\pm$ 0.435	24.42 $\pm$ 0.725	25.71 $\pm$ 0.081
Bax	24.47 $\pm$ 0.681	24.01 $\pm$ 0.165	23.86 $\pm$ 0.767	22.57 $\pm$ 0.436
Bcl-XL	24.17 $\pm$ 0.425	23.71 $\pm$ 0.112	23.13 $\pm$ 0.901	21.41 $\pm$ 0.416
GAPDH	24.06 $\pm$ 0.151	24.29 $\pm$ 0.766	23.69 $\pm$ 0.505	24.93 $\pm$ 0.510

Çizelge 4.2: Real Time PCR sonuçları ile ilgili bilgiler.

	<b>10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib</b>	<b>10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib</b>	<b>30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib</b>	<b>30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib</b>
<b>Gen</b>	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
TRAIL	22.50 ±0.726	23.90 ±0.097	22.82 ±0.667	23.96 ±0.270
DR4	24.04 ±0.095	23.25 ±0.289	23.61 ±0.916	20.23 ±1.201
DR5	24.27 ±0.393	24.70 ±1.091	24.94 ±0.232	21.93 ±0.881
DcR1	22.12 ±0.070	23.31 ±0.622	23.48 ±0.976	22.64 ±0.235
DcR2	26.82 ±0.237	25.71 ±0.127	25.51 ±0.569	25.78 ±0.109
OPG	26.03 ±1.768	24.89 ±0.096	23.79 ±0.968	24.19 ±1.149
NFKB	24.95 ±1.337	25.17 ±0.386	25.81 ±0.845	23.83 ±1.368
Bcl-2	24.56 ±0.389	23.74 ±1.873	26.01 ±0.814	25.81 ±0.461
Bax	26.88 ±1.374	25.04 ±0.584	25.44 ±0.615	24.80 ±0.244
Bcl-XL	24.61 ±0.476	24.25 ±0.378	23.33 ±1.133	23.56 ±0.270
GAPDH	24.25 ±0.671	23.66 ±0.447	24.54 ±0.337	24.01 ±0.140

Çizelge 4.3: 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib grubu için istatistiksel veriler.

	<b>30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib</b>	<b>10 nm Bortezomib</b>	<b>50 nm Bortezomib</b>	<b>100 nm Bortezomib</b>
<b>Gen</b>	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
TRAIL	23.32 ±0.681	23.44 ±0.215	23.42 ±0.130	23.39 ±0.116
DR4	19.79 ±1.432	22.59 ±0.638	22.69 ±0.513	22.53 ±0.627
DR5	24.39 ±0.846	24.07 ±0.832	24.07 ±0.898	24.04 ±0.835
DcR1	22.92 ±1.715	22.81 ±0.219	22.76 ±0.253	22.84 ±0.303
DcR2	22.26 ±1.422	25.98 ±1.422	25.92 ±0.216	25.94 ±0.228
OPG	24.83 ±1.564	24.83 ±0.111	24.58 ±0.349	24.66 ±0.365
NFKB	25.46 ±1.241	24.72 ±0.351	24.72 ±0.367	24.77 ±0.361
Bcl-2	24.09 ±0.079	25.16 ±0.197	25.12 ±0.217	25.09 ±0.248
Bax	24.65 ±1.799	24.40 ±0.704	24.41 ±0.742	24.41 ±0.516
Bcl-XL	23.76 ±1.468	24.09 ±0.281	24.03 ±0.369	24.08 ±0.315
GAPDH	23.46 ±0.570	24.05 ±0.170	24.03 ±0.202	24.09 ±0.175

Çizelge 4.4: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri.

Gen	Fold Regulation (Kontrol grubu ile karşılaştırılma)																					
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	1.46	0.412	1.14	0.550	-1.20	0.978	2.25	0.056	-1.77	0.086	2.20	0.115	-1.45	0.106	-1.36	0.163	1.02	0.964	1.02	0.988	1.09	0.696
<i>DR4</i>	1.38	0.647	1.04	0.901	2.60	0.102	-2.57	0.203	-2.22	0.236	-1.56	0.463	4.62	0.098	4.29	0.204	-1.08	0.814	-1.18	0.670	-1.01	0.909
<i>DR5</i>	1.02	0.992	1.72	0.413	1.45	0.270	-1.01	0.861	-2.04	0.349	-1.32	0.293	4.24	0.100	-1.88	0.173	-1.01	0.995	-1.02	0.979	1.04	0.894
<i>DcR1</i>	-1.09	0.992	4.01	0.070	1.34	0.316	1.79	0.139	-1.92	0.055	-1.18	0.966	1.05	0.699	-1.67	0.829	-1.04	0.778	-1.01	0.958	-1.03	0.857
<i>DcR2</i>	15.63	0.157	3.47	0.062	6.28	0.058	-1.54	0.118	-1.07	0.796	1.97	0.183	1.13	0.084	8.86	0.105	1.01	0.899	1.04	0.647	1.07	0.327
<i>OPG</i>	-2.40	0.604	1.57	0.167	1.96	0.154	-2.15	0.196	-1.46	0.271	2.68	0.087	1.40	0.367	-1.61	0.799	1.07	0.868	1.09	0.840	1.07	0.873
<i>NFKB</i>	8.36	0.116	2.85	0.159	-1.57	0.113	-1.02	0.635	-1.79	0.163	-1.52	0.326	1.81	0.348	-2.51	0.054	-1.00	0.955	-1.01	0.930	-1.00	0.972
<i>Bcl-2</i>	1.44	0.134	1.34	0.449	1.28	0.296	1.78	0.100	2.09	0.384	-1.26	0.349	-1.58	0.113	1.43	0.275	1.02	0.566	1.04	0.388	1.11	0.088
<i>Bax</i>	1.61	0.334	1.18	0.816	6.79	0.097	-4.68	0.126	-1.96	0.242	-1.41	0.414	-1.31	0.429	1.04	0.793	1.04	0.939	1.02	0.932	1.06	0.956
<i>Bcl-XL</i>	1.61	0.194	1.59	0.402	12.32	0.051	-1.19	0.857	-1.40	0.405	2.49	0.208	1.47	0.125	1.05	0.850	1.05	0.864	1.07	0.744	1.08	0.732

Çizelge 4.5: Örnek 2 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 2 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	-1,28	0,577	-1,75	0,441	1,54	0,716	-2,58	0,247	1,50	0,733	-2,12	0,276	-1,99	0,294	-1,44	0,414	-1,44	0,410	-1,34	0,445
<i>DR4</i>	-1,32	0,360	1,88	0,100	-3,54	0,018	-3,07	0,022	-2,15	0,116	3,35	0,109	3,11	0,222	-1,49	0,370	-1,62	0,216	-1,39	0,474
<i>DR5</i>	1,68	0,412	1,42	0,255	-1,03	0,866	-2,08	0,346	-1,34	0,281	4,15	0,100	-1,92	0,166	-1,03	0,998	-1,04	0,986	1,02	0,885
<i>DcRI</i>	4,38	0,073	1,47	0,398	1,95	0,178	-1,76	0,221	-1,08	0,976	1,15	0,836	-1,53	0,833	1,05	0,915	1,08	0,988	1,06	0,945
<i>DcR2</i>	-4,51	0,210	-2,49	0,303	-24,14	0,152	-16,76	0,157	-7,94	0,179	-13,90	0,159	-1,77	0,526	-15,49	0,158	-15,03	0,158	-14,59	0,159
<i>OPG</i>	3,77	0,203	4,71	0,146	1,11	0,785	1,64	0,978	6,42	0,083	3,37	0,290	1,49	0,835	2,58	0,539	2,61	0,525	2,58	0,539
<i>NFKB</i>	-2,93	0,243	-13,15	0,107	-8,50	0,133	-14,93	0,107	-12,70	0,109	-4,63	0,175	-20,97	0,102	-8,38	0,117	-8,46	0,116	-8,38	0,117
<i>Bcl-2</i>	-1,07	0,825	-1,12	0,719	1,24	0,471	1,45	0,449	-1,81	0,095	-2,27	0,054	-1,00	0,916	-1,40	0,146	-1,39	0,154	-1,30	0,219
<i>Bax</i>	-1,37	0,355	4,21	0,121	-7,55	0,031	-3,16	0,052	-2,28	0,083	-2,11	0,080	-2,78	0,329	-1,56	0,381	-1,58	0,408	-1,52	0,319
<i>Bcl-XL</i>	-1,01	0,776	7,66	0,061	-1,91	0,216	-2,25	0,121	1,54	0,411	-1,10	0,640	-1,84	0,482	-1,54	0,195	-1,50	0,214	-1,49	0,218

Çizelge 4.6: Örnek 3 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 3 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	1,28	0,577	-1,37	0,657	1,97	0,157	-2,01	0,156	1,93	0,229	-1,65	0,196	-1,55	0,231	-1,12	0,552	-1,12	0,533	-1,05	0,649
<i>DR4</i>	1,32	0,360	2,49	0,055	-2,68	0,058	-2,32	0,074	-1,63	0,345	4,42	0,090	4,10	0,196	-1,13	0,858	-1,23	0,629	-1,05	0,995
<i>DR5</i>	-1,68	0,412	-1,19	0,542	-1,73	0,393	-3,51	0,302	-2,26	0,323	2,47	0,361	-3,23	0,282	-1,73	0,413	-1,75	0,411	-1,64	0,430
<i>DcR1</i>	-4,38	0,073	-2,98	0,103	-2,24	0,155	-7,69	0,052	-4,72	0,076	-3,81	0,075	-6,71	0,122	-4,16	0,069	-4,06	0,071	-4,12	0,070
<i>DcR2</i>	4,51	0,210	1,81	0,256	-5,35	0,047	-3,71	0,061	-1,76	0,303	-3,08	0,070	2,56	0,197	-3,43	0,063	-3,33	0,065	-3,23	0,067
<i>OPG</i>	-3,77	0,203	1,25	0,444	-3,38	0,032	-2,29	0,031	1,71	0,188	-1,12	0,906	-2,53	0,285	-1,46	0,162	-1,44	0,148	-1,46	0,152
<i>NFKB</i>	2,93	0,243	-4,48	0,119	-2,89	0,264	-5,09	0,118	-4,33	0,128	-1,58	0,557	-7,14	0,104	-2,85	0,157	-2,88	0,156	-2,85	0,158
<i>Bcl-2</i>	1,07	0,825	-1,04	0,708	1,33	0,853	1,56	0,487	-1,69	0,360	-2,11	0,287	1,07	0,882	-1,31	0,463	-1,29	0,470	-1,21	0,519
<i>Bax</i>	1,37	0,355	5,76	0,100	-5,51	0,038	-2,31	0,083	-1,66	0,172	-1,54	0,158	-2,03	0,658	-1,14	0,894	-1,15	0,912	-1,11	0,843
<i>Bcl-XL</i>	1,01	0,776	7,75	0,071	-1,89	0,389	-2,22	0,322	1,56	0,636	-1,08	0,626	-1,82	0,504	-1,52	0,411	-1,48	0,424	-1,47	0,427

Çizelge 4.7: Örnek 4 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 4 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	1,75	0,441	1,37	0,657	2,69	0,109	-1,47	0,421	2,63	0,162	-1,21	0,523	-1,13	0,590	1,22	0,963	1,22	0,973	1,30	0,856
<i>DR4</i>	-1,88	0,100	-2,49	0,055	-6,67	<b>0,016</b>	-5,78	<b>0,018</b>	-4,06	<b>0,033</b>	1,78	0,240	1,65	0,367	-2,80	0,060	-3,05	0,044	-2,61	0,071
<i>DR5</i>	-1,42	0,255	1,19	0,542	-1,46	0,124	-2,96	0,088	-1,91	<b>0,017</b>	2,93	0,127	-2,73	<b>0,020</b>	-1,46	0,280	-1,48	0,273	-1,39	0,356
<i>DcRI</i>	-1,47	0,398	2,98	0,103	1,33	0,473	-2,58	0,089	-1,58	0,455	-1,28	0,402	-2,25	0,845	-1,39	0,284	-1,36	0,316	-1,38	0,298
<i>DcR2</i>	2,49	0,303	-1,81	0,256	-9,69	0,051	-6,73	0,058	-3,19	0,115	-5,58	0,062	1,41	0,436	-6,22	0,059	-6,03	0,060	-5,86	0,060
<i>OPG</i>	-4,71	0,146	-1,25	0,444	-4,23	0,063	-2,87	0,074	1,36	0,463	-1,40	0,611	-3,16	0,187	-1,83	0,161	-1,80	0,159	-1,83	0,158
<i>NFKB</i>	13,15	0,107	4,48	0,119	1,55	0,384	-1,14	0,888	1,04	0,740	2,84	0,248	-1,59	0,239	1,57	0,074	1,55	0,085	1,57	0,089
<i>Bcl-2</i>	1,12	0,719	1,04	0,708	1,39	0,344	1,63	0,429	-1,62	0,188	-2,03	0,105	1,11	0,712	-1,25	0,323	-1,24	0,339	-1,16	0,460
<i>Bax</i>	-4,21	0,121	-5,76	0,100	-31,78	0,072	-13,30	0,078	-9,58	0,084	-8,90	0,084	-11,69	0,093	-6,56	0,099	-6,65	0,100	-6,38	0,097
<i>Bcl-XL</i>	-7,66	0,061	-7,75	0,071	-14,66	0,051	-17,23	0,049	-4,96	0,089	-8,40	0,057	-14,09	0,054	-11,77	0,052	-11,47	0,052	-11,39	0,052



Çizelge 4.8: Örnek 5 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 5 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 6		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	-1,54	0,716	-1,97	0,157	-2,69	0,109	-3,97	0,023	-1,02	0,997	-3,26	0,026	-3,05	0,029	-2,21	0,054	-2,21	0,051	-2,07	0,061
<i>DR4</i>	3,54	0,018	2,68	0,058	6,67	0,016	1,15	0,739	1,64	0,357	11,85	0,062	11,00	0,152	2,38	0,165	2,18	0,161	2,55	0,148
<i>DR5</i>	1,03	0,866	1,73	0,393	1,46	0,124	-2,03	0,348	-1,31	0,181	4,27	0,096	-1,87	0,118	-1,00	0,872	-1,01	0,891	1,05	0,748
<i>DcRI</i>	-1,95	0,178	2,24	0,155	-1,33	0,473	-3,43	0,056	-2,11	0,215	-1,70	0,170	-3,00	0,548	-1,86	0,129	-1,81	0,140	-1,84	0,134
<i>DcR2</i>	24,14	0,152	5,35	0,047	9,69	0,051	1,44	0,265	3,04	0,116	1,74	0,047	13,67	0,098	1,56	0,112	1,61	0,100	1,65	0,071
<i>OPG</i>	-1,11	0,785	3,38	0,032	4,23	0,063	1,47	0,589	5,76	0,047	3,02	0,146	1,34	0,591	2,31	0,126	2,35	0,104	2,31	0,119
<i>NFKB</i>	8,50	0,133	2,89	0,264	-1,55	0,384	-1,76	0,376	-1,49	0,438	1,84	0,561	-2,47	0,292	1,01	0,622	1,00	0,617	1,01	0,627
<i>Bcl-2</i>	-1,24	0,471	-1,33	0,853	-1,39	0,344	1,18	0,506	-2,24	0,076	-2,81	0,052	-1,24	0,609	-1,74	0,107	-1,72	0,110	-1,61	0,137
<i>Bax</i>	7,55	0,031	5,51	0,038	31,78	0,072	2,39	0,354	3,32	0,130	3,57	0,066	2,72	0,392	4,85	0,126	4,78	0,146	4,98	0,079
<i>Bcl-XL</i>	1,91	0,216	1,89	0,389	14,66	0,051	-1,18	0,664	2,96	0,204	1,75	0,210	1,04	0,794	1,25	0,778	1,28	0,715	1,29	0,699

Çizelge 4.9: Örnek 6 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 6 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	2,58	0,247	2,01	0,156	1,47	0,421	3,97	0,023	3,88	0,055	1,22	0,441	1,30	0,296	1,80	0,051	1,80	0,032	1,92	0,025
<i>DR4</i>	3,07	0,022	2,32	0,074	5,78	0,018	-1,15	0,739	1,42	0,453	10,27	0,064	9,54	0,155	2,06	0,202	1,89	0,206	2,21	0,178
<i>DR5</i>	2,08	0,346	3,51	0,302	2,96	0,088	2,03	0,348	1,55	0,716	8,65	0,078	1,08	0,883	2,02	0,358	2,00	0,367	2,13	0,314
<i>DcRI</i>	1,76	0,221	7,69	0,052	2,58	0,089	3,43	0,056	1,63	0,363	2,02	0,060	1,15	0,519	1,85	0,072	1,90	0,071	1,87	0,074
<i>DcR2</i>	16,76	0,157	3,71	0,061	6,73	0,058	-1,44	0,265	2,11	0,177	1,21	0,333	9,49	0,104	1,08	0,754	1,11	0,631	1,15	0,501
<i>OPG</i>	-1,64	0,978	2,29	0,031	2,87	0,074	-1,47	0,589	3,91	0,053	2,05	0,179	-1,10	0,755	1,57	0,152	1,59	0,114	1,57	0,141
<i>NFKB</i>	14,93	0,107	5,09	0,118	1,14	0,888	1,76	0,376	1,18	0,712	3,23	0,244	-1,40	0,442	1,78	0,136	1,77	0,147	1,78	0,147
<i>Bcl-2</i>	-1,45	0,449	-1,56	0,487	-1,63	0,429	-1,18	0,506	-2,63	0,364	-3,30	0,346	-1,46	0,458	-2,04	0,387	-2,02	0,389	-1,89	0,398
<i>Bax</i>	3,16	0,052	2,31	0,083	13,30	0,078	-2,39	0,354	1,39	0,429	1,49	0,267	1,14	0,591	2,03	0,233	2,00	0,259	2,08	0,165
<i>Bcl-XL</i>	2,25	0,121	2,22	0,322	17,23	0,049	1,18	0,664	3,47	0,172	2,05	0,069	1,22	0,607	1,46	0,291	1,50	0,261	1,51	0,251

Çizelge 4.10: Örnek 7 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 7 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	-1,50	0,733	-1,93	0,229	-2,63	0,162	1,02	0,997	-3,88	0,055	-3,19	0,063	-2,98	0,068	-2,16	0,114	-2,16	0,111	-2,02	0,127
<i>DR4</i>	2,15	0,116	1,63	0,345	4,06	0,033	-1,64	0,357	-1,42	0,453	7,21	0,074	6,70	0,171	1,45	0,525	1,33	0,633	1,55	0,452
<i>DR5</i>	1,34	0,281	2,26	0,323	1,91	0,017	1,31	0,181	-1,55	0,716	5,58	0,081	-1,43	0,327	1,30	0,314	1,29	0,327	1,38	0,261
<i>DcRI</i>	1,08	0,976	4,72	0,076	1,58	0,455	2,11	0,215	-1,63	0,363	1,24	0,854	-1,42	0,829	1,14	0,968	1,16	0,980	1,15	0,989
<i>DcR2</i>	7,94	0,179	1,76	0,303	3,19	0,115	-3,04	0,116	-2,11	0,177	-1,75	0,222	4,50	0,139	-1,95	0,186	-1,89	0,197	-1,84	0,205
<i>OPG</i>	-6,42	0,083	-1,71	0,188	-1,36	0,463	-5,76	0,047	-3,91	0,053	-1,91	0,276	-4,31	0,101	-2,49	0,090	-2,46	0,089	-2,49	0,089
<i>NFKB</i>	12,70	0,109	4,33	0,128	-1,04	0,740	1,49	0,438	-1,18	0,712	2,74	0,270	-1,65	0,312	1,52	0,307	1,50	0,324	1,52	0,315
<i>Bcl-2</i>	1,81	0,095	1,69	0,360	1,62	0,188	2,24	0,076	2,63	0,364	-1,25	0,516	1,80	0,193	1,29	0,290	1,30	0,265	1,39	0,161
<i>Bax</i>	2,28	0,083	1,66	0,172	9,58	0,084	-3,32	0,130	-1,39	0,429	1,08	0,861	-1,22	0,794	1,46	0,388	1,44	0,414	1,50	0,312
<i>Bcl-XL</i>	-1,54	0,411	-1,56	0,636	4,96	0,089	-2,96	0,204	-3,47	0,172	-1,69	0,320	-2,84	0,271	-2,37	0,212	-2,31	0,219	-2,30	0,220

Çizelge 4.11: Örnek 8 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 8 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	2,12	0,276	1,65	0,196	1,21	0,523	3,26	0,026	-1,22	0,441	3,19	0,063	1,07	0,504	1,48	0,048	1,48	0,017	1,58	0,015
<i>DR4</i>	-3,35	0,109	-4,42	0,090	-1,78	0,240	-11,85	0,062	-10,27	0,064	-7,21	0,074	-1,08	0,931	-4,98	0,088	-5,43	0,082	-4,65	0,092
<i>DR5</i>	-4,15	0,100	-2,47	0,361	-2,93	0,127	-4,27	0,096	-8,65	0,078	-5,58	0,081	-7,98	0,073	-4,28	0,101	-4,33	0,100	-4,06	0,104
<i>DcRI</i>	-1,15	0,836	3,81	0,075	1,28	0,402	1,70	0,170	-2,02	0,060	-1,24	0,854	-1,76	0,880	-1,09	0,560	-1,06	0,692	-1,08	0,618
<i>DcR2</i>	13,90	0,159	3,08	0,070	5,58	0,062	-1,74	0,047	-1,21	0,333	1,75	0,222	7,87	0,108	-1,11	0,104	-1,08	0,339	-1,05	0,333
<i>OPG</i>	-3,37	0,290	1,12	0,906	1,40	0,611	-3,02	0,146	-2,05	0,179	1,91	0,276	-2,26	0,370	-1,31	0,391	-1,29	0,390	-1,31	0,386
<i>NFKB</i>	4,63	0,175	1,58	0,557	-2,84	0,248	-1,84	0,561	-3,23	0,244	-2,74	0,270	-4,53	0,208	-1,81	0,343	-1,83	0,341	-1,81	0,345
<i>Bcl-2</i>	2,27	0,054	2,11	0,287	2,03	0,105	2,81	0,052	3,30	0,346	1,25	0,516	2,26	0,127	1,62	0,093	1,64	0,086	1,75	0,056
<i>Bax</i>	2,11	0,080	1,54	0,158	8,90	0,084	-3,57	0,066	-1,49	0,267	-1,08	0,861	-1,31	0,827	1,36	0,401	1,34	0,430	1,39	0,315
<i>Bcl-XL</i>	1,10	0,640	1,08	0,626	8,40	0,057	-1,75	0,210	-2,05	0,069	1,69	0,320	-1,68	0,624	-1,40	0,098	-1,37	0,126	-1,36	0,131

Çizelge 4.12: Örnek 9 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 9 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 10		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	1,99	0,294	1,55	0,231	1,13	0,590	3,05	0,029	-1,30	0,296	2,98	0,068	-1,07	0,504	1,38	0,087	1,38	0,040	1,48	0,030
<i>DR4</i>	-3,11	0,222	-4,10	0,196	-1,65	0,367	-11,00	0,152	-9,54	0,155	-6,70	0,171	1,08	0,931	-4,63	0,192	-5,04	0,184	-4,32	0,197
<i>DR5</i>	1,92	0,166	3,23	0,282	2,73	0,020	1,87	0,118	-1,08	0,883	1,43	0,327	7,98	0,073	1,87	0,186	1,84	0,193	1,97	0,160
<i>DcR1</i>	1,53	0,833	6,71	0,122	2,25	0,845	3,00	0,548	-1,15	0,519	1,42	0,829	1,76	0,880	1,61	0,802	1,65	0,824	1,63	0,811
<i>DcR2</i>	1,77	0,526	-2,56	0,197	-1,41	0,436	-13,67	0,098	-9,49	0,104	-4,50	0,139	-7,87	0,108	-8,77	0,105	-8,52	0,106	-8,26	0,107
<i>OPG</i>	-1,49	0,835	2,53	0,285	3,16	0,187	-1,34	0,591	1,10	0,755	4,31	0,101	2,26	0,370	1,73	0,728	1,75	0,715	1,73	0,731
<i>NFKB</i>	20,97	0,102	7,14	0,104	1,59	0,239	2,47	0,292	1,40	0,442	1,65	0,312	4,53	0,208	2,50	0,037	2,48	0,042	2,50	0,044
<i>Bcl-2</i>	1,00	0,916	-1,07	0,882	-1,11	0,712	1,24	0,609	1,46	0,458	-1,80	0,193	-2,26	0,127	-1,40	0,292	-1,38	0,302	-1,29	0,370
<i>Bax</i>	2,78	0,329	2,03	0,658	11,69	0,093	-2,72	0,392	-1,14	0,591	1,22	0,794	1,31	0,827	1,78	0,753	1,76	0,753	1,83	0,754
<i>Bcl-XL</i>	1,84	0,482	1,82	0,504	14,09	0,054	-1,04	0,794	-1,22	0,607	2,84	0,271	1,68	0,624	1,20	0,881	1,23	0,917	1,24	0,926

Çizelge 4.13: Örnek 10 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 10 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 11		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	1,44	0,414	1,12	0,552	-1,22	0,963	2,21	0,054	-1,80	0,051	2,16	0,114	-1,48	0,048	-1,38	0,087	-1,00	0,964	1,07	0,675
<i>DR4</i>	1,49	0,370	1,13	0,858	2,80	0,060	-2,38	0,165	-2,06	0,202	-1,45	0,525	4,98	0,088	4,63	0,192	-1,09	0,818	1,07	0,888
<i>DR5</i>	1,03	0,998	1,73	0,413	1,46	0,280	1,00	0,872	-2,02	0,358	-1,30	0,314	4,28	0,101	-1,87	0,186	-1,01	0,984	1,05	0,891
<i>DcRI</i>	-1,05	0,915	4,16	0,069	1,39	0,284	1,86	0,129	-1,85	0,072	-1,14	0,968	1,09	0,560	-1,61	0,802	1,03	0,846	1,01	0,935
<i>DcR2</i>	15,49	0,158	3,43	0,063	6,22	0,059	-1,56	0,112	-1,08	0,754	1,95	0,186	1,11	0,104	8,77	0,105	1,03	0,720	1,06	0,390
<i>OPG</i>	-2,58	0,539	1,46	0,162	1,83	0,161	-2,31	0,126	-1,57	0,152	2,49	0,090	1,31	0,391	-1,73	0,728	1,01	0,977	1,00	0,989
<i>NFKB</i>	8,38	0,117	2,85	0,157	-1,57	0,074	-1,01	0,622	-1,78	0,136	-1,52	0,307	1,81	0,343	-2,50	0,037	-1,01	0,969	1,00	0,984
<i>Bcl-2</i>	1,40	0,146	1,31	0,463	1,25	0,323	1,74	0,107	2,04	0,387	-1,29	0,290	-1,62	0,093	1,40	0,292	1,01	0,458	1,08	0,073
<i>Bax</i>	1,56	0,381	1,14	0,894	6,56	0,099	-4,85	0,126	-2,03	0,233	-1,46	0,388	-1,36	0,401	-1,78	0,753	-1,01	0,990	1,03	0,975
<i>Bcl-XL</i>	1,54	0,195	1,52	0,411	11,77	0,052	-1,25	0,778	-1,46	0,291	2,37	0,212	1,40	0,098	-1,20	0,881	1,03	0,793	1,03	0,742

Çizelge 4.14: Örnek 11 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 11 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 12	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	1,44	0,410	1,12	0,533	-1,22	0,973	2,21	0,051	-1,80	0,032	2,16	0,111	-1,48	0,017	-1,38	0,040	1,00	0,964	1,07	0,572
<i>DR4</i>	1,62	0,216	1,23	0,629	3,05	0,044	-2,18	0,161	-1,89	0,206	-1,33	0,633	5,43	0,082	5,04	0,184	1,09	0,818	1,17	0,709
<i>DR5</i>	1,04	0,986	1,75	0,411	1,48	0,273	1,01	0,891	-2,00	0,367	-1,29	0,327	4,33	0,100	-1,84	0,193	1,01	0,984	1,07	0,876
<i>DcRI</i>	-1,08	0,988	4,06	0,071	1,36	0,316	1,81	0,140	-1,90	0,071	-1,16	0,980	1,06	0,692	-1,65	0,824	-1,03	0,846	-1,02	0,912
<i>DcR2</i>	15,03	0,158	3,33	0,065	6,03	0,060	-1,61	0,100	-1,11	0,631	1,89	0,197	1,08	0,339	8,52	0,106	-1,03	0,720	1,03	0,744
<i>OPG</i>	-2,61	0,525	1,44	0,148	1,80	0,159	-2,35	0,104	-1,59	0,114	2,46	0,089	1,29	0,390	-1,75	0,715	-1,01	0,977	-1,01	0,964
<i>NFKB</i>	8,46	0,116	2,88	0,156	-1,55	0,085	-1,00	0,617	-1,77	0,147	-1,50	0,324	1,83	0,341	-2,48	0,042	1,01	0,969	1,01	0,955
<i>Bcl-2</i>	1,39	0,154	1,29	0,470	1,24	0,339	1,72	0,110	2,02	0,389	-1,30	0,265	-1,64	0,086	1,38	0,302	-1,01	0,458	1,07	0,104
<i>Bax</i>	1,58	0,408	1,15	0,912	6,65	0,100	-4,78	0,146	-2,00	0,259	-1,44	0,414	-1,34	0,430	-1,76	0,753	1,01	0,990	1,04	0,966
<i>Bcl-XL</i>	1,50	0,214	1,48	0,424	11,47	0,052	-1,28	0,715	-1,50	0,261	2,31	0,219	1,37	0,126	-1,23	0,917	-1,03	0,793	1,01	0,953

Çizelge 4.15: Örnek 12 ile karşılaştırıldığında “fold regulation” ve p değerleri

Gen	Fold Regulation (Örnek 12 ile karşılaştırılma)																			
	Örnek 2		Örnek 3		Örnek 4		Örnek 5		Örnek 6		Örnek 7		Örnek 8		Örnek 9		Örnek 10		Örnek 11	
	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri	Fold Regulation	p-değeri
<i>TRAIL</i>	1,34	0,445	1,05	0,649	-1,30	0,856	2,07	0,061	-1,92	0,025	2,02	0,127	-1,58	0,015	-1,48	0,030	-1,07	0,675	-1,07	0,572
<i>DR4</i>	1,39	0,474	1,05	0,995	2,61	0,071	-2,55	0,148	-2,21	0,178	-1,55	0,452	4,65	0,092	4,32	0,197	-1,07	0,888	-1,17	0,709
<i>DR5</i>	-1,02	0,885	1,64	0,430	1,39	0,356	-1,05	0,748	-2,13	0,314	-1,38	0,261	4,06	0,104	-1,97	0,160	-1,05	0,891	-1,07	0,876
<i>DcRI</i>	-1,06	0,945	4,12	0,070	1,38	0,298	1,84	0,134	-1,87	0,074	-1,15	0,989	1,08	0,618	-1,63	0,811	-1,01	0,935	1,02	0,912
<i>DcR2</i>	14,59	0,159	3,23	0,067	5,86	0,060	-1,65	0,071	-1,15	0,501	1,84	0,205	1,05	0,333	8,26	0,107	-1,06	0,390	-1,03	0,744
<i>OPG</i>	-2,58	0,539	1,46	0,152	1,83	0,158	-2,31	0,119	-1,57	0,141	2,49	0,089	1,31	0,386	-1,73	0,731	-1,00	0,989	1,01	0,964
<i>NFKB</i>	8,38	0,117	2,85	0,158	-1,57	0,089	-1,01	0,627	-1,78	0,147	-1,52	0,315	1,81	0,345	-2,50	0,044	1,00	0,984	-1,01	0,955
<i>Bcl-2</i>	1,30	0,219	1,21	0,519	1,16	0,460	1,61	0,137	1,89	0,398	-1,39	0,161	-1,75	0,056	1,29	0,370	-1,08	0,073	-1,07	0,104
<i>Bax</i>	1,52	0,319	1,11	0,843	6,38	0,097	-4,98	0,079	-2,08	0,165	-1,50	0,312	-1,39	0,315	-1,83	0,754	-1,03	0,975	-1,04	0,966
<i>Bcl-XL</i>	1,49	0,218	1,47	0,427	11,39	0,052	-1,29	0,699	-1,51	0,251	2,30	0,220	1,36	0,131	-1,24	0,926	-1,03	0,742	-1,01	0,953

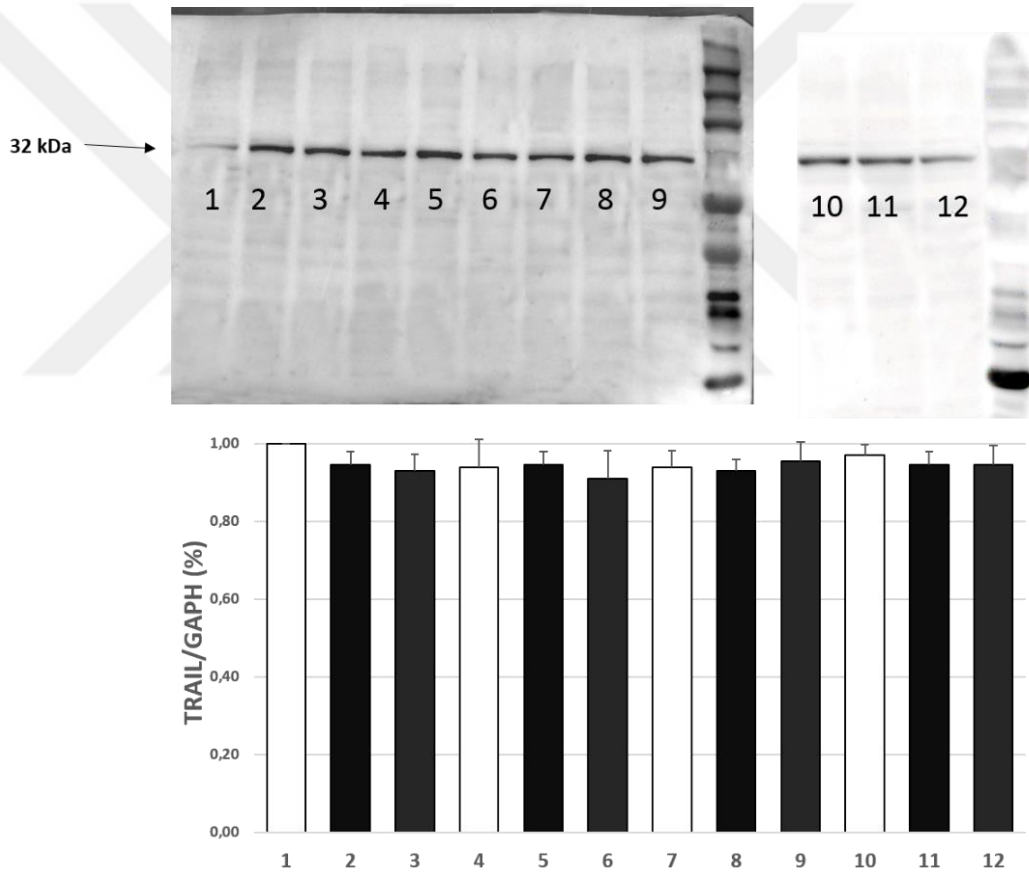


## 4.2 Western Blot Sonuçları

### 4.2.1. TRAIL protein sonuçları

TRAIL protein seviyesinin belirlenmesi için poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. TRAIL proteini ~32 kDa bant büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 4.1). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )

Şekil 4.1: TRAIL western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği

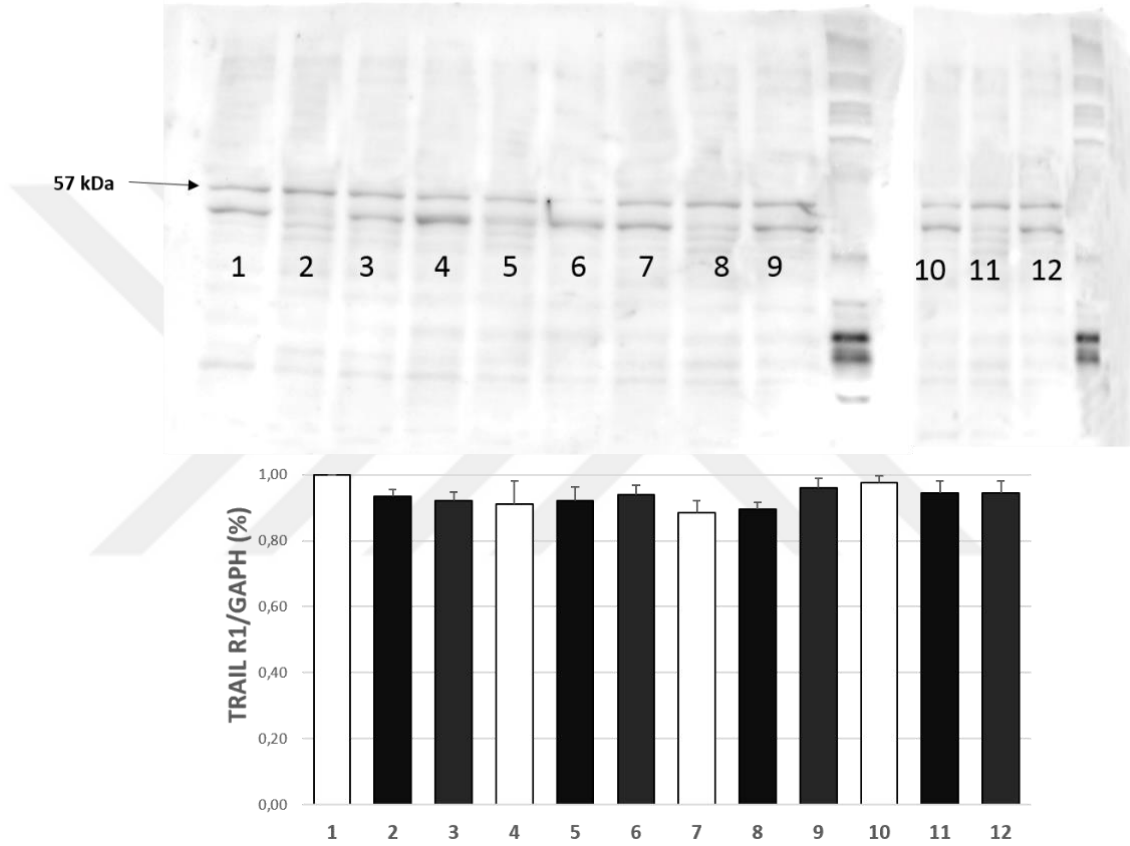


### 4.2.2. TRAIL-R1 (DR4) protein sonuçları

TRAIL-R1 protein seviyesinin belirlenmesi için poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. TRAIL-R1 proteini yaklaşık ~57 kDa

bant büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 4.2). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )

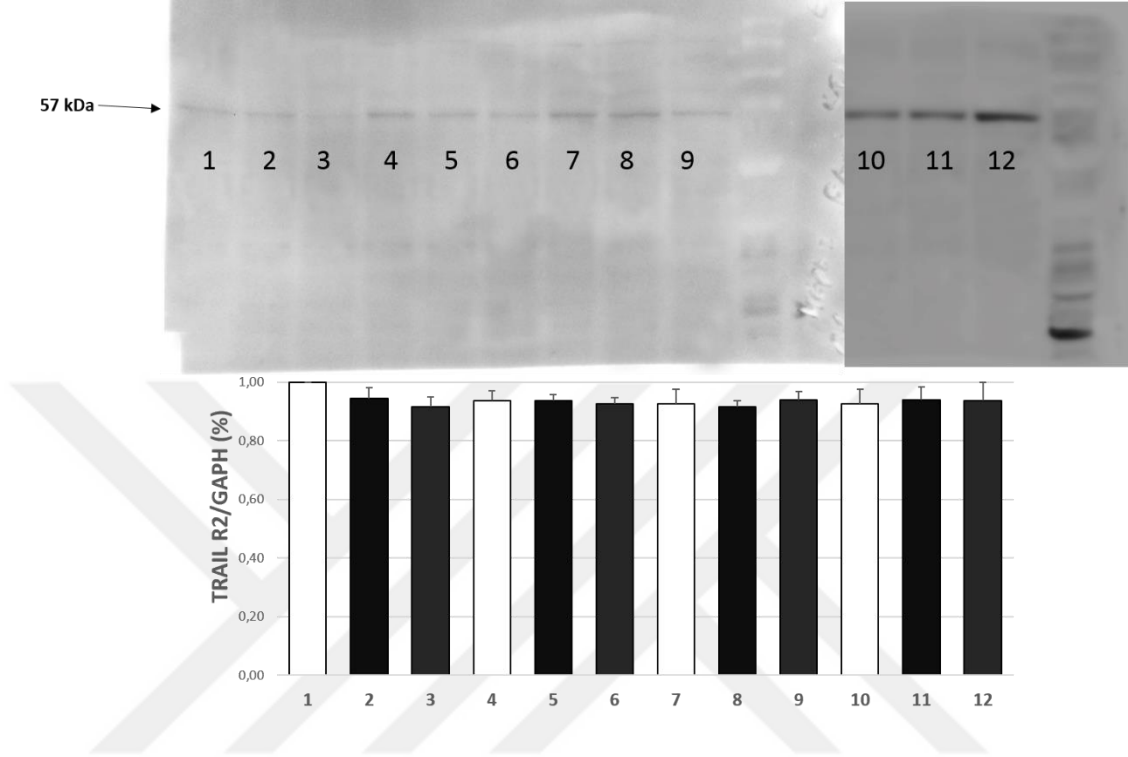
Şekil 4.2: TRAIL western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği



#### 4.2.3. TRAIL-R2 (DR5) protein sonuçları

TRAIL-R2 protein seviyesinin belirlenmesi için poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. TRAIL-R2 proteini yaklaşık ~57 kDa bant büyüklüğünde gözlemlendi (Resim 4.3) . Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )

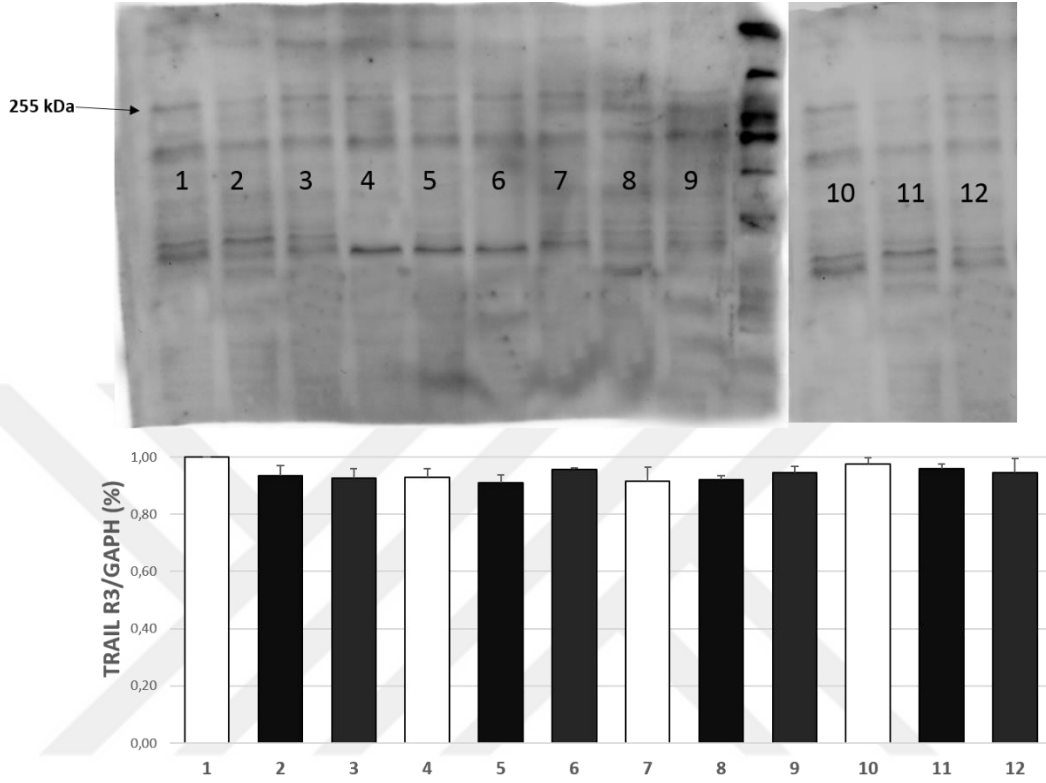
Şekil 4.3: TRAIL-R2 western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği .



#### 4.2.4. TRAIL-R3 (DcR1) protein sonuçları

TRAIL-R3 protein seviyesinin belirlenmesi için poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. TRAIL-R3 proteini yaklaşık ~255 kDa bant büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 4.4). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )

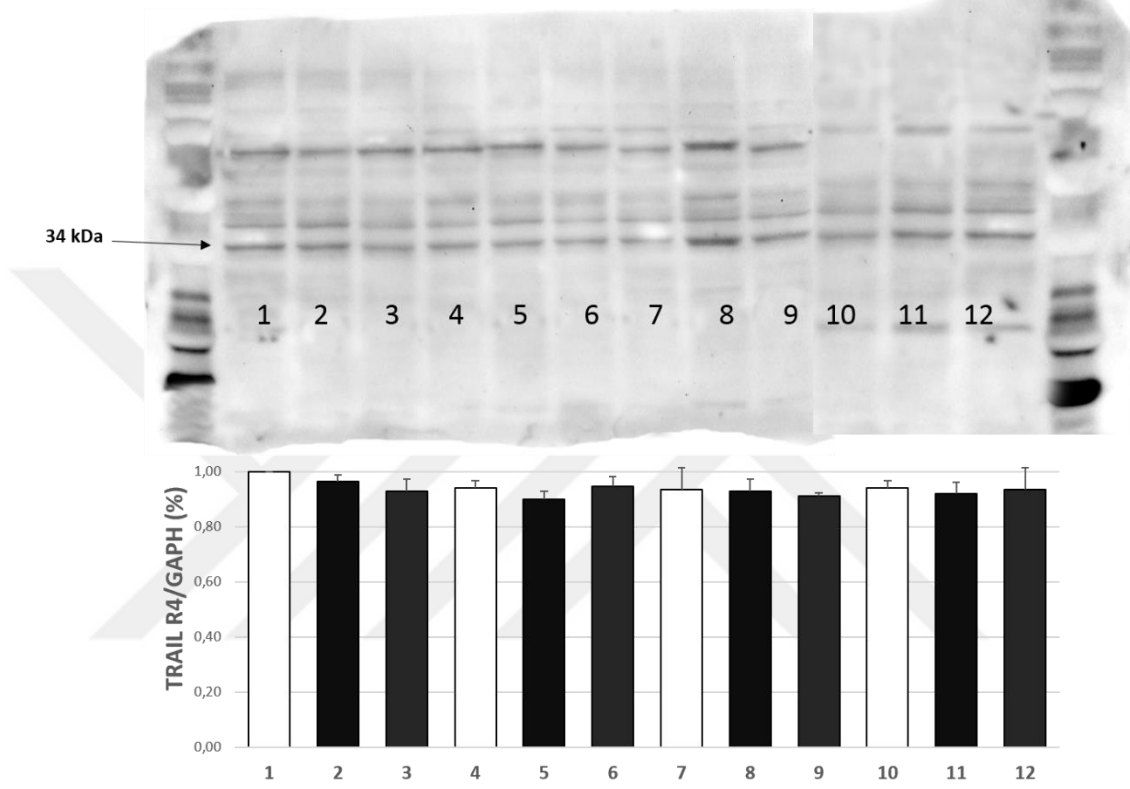
Şekil 4.4: TRAIL-R3 western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği.



#### 4.2.5. TRAIL-R4 (DcR2) protein sonuçları

TRAIL-R4 protein seviyesinin belirlenmesi için poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. TRAIL-R4 proteini yaklaşık ~34 kDa bant büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 4.5). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )

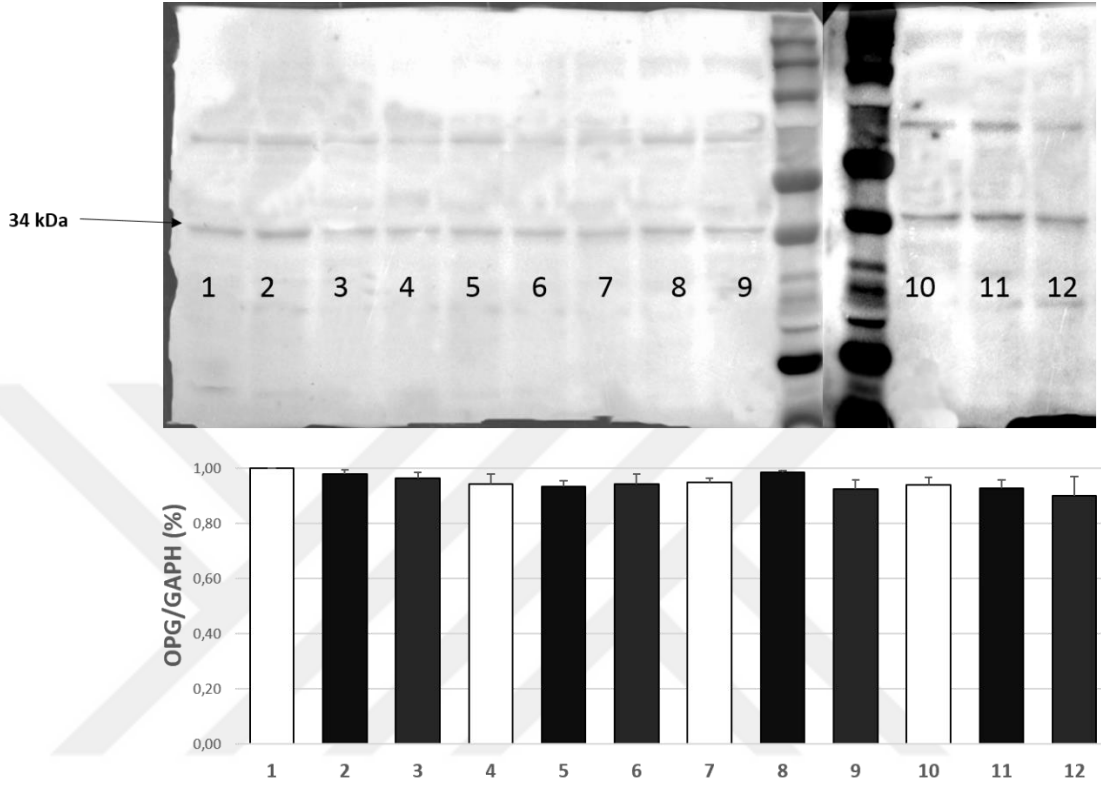
Şekil 4.5: TRAIL-R4 western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği.



#### 4.2.6. Osteoprotegerin (OPG) protein sonuçları

OPG protein seviyesinin belirlenmesi için poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. OPG proteini yaklaşık ~105 kDa bant büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 4.6). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )

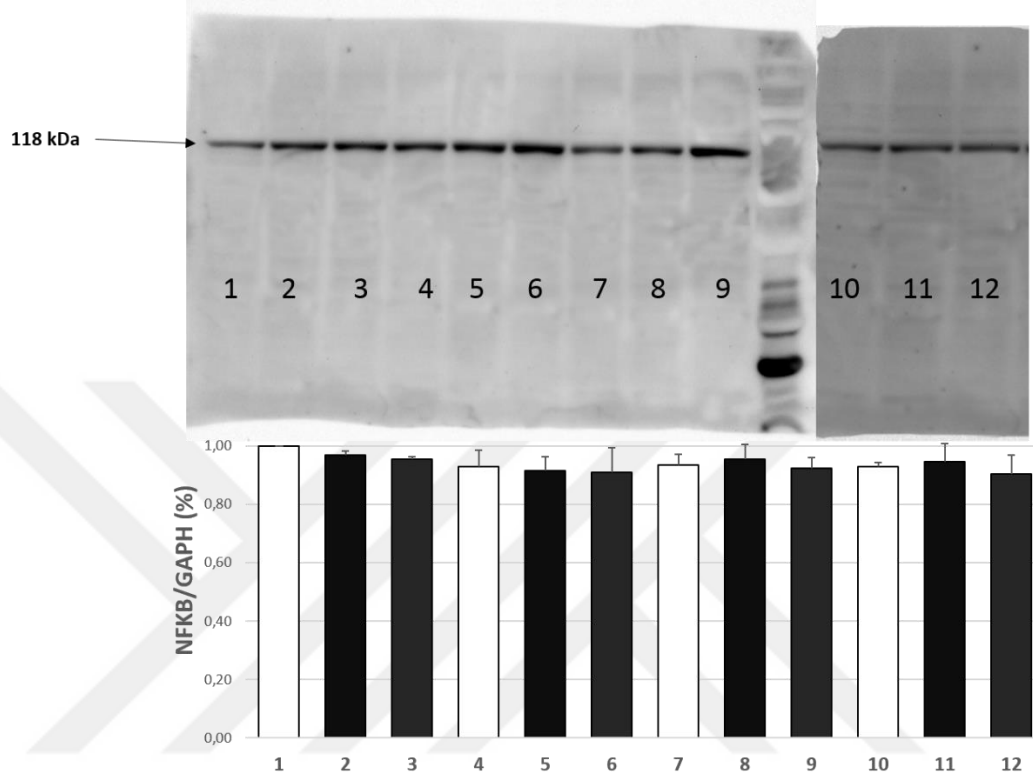
Şekil 4.6: OPG western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği



#### 4.2.7. NFKB protein sonuçları

NFKB protein seviyesinin belirlenmesi için p50 alt ünitesine özgü poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. NFKB proteini yaklaşık ~118 kDa bant büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 4.7). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )

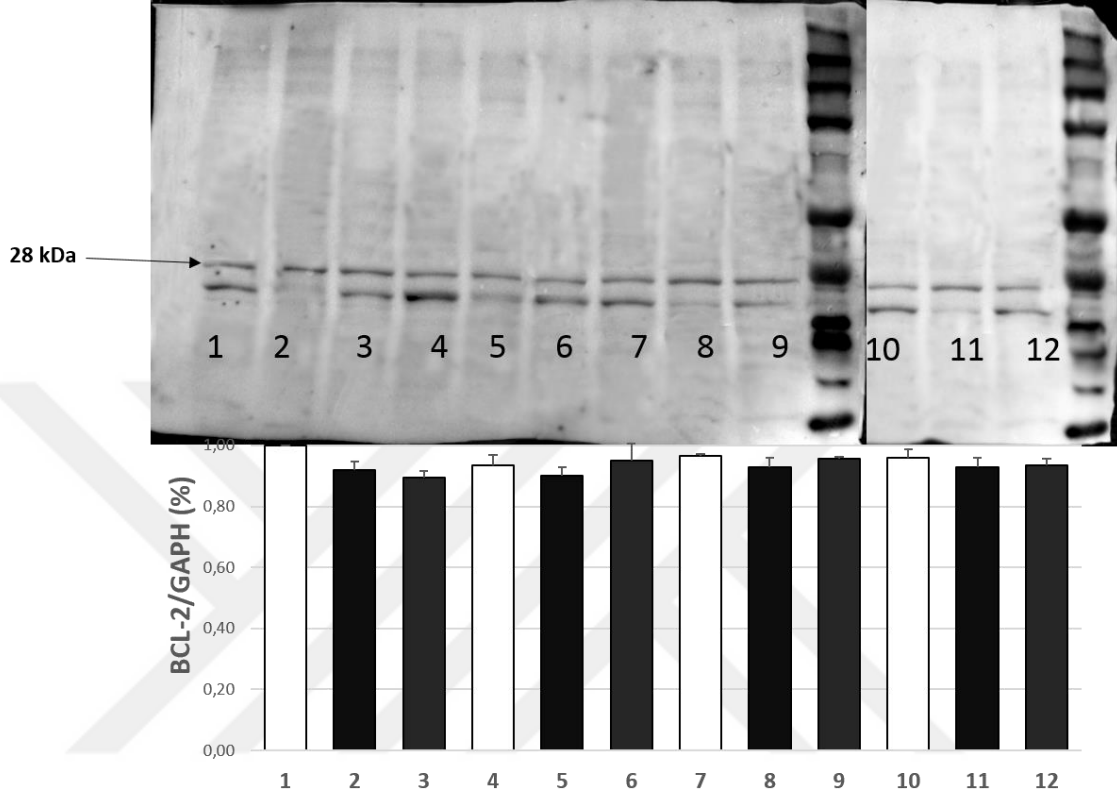
Şekil 4.7: NFKB western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği.



#### 4.2.8. BCL-2 protein sonuçları

Bcl-2 protein seviyesinin belirlenmesi için p50 alt ünitesine özgü poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. Bcl-2 proteini yaklaşık ~28 kDa bant büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 4.8). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )

Şekil 4.8: Bcl-2 western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği.

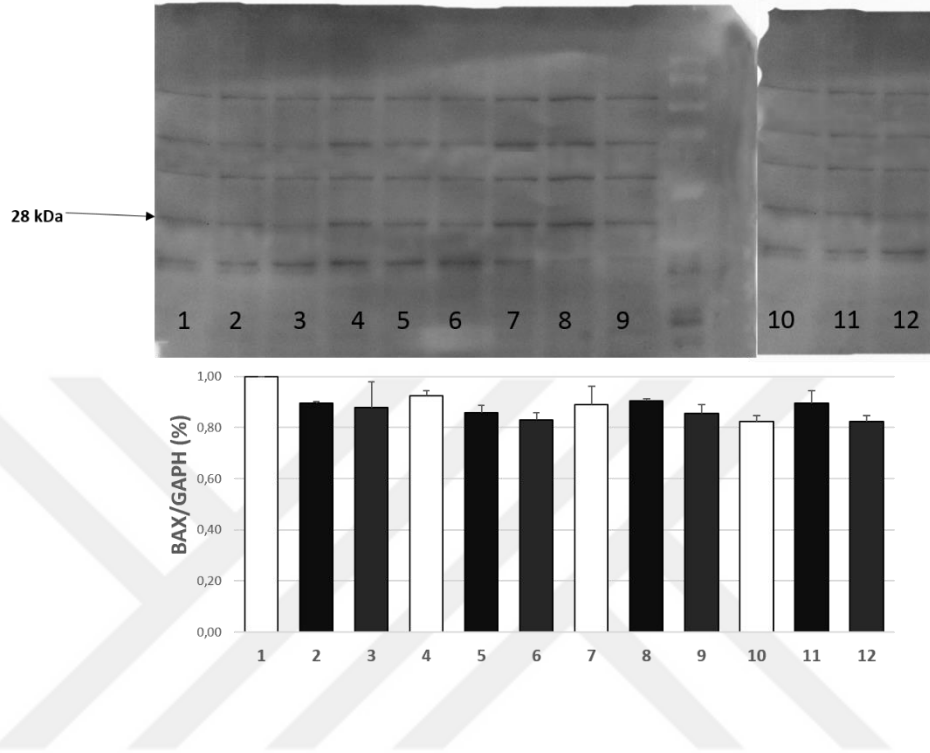


#### 4.2.9. BAX protein sonuçları

Bax protein seviyesinin belirlenmesi için poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. Bax proteini yaklaşık ~28 kDa bant büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 4.9). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )



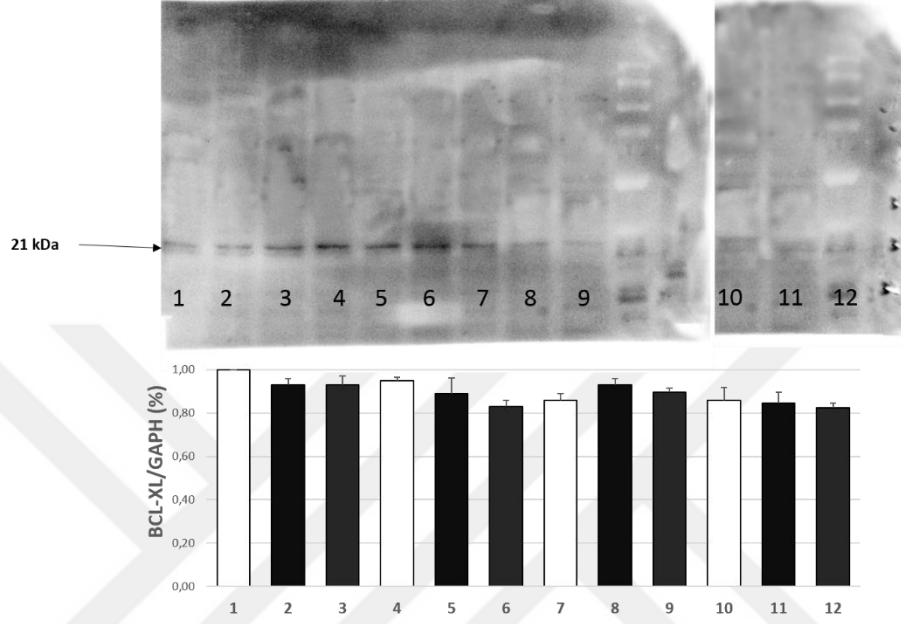
Şekil 4.9: Bax western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği.



#### 4.2.10. BCL-XL protein sonuçları

Bcl-XL protein seviyesinin belirlenmesi için poliklonal, rabbit primer antibody ve HRP bağlı sekonder antirabbit antibody kullanıldı. Bax proteini yaklaşık ~21 kDa bant büyüklüğünde gözlemlendi (Şekil 4.10). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0.05$ )

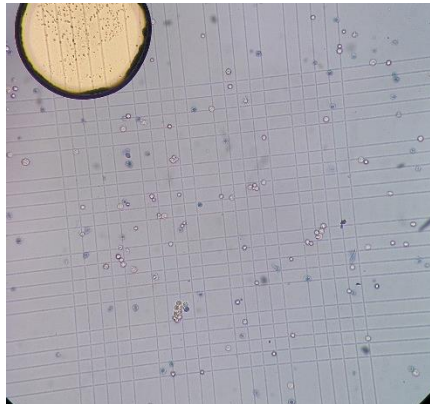
Şekil 4.10: Bcl-XL western blot membran görüntüsü ve protein seviyesi grafiği.



### 4.3 Hücre Canlılık Testi (Cell Viability Assay) ve Apoptoz Assay Sonuçları

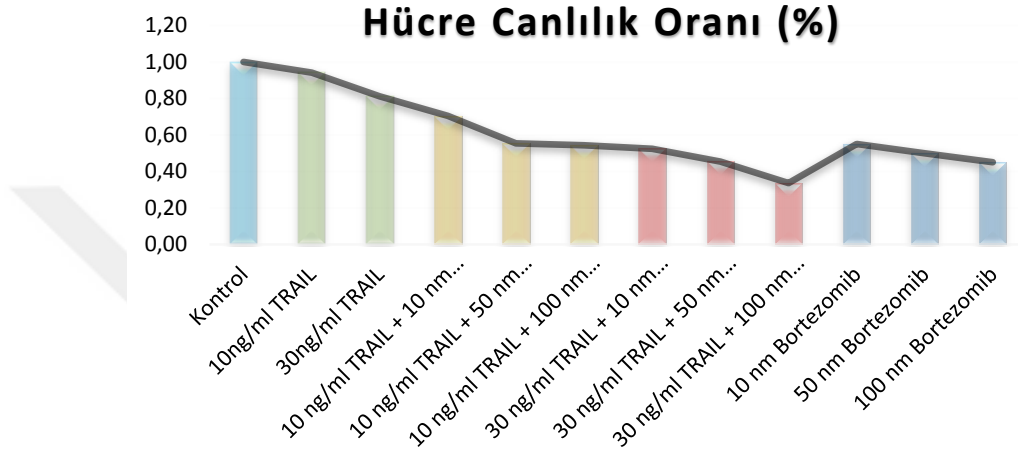
Ölü hücreler Trypan Blue ile boyanarak mavi, canlı hücreler renksiz olarak gözlemlendi. Mikroskop altında thoma lamında sayım yapılarak canlı hücre miktarı tespit edildi (Şekil 4.11).

Şekil 4.11: Canlı ve ölü hücrelerin mikroskop altındaki görüntüsü



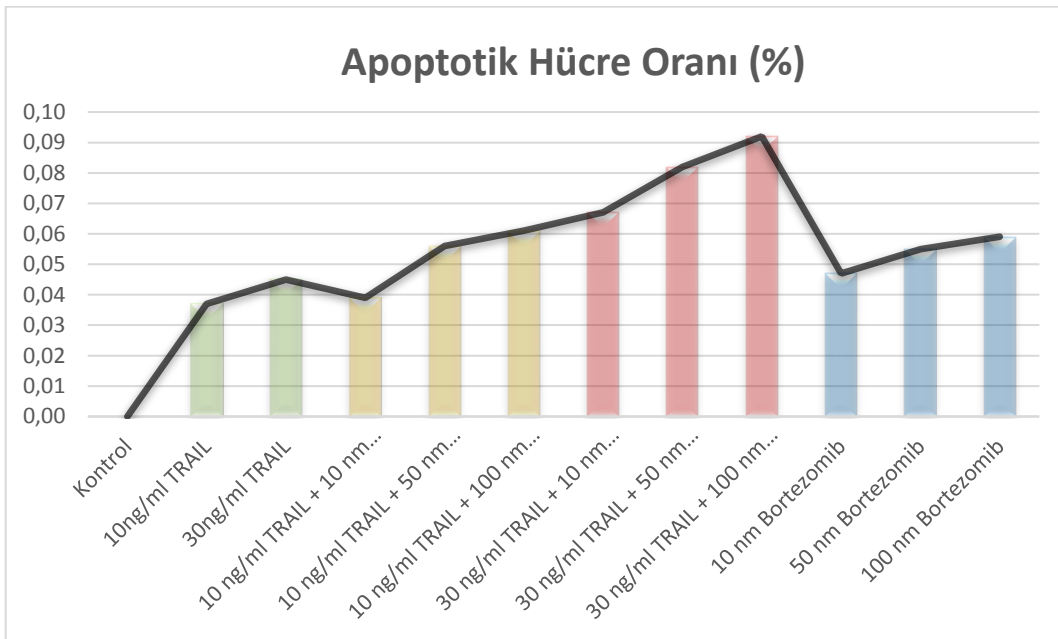
Bortezomibin artan dozlarıyla birlikte hücre canlılık oranının azaldığı görülmüştür. (Çizelge 4.16)

Çizelge 4.16: Bortezomib uygulamaları sonrası hücre canlılık oranlarının histogram grafiği



Annexin V ve PI boyları ile boyanan hücreler apoptoz assay için flow sitometride okutuldu. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17: Bortezomib uygulamaları sonrası apoptotik hücre oranı (%).



## 5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri vakalarının %85'inden fazlasını oluşturan NSCLC'nın anlaşılması; antitümörel ajanlardan olan TRAIL ve Bortezomib'in TRAIL bağımlı apoptoz yollarında etkisinin araştırılması için, akciğer kanseri hücre hattı kültürü hücrelerinden olan A549 hücre hattında TNF-bağımlı apoptoz-uyarıcı ligand (TRAIL) ile uyarılan apoptoz yolağında görev alan genlerin ekspresyon profilleri araştırılmıştır. Bu genlerle ilgili protein miktarlarının incelenmesi; rekombinant TRAIL (rTRAIL) ve Bortezomib antitümör ajanların çeşitli kombinasyonlarının bu yolak gen ekspresyonunu ve protein miktarlarını nasıl etkilediğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Akciğer kanseri kanser kaynaklı ölümlerin başında gelmektedir. Artan sigara kullanımıyla birlikte akciğer kanseri vakalarında artış gözlenmektedir. Kanser vakalarında apoptoz ve hücre proliferasyonu arasındaki dengenin bozulmasının patogeneze katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (1-3).

Çalışmamızda TRAIL ve Bortezomib uygulaması yapılan hücrelerde A549 hücre hattı rTRAIL proteini ve Bortezomib'in farklı konsantrasyonlarına 18 saat maruz bırakılmıştır. Bu maruziyet sonrasında hücre hattında TRAIL, TRAIL- R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, OPG, Bcl-2, Bax, Bcl-XL genlerinin RNA ve protein ekspresyonları belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu genler için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Uygulama yapılan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; uygulama yapılan ve kontrol grubu arasında belirtilen ekspresyon ve protein seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Artan TRAIL ve Bortezomib düzeyleriyle birlikte hücre canlılık oranının azaldığı gözlenmiştir. Apoptoz assay deney sonuçları elde edilen veriler RNA ve protein ekspresyon sonuçlarını destekler niteliktedir.

Apoptoz normal doku homeostazının devam ettirilmesi; hücre çoğalması ve farklılaşması arasındaki dengenin sağlanmasında önemli bir role sahiptir. Apoptoz dokularda gelişim ve yaşlanma sırasında hücre popülasyonlarının kontrol edilmesinde homeostatik mekanizma olarak rol alır. Apoptoz aynı zamanda zararlı etkenler veya hastalık tarafından hasar görmüş hücrelerin elenmesinde veya immün sistem reaksiyonları sonucunda savunma mekanizması olarak kullanılabilir (14-17). Normal hücrelerin aksine

kanser hücreleri apoptozdan kaçarak hayatta kalma yeteneğine sahiptir. Kanser hücrelerinin apoptozu baskılayabilmesi için farklı mekanizmaları vardır. Örneğin tümör süpresör geni p53 mutasyonları DNA tamir proteinlerinin aktivasyonunu inhibe ederek apoptozun başlamasını engelleyebilmektedir. Bu sayede hücreler kontrolsüz olarak büyüyüp çoğalmasına olanak sağlamaktadır. Buna ek olarak kanser hücreleri proapoptotik faktörlerle (Bcl-2, Bcl-xl gibi) antiapoptotik faktörler (Bax, Bim ve PUMA gibi) arasındaki dengeyi bozabilmektedir. Proapoptotik faktörlerin miktarının artması Apoptozdan kaçınarak kanser gelişimini sağlamasının yanında, sisplatin, paclitaxel gibi antikanser ilaçlarına direnç sağlamaktadır. Aynı zamanda sigara içiminden kaynaklı olarak akciğer kanseri gelişim riski arasında ilişki olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (1, 6-8).

Kemoterapi gibi kanser tedavilerinin ana prensibi apoptotik yolağın uyarılmasıdır. Yapılan bazı çalışmalarda kanser hücrelerinde TRAIL'in apoptozu indükleyebildiği gösterilmiştir (16-18). Bununla birlikte kanser hücrelerinin %50'den fazlası TRAIL bağımlı apoptoz yolağına karşı dirençlidir. Yine de TRAIL direncinin ve istenmeyen apoptoz engelleyici etkilerinin apoptoz sinyalini yeniden oluşturan indükleyebilen veya güçlendiren terapilerle aşılabileceği gösterilmiştir. Bu etkiyi gösteren ajanlar arasında Bortezomib gibi proteozom inhibitörleri TRAIL yolağını çeşitli aşamalarda etkileyerek hücreleri TRAIL'e duyarlı hale getirmede etkili olduğu bulunmuştur (47-49).

TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörleri yüksek oranda sekans homolojisi gösterir ve birbirinden farklı fonksiyonları kesin olarak tanımlanmamıştır. TRAIL-R1'deki bazı mutasyonlar mesane kanseri, kronik lenfosittik lökemi ve manto hücreli lenfoma gibi çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir (15-19). TRAIL-R2'nin iki farklı splice varyantı vardır ve birbirinden ekstraselüler domaindeki 23 aminoasitlik farklılık vardır. Bu iki splice varyantının farklı roller üstlenip üstlenmediği bildirilmemiştir. Bu reseptörün p53-bağımlı yolakla upregüle edildiği gösterilmesine rağmen etoposide, proteozom inhibitörleri ve 5-florourasil gibi antikanser ilaçlarıyla p53-bağımsız bir yolakla da upregüle edilebileceği bildirilmiştir (20, 21, 34).

Ester ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TRAIL ve Bortezomibin farklı kombinasyonlarını farklı Glioblastoma hücre hatlarında çalışmışlardır. Bu çalışmada TRAIL, DR4, DR5 ve DcR1 ekspresyonları; Bcl-2, Bcl-XL protein seviyelerini araştırmıştır (79). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında uygulama sonrasında Glioblastoma hücre hatlarında ekspresyon ve protein seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Aynı zamanda TRAIL dirençli bu hücre hatlarında NF- $\kappa$ B aktivitesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen TRAIL, DR4, DR5, DcR1, Bcl-2 ve Bcl-XL sonuçları çalışma sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Bunun yanında yüksek NF- $\kappa$ B aktivitesinin farklı kanser hücre hattı sebebiyle ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Çalışmamız uygulama grupları karşılaştırıldığında; TRAIL için 5. örnek ile 6, 8 ve 9. örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Sırasıyla örnek 5 ile karşılaştırıldığında 3.97, 3.26 ve 3.05 kat azalma görülmüştür ( $p<0.05$ ) Aynı şekilde 6. örnek ile 5, 11 ve 12. örnekler arasında fark bulunmuştur. Sırasıyla örnek 6'ya göre ekspresyon seviyesinde 3.97, 1.80 ve 1.80 kat artma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Örnek 8 ile 5, 10, 11 ve 12. örnekler arasında da anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Sırasıyla örnek 8'e göre ekspresyon seviyelerinde 3.26, 1.48, 1.48 ve 1.58 kat artış görülmüştür ( $p<0.05$ ). Örnek 9 ile 5, 11 ve 12. örnekler arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Sırasıyla örnek 9'a göre ekspresyon seviyelerinde 3.05, 1.38 ve 1.48 kat artış görülmüştür ( $p<0.05$ ). Örnek 10 ile 8; örnek 11 ile 6, 8 ve 9 arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Sırasıyla ekspresyon seviyelerinde 1.48, 1.80, 1.48, 1.38 kat azalma görülmüştür ( $p<0.05$ ). Örnek 12 ile karşılaştırıldığında 6, 8 ve 9. örnekler arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Sırasıyla ekspresyon seviyelerinde 1.92, 1.58 ve 1.48 kat azalma görülmüştür ( $p<0.05$ ). Bu sonuçlar TRAIL için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyelerinin değişmediği; uygulama grupları aralarında karşılaştırıldığında ekspresyon seviyelerinin değiştiğini göstermektedir.

Tuzak reseptörler (Decoy receptor) olarak da adlandırılan TRAIL-R3 (DcR1) ve TRAIL-R4 (DcR2) reseptörleri diğer iki reseptörün aksine apoptotik sinyalin hücre içine iletilmesini gerçekleştirmezler. NSCLC hücre hatlarında yapılan çalışmalarda DcR1 reseptörünün aşırı ekspresyonu ile TRAIL-hassas hücrelerde apoptozun engellenebileceği

gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda DcR2 reseptörünün aşırı ekspresyonu ile DcR1 reseptörü gibi apoptozu engelleyici rol oynadığı gösterilmiştir (16-18). DcR2 reseptörünün Nükleer Faktör Kappa B (NF- $\kappa$ B) gibi antiapoptotik genleri uyararak TRAIL-aracılı apoptoza karşı hücreleri koruyabilmektedir.

Qing-Lin Fan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada A549 hücrelerini TRAIL'in farklı konsantrasyonları ile muamele ettiklerinde (1.98-1600 ng/ml) DR4 ve DR5 ekspresyon seviyelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir farklılık bulunmamıştır (80). Bu sonuçlar çalışmamız sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bunun yanında çalışmamız aksine DcR2 ekspresyonunun çok az şekilde aşağı regüle olduğu gösterilmiştir. Bu durumun uygulanan farklı TRAIL dozlarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Jens ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada A549'u içeren farklı NSCLC hücre hatlarında TRAIL ve Bortezomib'in etkilerini incelemişlerdir. A549 hücre yüzeylerinde DR4 ve DR5 ekspresyonlarının arttığını ve bu kombinasyonun hücreler için sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir (81). Çalışmamız sonuçlarında bu genlerin ekspresyonu için bir farklılık gözlenmemiştir. Yapılan bu çalışmada bu reseptörlerin transkript seviyesinin artmasına rağmen protein miktarlarında bir değişim olmadığı bulunmuştur. Bu sonuçlar çalışmamız sonuçları ile uyumludur. Yapılan bu çalışmada DcR1 ve DcR2 reseptörlerinin mRNA transkripsiyon seviyeleri yüksek bulunmasına rağmen hücre yüzeyinde bu reseptörlere rastlanmamıştır. Çalışmamız ekspresyon sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bunun yanında çalışmamız ileri analizlerinde DR4 genine uygulanan farklı Bortezomib konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. ( $p < 0.05$ ) Bu sonuçlar çalışmamız sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bunun yanında çalışmamız uygulama grupları karşılaştırıldığında; DR4 için 2. örnek ile 5 ve 6. örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Sırasıyla örnek 2 ile karşılaştırıldığında 3.54 ve 3.07 kat azalma görülmüştür ( $p < 0.05$ ). 4. örnek ile 5, 6 ve 7. örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Sırasıyla örnek 4 ile karşılaştırıldığında 6.67, 5.78 ve 4.06 kat azalma görülmüştür ( $p < 0.05$ ). 6. örnek ile 2 ve 4. örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Sırasıyla örnek 6 ile karşılaştırıldığında 3.07 ve 5.78 kat azalma görülmüştür ( $p < 0.05$ ). 7. örnek ile 4 arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Örnek 6 ile karşılaştırıldığında 4.06 kat artış görülmüştür ( $p<0.05$ ). 11. örnek ile 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Örnek 6 ile karşılaştırıldığında 3.05 kat artış görülmüştür ( $p<0.05$ ). DR5 için 9. örnek ile 4. örnek arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Örnek 9 ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyesinde 2.74 kat artış görülmüştür ( $p<0.05$ ). Bu sonuçlar DR4 ve DR5 için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyon seviyelerinin değişmediği; uygulama grupları aralarında karşılaştırıldığında ekspresyon seviyelerinin değiştiğini göstermektedir.

Osteoprotegerin (OPG) diğer reseptörlerin aksine hücre içinde çözünür durumda olan bir reseptördür. OPG kemik yeniden yapılanmasında osteoklast hücrelerinin gelişimi ve aktivasyonunda kritik rol oynar ve bu aktivite TRAIL bağımsız bir yolak sebebiyledir. OPG'nin yüksek afinite ile bağlanan ligandı TNF-benzeri sitokin olan TRANCE/RANKL'dir. TRAIL-OPG arasındaki etkileşim henüz net değildir. Pearse ve ark. yaptığı bir çalışmada, myeloma hücrelerinde OPG azalmasının hücre hayatta kalımını arttırdığı gösterilmiştir (90) Çalışmamızda kontrol grubu ve uygulama yapılan gruplar arasında OPG açısından bir fark bulunamamıştır. OPG için uygulama yapılan gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında 3. örnek ile 5 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Örnek 3 ile karşılaştırıldığında 3.38 kat artma görülmüştür ( $p<0.05$ ). 5. örnek ile 2 ve 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Sırasıyla örnek 3 ile karşılaştırıldığında 3.38 ve 5.76 kat artma görülmüştür ( $p<0.05$ ). Bunun yanında 6. örnek ile 3, 7 ile 5. örnek arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. sırasıyla 2.29 kat artma; 5.76 kat azalma görülmüştür ( $p<0.05$ ).

NF- $\kappa$ B hücre proliferasyonu ve apoptozun baskılanması gibi çeşitli biyolojik olaylarda düzenleyici olarak görev alan antiapoptotik transkripsiyon faktörüdür. Yapılan çalışmalarda TRAIL ve Bortezomib uygulamasının NF- $\kappa$ B ekspresyonunu baskılayabileceği gösterilmiştir. Sanaz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (82) TRAIL ve Bortezomib'in farklı konsantrasyonlarında (0.001  $\mu$ M – 1  $\mu$ M arasında) uygulanması sonucu NF- $\kappa$ B ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Çalışmamızda bu genin ekspresyonu için kontrol ve uygulama grupları arasında fark bulunamamıştır. Bu durumun uygulanan



Bortezomib konsantrasyonlarından ve uygulama süresinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda yapılan ileri analizlerde 10 ng TRAIL ile uygulanan Bortezomib konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Bu sonuçlar yapılan bu Sanaz ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma ile uyumludur.

Yapılan bir çalışmada glioblastoma hücre hatlarında yüksek NF- $\kappa$ B aktivitesinin, bortezomibin TRAIL aracılı apoptoza olan duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (51). Bu çalışmada Bortezomib uygulaması ile NF- $\kappa$ B ekspresyonun azaldığı ve hücrelerin TRAIL bağımlı apoptoz yolağına karşı duyarlı hale geldiği gösterilmiştir. Çalışmamız sonuçları bu çalışma sonuçlarının aksini göstermektedir. Çalışmamızda NF- $\kappa$ B mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri TRAIL ve Bortezomib uygulaması ile değişmemiş, bunun sonucu olarak A549 hücrelerinin TRAIL bağımlı apoptoz yolağına dirençli olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin daha kısa uygulama süresi ve farklı konsantrasyonlardan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Bortezomibin Bcl-2 ailesi üyelerinin ekspresyonunu etkileyip TRAIL aracılı apoptoza duyarlılığı artırarak mitokondriyel yolağı tetiklediği gösterilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda Bortezomibin Bcl-2 ve Bcl-XL ekspresyonu üzerinde etkili olmadığı gösterilmiştir. Bcl-2 ve Bcl-XL ekspresyonunun NSLC hücre hatlarında genel olarak Bortezomib uygulamasından etkilenmediği bildirilmiştir. Naoko ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (83) Bortezomib uygulamasının Bcl-2 ve Bcl-XL seviyesini değiştirmedeği bildirilmiştir. Bu sonuçlar çalışmamız sonuçlarıyla benzerdir. Bunun yanında yapılan ileri analizlerde 10 ng/ml TRAIL için 10 ve 100 nm Bortezomib konsantrasyon uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Ling ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Bortezomibin Bcl-2'nin aşağı regülasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (84).

Bax ve Bak proteinleri mitokondriyal yolakla apoptozun uyarılmasında önemli rol oynayan proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden olduğu gösterilmiştir. Bax geni mutasyona uğradığı zaman veya inaktif olduğu durumlarda, TRAIL sinyal yolağının erken safhalarında kaspaz-8 kesimi ve Bid işlenmesinin olmaması sebebiyle mitokondri zarının

polarizasyonunun gerçekleştirmediği, bunun sonucu olarak kaspaz-9 kesimi ve sitokrom-C salınımının bloke edildiği gösterilmiştir. Bax ve Bak gibi proapoptotik, Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-XL gibi antiapoptotik proteinleri içeren Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki denge ile hücre, iç yolak veya mitokondriyel apoptoz yolağından hangisine gidileceğine karar verir.

Li XW ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada A549 hücre hattında Bortezomib'in etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada Bortezomib ve SDG kombinasyonu kullanılmış, bunun sonucu Bcl-2 ve Bax ekspresyonunun istatistiksel olarak azaldığı gösterilmiştir (78). Aynı şekilde Naumann ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, nöroblastoma hücrelerinde Bortezomib uygulaması sonucu p53 ve Noxa ekspresyonunun arttığı; bunun sonucu olarak TRAIL bağımlı apoptoz yolağında Bax ve Bak aktivitesinin arttığı, hücrelerde TRAIL aracılı apoptoz görüldüğünü ortaya koymuşlardır (45). Çalışmamız sonuçlarında bu protein ekspresyon seviyelerinin değişmediği bulunmuştur. Bu farklılıkların kullanılan SDG ve farklı kanser hücre hatları sebebiyle olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak rTRAIL ve Bortezomib'in apoptotik etkisi hücre tipi, uygulama konsantrasyonu, uygulama süresi gibi farklı özelliklere göre değişmektedir. Yapılan çalışmalarda TRAIL ve Bortezomib uygulamasının hücreleri TRAIL bağımlı apoptoz yolağına duyarlı hale getirip getirmediği yönünde farklı bulgular vardır. Farklı hücre hatlarında ve kanser tiplerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar A549 hücre hattının; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirtilen konsantrasyonlar için uygulanan rTRAIL ve Bortezomib'in hücreleri TRAIL bağımlı apoptoz yolağına hassas hale getirmediği; mRNA ve protein ekspresyon seviyelerini değiştirmedeği görülmüştür. Bunun yanında ileri analizlerle Bortezomib uygulanan farklı gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olabileceği bulunmuştur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda kullanılan A549 hücre hatları kültüre edildikten sonra yukarıda söz edilen gruplara ayrılmıştır. Gruplar TRAIL ve Bortezomib'in farklı konsantrasyonlarında 18 saat süre ile muamele edilmiştir. Bütün deneyler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir;

1. TRAIL ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 23.48, standart sapması  $\pm 0.365$ ; 10 ng/ml TRAIL Ct değeri 23.16, standart sapması  $\pm 0.911$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri 22.92, standart sapması  $\pm 0.560$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 24.61, standart sapması  $\pm 1.309$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 22.50, standart sapması  $\pm 0.726$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 23.90, standart sapması  $\pm 0.097$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 22.82, standart sapması  $\pm 0.667$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 23.96, standart sapması  $\pm 0.270$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 23.32, standart sapması  $\pm 0.681$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ )
2. DR4 ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 22.49, standart sapması  $\pm 0.822$ ; 10 ng/ml TRAIL Ct değeri 22.26, standart sapması  $\pm 0.911$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri 22.06, standart sapması  $\pm 0.043$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 21.98, standart sapması  $\pm 0.845$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 24.04, standart sapması  $\pm 0.095$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 23.25, standart sapması  $\pm 0.289$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 23.61, standart sapması  $\pm 0.916$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 20.23, standart sapması  $\pm 1.201$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 19.79, standart sapması  $\pm 1.432$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ )
3. DR5 ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 24.07, standart sapması  $\pm 0.806$ ; 10 ng/ml TRAIL Ct değeri 24.27, standart sapması  $\pm 0.669$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri 22.92, standart sapması  $\pm 1.085$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 24.41, standart sapması  $\pm 0.780$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri

- 24.27, standart sapması  $\pm 0.393$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri  
24.70, standart sapması  $\pm 1.091$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri  
24.94, standart sapması  $\pm 0.232$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri  
21.93, standart sapması  $\pm 0.881$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri  
24.39, standart sapması  $\pm 0.846$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile  
karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ )
4. DcR1 ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 22.77, standart sapması  $\pm 0.221$ ; 10  
ng/ml TRAIL Ct değeri 23.13, standart sapması  $\pm 0.100$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri  
20.40, standart sapması  $\pm 0.564$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri  
23.21, standart sapması  $\pm 0.228$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri  
22.12, standart sapması  $\pm 0.070$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri  
23.31, standart sapması  $\pm 0.622$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri  
23.48, standart sapması  $\pm 0.976$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri  
22.64, standart sapması  $\pm 0.235$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri  
22.92, standart sapması  $\pm 1.715$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile  
karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ )
5. DcR2 ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 26.01, standart sapması  $\pm 0.105$ ; 10  
ng/ml TRAIL Ct değeri 22.27, standart sapması  $\pm 1.409$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri  
23.85, standart sapması  $\pm 0.300$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri  
24.23, standart sapması  $\pm 0.636$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri  
26.82, standart sapması  $\pm 0.237$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri  
25.71, standart sapması  $\pm 0.127$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri  
25.51, standart sapması  $\pm 0.569$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri  
25.78, standart sapması  $\pm 0.109$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri  
22.26, standart sapması  $\pm 1.422$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile  
karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ )
6. OPG ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 24.74, standart sapması  $\pm 0.604$ ; 10  
ng/ml TRAIL Ct değeri 26.23, standart sapması  $\pm 1.387$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri  
23.72, standart sapması  $\pm 0.216$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri  
24.63, standart sapması  $\pm 0.450$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri

- 26.03, standart sapması  $\pm 1.768$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 24.89, standart sapması  $\pm 0.096$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 23.79, standart sapması  $\pm 0.968$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 24.19, standart sapması  $\pm 1.149$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 24.83, standart sapması  $\pm 1.564$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ )
7. NF- $\kappa$ B ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 24.73, standart sapması  $\pm 0.444$ ; 10 ng/ml TRAIL Ct değeri 21.90, standart sapması  $\pm 0.705$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri 22.86, standart sapması  $\pm 1.767$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 26.26, standart sapması  $\pm 0.615$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 24.95, standart sapması  $\pm 1.337$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 25.17, standart sapması  $\pm 0.386$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 25.81, standart sapması  $\pm 0.845$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 23.83, standart sapması  $\pm 1.368$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 25.46, standart sapması  $\pm 1.241$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ )
8. Bcl-2 ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 25.20, standart sapması  $\pm 0.219$ ; 10 ng/ml TRAIL Ct değeri 24.91, standart sapması  $\pm 0.435$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri 24.42, standart sapması  $\pm 0.725$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 25.71, standart sapması  $\pm 0.081$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 24.56, standart sapması  $\pm 0.389$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 23.74, standart sapması  $\pm 1.873$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 26.01, standart sapması  $\pm 0.814$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 25.81, standart sapması  $\pm 0.461$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 24.09, standart sapması  $\pm 0.079$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ )
9. Bax ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 24.47, standart sapması  $\pm 0.681$ ; 10 ng/ml TRAIL Ct değeri 24.01, standart sapması  $\pm 0.165$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri 23.86, standart sapması  $\pm 0.767$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 22.57, standart sapması  $\pm 0.436$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 26.88,

standart sapması  $\pm 1.374$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 25.04, standart sapması  $\pm 0.584$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 25.44, standart sapması  $\pm 0.615$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 24.80, standart sapması  $\pm 0.244$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 24.65, standart sapması  $\pm 1.799$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ )

10. Bcl-XL ekspresyon seviyesi kontrol Ct değeri 24.17, standart sapması  $\pm 0.425$ ; 10 ng/ml TRAIL Ct değeri 23.71, standart sapması  $\pm 0.112$ ; 30 ng/ml TRAIL Ct değeri 23.13, standart sapması  $\pm 0.901$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 21.41, standart sapması  $\pm 0.416$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 24.61, standart sapması  $\pm 0.476$ ; 10 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 24.25, standart sapması  $\pm 0.378$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 10 nm Bortezomib Ct değeri 23.33, standart sapması  $\pm 1.133$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 50 nm Bortezomib Ct değeri 23.56, standart sapması  $\pm 0.270$ ; 30 ng/ml TRAIL ve 100 nm Bortezomib Ct değeri 23.76, standart sapması  $\pm 1.468$  olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p < 0,05$ ).
11. Yapılan bu ileri analizlerde DR4 geni için 10 ng/ml TRAIL + 10 nm bortezomib ile 10 ng/ml TRAIL + 50 nm bortezomib ve 10 ng/ml TRAIL + 100 nm bortezomib arasında; 30 ng/ml TRAIL + 10 nm Bortezomib ile 30 ng/ml TRAIL + 50 nm bortezomib ve 30 ng/ml TRAIL + 100 nm bortezomib arasında; 10 ng/ml TRAIL + 50 nm bortezomib ile 30 ng/ml TRAIL + 50 nm bortezomib ve 30 ng/ml TRAIL + 100 nm bortezomib arasında; 10 ng/ml TRAIL + 100 nm bortezomib ile 30 ng/ml TRAIL + 100 nm bortezomib ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).
12. NFkB geni için; 10 ng/ml TRAIL ile diğer örneklerin (4, 5, 6, 7, 8, 9) ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bax geni için kontrol grubu ile 10 ng/ml TRAIL + 10 nm bortezomib; 10 ng/ml TRAIL ile 10 ng/ml TRAIL + 50 nm bortezomib; 10 ng/ml TRAIL + 10 nm bortezomib ile diğer örnekler (5, 6, 7, 8, 9) ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bcl-xl geni için; 10 ng/ml TRAIL

+ 10 nm bortezomib ile 10 ng/ml TRAIL + 100 nm bortezomib ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

13. Belirtilen genler için yapılan Western Blot deneylerinde elde edilen protein seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p<0,05$ ) Bu sonuçlar real time pcr sonuçlarını destekler niteliktedir.

14. Yapılan hücre canlılık testleri sonucunda artan rTRAIL ve Bortezomib seviyelerinin hücre canlılığını azalttığı görülmüştür.

15. Flow sitometri sonuçları rTRAIL ve Bortezomib uygulamasının hücreleri apoptoza yönlendirmediği görülmüştür.

Çalışmamız sonucunda A549 hücre hattının; belirtilen konsantrasyonlar için uygulanan rTRAIL ve Bortezomib'in hücreleri TRAIL bağımlı apoptoz yolağına hassas hale getirmediği; mRNA ve protein ekspresyon seviyelerini değiştirmedeği görülmüştür. Akciğer kanserinde TRAIL bağımlı apoptoz yolağına daha iyi anlaşılabilmesi için daha farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde uygulama yapılması gerekmektedir. Aynı şekilde antitümörel aktivite gösterdeği bildirilen diğer farklı kimyasallar ve Bortezomib kombinasyonları ile bu yolağı kanserdeki rolünün daha iyi anlaşılabildeği düşünölmektedir. Bunun yanında farklı kanser hatlarında, TRAIL yolağındaki farklı hedeflerin çalışılması gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Herbst R.S, Heymach J.V, Lippman S.M.** Lung cancer. *N Engl J Med.* **2008**; 359(13):1367–1380.
2. **Mark A. S, Coleman O, David G. ve ark.** Clinicopathologic Features of Advanced Squamous NSCLC *Journal of Thoracic Oncology*, **2016**. Vol. 11 No. 9: 1411-1422.
3. **Chinnappan RS, Kandasamy K.** Molecular understanding of lung cancers-A review, *Asian Pac J Trop Biomed* **2014**; 4(Suppl 1): S35-S41.
4. **Guangbo L, Fen P, Fengqing Y ve ark.** Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 367.
5. **Milind M. PT, Jeroen N. H, Frank A.E. K.** Targeting apoptosis pathways in lung cancer. *Cancer Letters* 332 (**2013**) 359–368
6. **Charles S. DC, Lynn T. T, MD, ve Richard A. M.** Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.* **2011** December ; 32(4)
7. **Julian R. M, Ping Yang ve ark.** Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship *Mayo Clin Proc.* **2008** May ; 83(5): 584–594
8. **Siegel R, Ward E, Brawley O, ve ark.** Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* **2011**; 61(4):212–236.
9. **Jemal A., Bray F., Center M.M, ve ark.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(2):69–90.
10. **York E.M.** Pathogenesis of Lung Cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2005** Sep; 33(3): 216–223.
11. **Roy S. H., Daniel M ve Chris B.** The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* volume 553, pages 446–454 (**25 January 2018**)
12. **Rongrong W , Frank T. D, Wanqing L.** Genetic Polymorphism, Telomere Biology and Non-Small Lung Cancer Risk. *Journal of Genetics and Genomics* 42 (**2015**)549-561.
13. **Cohen JJ.** Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol.* **1991**;50:55–85.



14. **Hotchkiss R.S., Strasser A., McDunn J.E., Swanson P.E.** Cell death. *N Engl J. Med.* **2009**;361, 1570–1583.
15. **Fulda S., Gorman A.M., Hori O., Samali A.** Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* 2010;214074.
16. **Jens V., Tatiana P. R., Mohamed A.I. ve ark.** TRAIL therapy in non–small cell lung cancer cells: sensitization to death receptor–mediated apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib. *Mol Cancer Ther.* **2007**;6(7).
17. **Degterev A., Yuan J.**, Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**;378–390.
18. **Ribal S Darwish.** Regulatory mechanisms of apoptosis in regularly dividing cells. *Cell Health and Cytoskeleton.* **2010**; 2 59–68.
19. **Andrew Thorburn.** Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Pathway Signaling. *J Thorac Oncol.* **2007**; 2: 461–465.
20. **Christina F, Christoph H. E. ve ark.** TRAIL signalling: Decisions between life and death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* **2007**; 39:1462–1475.
21. **Ricky W. J., Ailsa J. ve ark.** The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nature Cancer Review.* **2008**; Vol 8.
22. **Yaqin Z, Baolin Z.** TRAIL Resistance of Breast Cancer Cells Is Associated with Constitutive Endocytosis of Death Receptors 4 and 5. *Mol Cancer Res.* **2008**; 6(12):1861 – 71.
23. **Orlowski RZ, Kuhn DJ.** Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clinical Cancer Research.* **2008**;14:1649–57.
24. **Adams J.** The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews.* **2003**;29(Suppl. 1):3–9.
25. **Mathieu C. M., Guillaume V. ve ark.** Increased p53 Level, Bax/Bcl-xL Ratio, and TRAIL Receptor Expression in Human Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* **2008**; 178:240–247.
26. **A. Almasan, A. Ashkenazi.** Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* **2003**; 337–348.

27. Elisabeth G.E. de Vries, Jourik A ve ark. Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Pathway and Its Therapeutic Implications. *Clin Cancer Res.* **2006**;12(8).
28. Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **1998**. 281, 1305–8.
29. Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., ve ark. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science.* **1994**263, 1759–62.
30. Ekert P.G., ve Vaux, D.L. The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol.* **2005**;17, 626– 30.
31. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M. ve ark. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **2006**;13, 1423–33.
32. Bortner, C.D., Oldenburg N. B. ve Cidlowski, J. A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* **1995**;5, 21–6.
33. Ashkenazi, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Rev. Cancer.* **2002**; 2, 420–430.
34. Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. ve ark. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**;39, 1462–1475.
35. Schneider, P. Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Biol. Chem.* **2003**;278, 5444–5454.
36. Wu, G. S., Burns, T. F., Zhan, Y., ve ark. Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res.* **1999**;Jun 15;59(12):2770-5.
37. Bockbrader, K. M., Tan, M. ve Sun, Y. A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene.* **2005**;24, 7381–7388.
38. F.H. Igney, P.H. Krammer. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer.* **2002**;2,277–288.
39. Safa, A. R., Day, T. W. ve Wu, C. H. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets.* **2008**;8, 37–46.

40. **Keogh S. A., Walczak H., Martin S. J. ve ark.** Failure of Bcl-2 to block cytochrome c redistribution during TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **2000**;471, 93–98.
41. **Walczak H., Bouchon A., Stahl H. ve Krammer P. H.** Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapyresistant tumor cells. *Cancer Res.* **2000**;60, 3051–3057.
42. **MacFarlane, M.** TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol. Lett.* **2003**;139(2–3), 89–97.
43. **Mercurio F., Zhu H., Murray B.W. ve ark.** IKK-1 and IKK-2: Cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **1997**;278(5339), 860–866.
44. **Zandi, E., Rothwarf D. M., Delhase M., ve ark.** The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell.* **1997**;91(2), 243–252.
45. **Degli-Esposti M. A., Dougall W.C., Smolak, P. J. ve ark.** The novel receptor TRAILR4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* **1997**;(6), 813–820.
46. **Lin Y., Devin A., Rodriguez Y. ve Liu Z. G.** Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev.* **1999**;13(19), 2514–2526.
47. **Morissette, Mathieu & Parent, Julie & Milot, Julie.** The emphysematous lung is abnormally sensitive to TRAIL-mediated apoptosis. *Respiratory research.* (2011). 12. 105. 10.1186/1465-9921-12-105.
48. **Taromi S, Lewens F, Arsenic R, et al.** Proteasome inhibitor bortezomib enhances the effect of standard chemotherapy in small cell lung cancer. *Oncotarget.* **2017**;8(57):97061-97078. doi:10.18632/oncotarget.21221.
49. **Raab M.S., Podar K., Breitkreutz I. ve ark.** Multiple myeloma. *Lancet* **2009**;374:324–39.
50. **Naumann I., Kappler R., von Schweinitz D. ve ark.** Bortezomib primes neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by linking the death receptor to the mitochondrial pathway. *Clinical Cancer Research.* **2011**;17:3204–18.

51. **Brooks A.D., Jacobsen K.M., Li W. ve ark.** Bortezomib sensitizes human renal cell carcinomas to TRAIL apoptosis through increased activation of caspase-8 in the death-inducing signaling complex. *Molecular Cancer Research*. **2010**;8:729–38.
52. **Chen K.F., Yeh P.Y., Hsu C. ve ark.** Bortezomib overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in hepatocellular carcinoma cells in part through the inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Journal of Biological Chemistry*. **2009**;284:11121–33.
53. **Liu J., Qu X.J., Xu L. ve ark.** Bortezomib synergizes TRAIL-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Digestive Diseases and Sciences*. **2010**;55:3361-8.
54. **Liu X., Yue P., Chen S. ve ark.** The proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) up-regulates DR5 expression leading to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis despite up-regulation of c-FLIP and survivin expression in human NSCLC cells. *Cancer Research*. **2007**;67:4981-8.
55. **Brunelle J.K., Letai A.** Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of Cell Science*. **2009**;122:437–41.
56. **Voortman J., Resende T.P., Abou El Hassan M.A. ve ark.** TRAIL therapy in non-small cell lung cancer cells: sensitization to death receptor-mediated apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib. *Molecular Cancer Therapeutics*. **2007**;6:2103–12.
57. **Zhu H., Guo W., Zhang L. ve ark.** Proteasome inhibitors-mediated TRAIL resensitization and Bik accumulation. *Cancer Biology and Therapy*. **2005**;4:781–6.
58. **Tait S.W., de Vries E., Maas C. ve ark.** Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *Journal of Cell Biology*. **2007**;179:1453–66.
59. **Georgakis G.V., Li Y., Humphreys R. ve ark.** Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *British Journal of Haematology*. **2005**;130:501–10.

- 60. Kabore A.F., Sun J., Hu X. ve ark.** The TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Apoptosis*. **2006**;11:1175–93.
- 61. Unterkircher T., Cristofanon S., Vellanki S.H. ve ark.** Bortezomib primes glioblastoma, including glioblastoma stem cells, for TRAIL by increasing tBid stability and mitochondrial apoptosis. *Clinical Cancer Research*. **2011**;17:4019–30.
- 62. Lee S., Yagita H., Sayers T.J., Celis E.** Optimized combination therapy using bortezomib, TRAIL and TLR agonists in established breast tumors. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **2010**;59:1073–81.
- 63. Shanker A., Brooks A.D., Tristan C.A. ve ark.** Treating metastatic solid tumors with bortezomib and a tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonist antibody. *Journal of the National Cancer Institute*. **2008**;100:649–62.
- 64. Christian P.A., Thorpe J.A., Schwarze S.R.** Velcade sensitizes prostate cancer cells to TRAIL induced apoptosis and suppresses tumor growth in vivo. *Cancer Biology and Therapy*. **2009**;8:73–80.
- 65. Chen K.F., Yu H.C., Liu C.Y. ve ark.** Bortezomib sensitizes HCC cells to CS-1008, an antihuman death receptor 5 antibody, through the inhibition of CIP2A. *Molecular Cancer Therapeutics*. **2011**;10:892–901.
- 66. Vucic D., Dixit V.M., Wertz I.E.** Ubiquitylation in apoptosis: a posttranslational modification at the edge of life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **2011**;12:439–52.
- 67. Thermo Fisher, Cell Culture Basics Handbook, 2015.** Erişim: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/promotions/global/images/aai-2015/aai-pdfs/GibcoCellCultureBasicsHandbook.pdf>. Erişim tarihi: **01.09.2017**
- 68. Xiaoli F., Jie Y., Yibiao W. ve ark.** The proteasome inhibitor bortezomib disrupts tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression and natural killer (NK) cell killing of TRAIL receptor-positive multiple myeloma cells. *Molecular Immunology Volume*. **August 2010**;47.14, 2388-2396.
- 69. Clemons N. J. ve Anderson R. L.** TRAIL-induced apoptosis is enhanced by heat shock protein 70 expression. *Cell Stress Chaperones*. **2006 Dec**; 11(4): 343–355.

70. Sidan L., Tianshou L., Yongbing C. Biology of Blood and Marrow. *Transplantation*. August 2015;21, Issue 8, 1384-1391.
71. Teruko H., Isamu Y. ve Hiroyuki I. Angiogenesis-, Metastasis- and Signaling Pathway-related Factor Dynamics in Human Colon Cancer Cells Following Interaction with Monocytes. *Anticancer Research*. 2013;33: 2895-2900.
72. Ifere G.O., Equan A., Gordon K., Nagappan P. Ve ark. Cholesterol and phytosterols differentially regulate the expression of caveolin 1 and a downstream prostate cell growth-suppressor gene. *Cancer epidemiology*. 2010;34(4):461-471.
73. Wang T., Qian D., Hu M. ve ark. Human cytomegalovirus inhibits apoptosis by regulating the activating transcription factor 5 signaling pathway in human malignant glioma cells. *Oncology Letters*. 2014;8(3):1051-1057.
74. Laukens D., Georges M., Libioule C. ve ark. Evidence for Significant Overlap between Common Risk Variants for Crohn's Disease and Ankylosing Spondylitis. *PLoS ONE*. 2010;5(11):e13795.
75. Mahmood T., Yang P.C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012;4(9):429-434.
76. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*. 2001.21:3B:A.3B.1–A.3B.2.
77. Jens V., Tatiana P. R. ve ark. TRAIL therapy in non-small cell lung cancer cells: sensitization to death receptor-mediated apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(7).
78. Harald E., Simone F. ve ark. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-KB. *Oncogene*. 2003; 22:3842–3852.
79. YI. H., Ling L., ve ark. PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2002. vol. 1, no. 10, pp. 841–849.
80. Jun-Jie C., Chia-Wei C. ve ark. Proteasome Inhibitors Enhance TRAIL-Induced Apoptosis through the Intronic Regulation of DR5: Involvement of NF-κB and Reactive Oxygen Species-Mediated p53 Activation. *J Immunol June*. 2008;180 (12).

- 81. Mauricio E., Michel V. ve ark.** The Role of Proteasome Inhibition in Nonsmall Cell Lung Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **Volume 2011**,
- 82. Jens V., Agnieszka C. ve ark.** The proteasomal and apoptotic phenotype determine bortezomib sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Molecular Cancer*. **2007**, 6:73
- 83. Li X.W. ve Yang J.R.** Effects of secoisolariciresinol diglucoside combined with bortezomib on induction of apoptosis in lung cancer cell line A549. *Zhong Yao Ca*. **2012** Feb;35(2):248-53.
- 84. Esther P. J., Daniel R. P. ve Ian F. P.** Bortezomib Sensitizes Malignant Human Glioma Cells to TRAIL, Mediated by Inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Mol Cancer Ther*. **2011**; January; 10(1): 198–208.
- 85. Qing-Lin F., Wen-Yi Z., Li-Hua S. ve Wei W.** Synergistic antitumor activity of TRAIL combined with chemotherapeutic agents in A549 cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **February 2005**; Volume 55, Issue 2, pp 189–196.
- 86. Jens V., Tatiana P. R., Mohamed A.I. Abou El Hassan, ve ark.** TRAIL therapy in non–small cell lung cancer cells: sensitization to death receptor–mediated apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib. *Mol Cancer Ther*. **2007**;6(7). July 2007.
- 87. Sanaz K., Steffan T. N., Thiruvengadam A. ve ark.** Nuclear factor- $\kappa$ B maintains TRAIL resistance in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther*. **2006**;5(9):2251–60
- 88. Seki N.o, Toh U., Sayers T.J, ve ark.** Bortezomib sensitizes human esophageal squamous cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis via activation of both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways. *Molecular cancer therapeutics*. **2010**;9(6):1842-1851.
- 89. Ling X., Calinski D., Chanan-Khan A.A. ve ark.** Cancer cell sensitivity to bortezomib is associated with survivin expression and p53 status but not cancer cell types. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. **2010**;29(1):8.

- 90. Pearse, R.N.**, Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A, **2001**. 98(20): p. 11581-6.





## **EKLER**

### **ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI**

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarını elde etmek için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir.

Konsantrasyon dönüşümlerinde basitçe şu formülden yararlanılabilir.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

**M1**= Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

**V1**= Stoktan alınması gereken miktar (V)

**M2**= Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

**V2**= Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (V)

#### **EK-1. Western Blot Solüsyonları**

##### **1.1 SDS solüsyonu (%10)**

10 gr. sodium dodesil sülfat (SDS) tartılarak bir miktar distile suda çözülür. Daha sonra üzeri 100 ml'ye tamamlanarak %10'luk SDS solüsyonu elde edilmiş olur.

##### **1.2 Western Blot Running Buffer (10x)**

30.3 gr. Tris base, 114.2 gr. glisin tartılarak bir miktar distile suda çözülür. Daha sonra 1 litreye tamamlanarak 10x stok solüsyonu elde edilir. Bu stok solüsyonundan 100 ml alınır. Üzerine %10 SDS solüsyonundan 10 ml eklenir. Daha sonra distile su ile 1 litreye tamamlanarak 1x running buffer (%0.1 SDS) elde edilmiş olur.

##### **1.3 Western Blot Transfer buffer (10x)**

30.3 gr. Tris base, 114.2 gr. Glisin tartılarak bir miktar distile suda çözülür. Daha sonra 1 litreye tamamlanarak 10x stok solüsyonu elde edilir. Bu stok solüsyonundan 100 ml alınır. Üzerine 100 ml metanol eklenir ve distile su ile 1 litreye tamamlanarak 1x transfer tamponu (%10 metanol) elde edilmiş olur.

#### **1.4 %30 Akrilamid solüsyonu**

300 gr. akrilamid, 8 gr. bisakrilamid tartılarak bir miktar distile suda çözülür. Üzeri 1 lt'ye tamamlanarak %30 akrilamid stok solüsyonu elde edilir.

#### **1.5 Tris-HCl (pH 6.8)**

15.76 gr. Tris-HCl bir miktar distile suda çözülür. Daha sonra pH 6.8'e ayarlanır. Üzeri 100 ml'ye tamamlanarak Tris-HCl solüsyonu elde edilir.

#### **1.5 Tris-HCl (pH 8.8)**

15.76 gr. Tris-HCl bir miktar distile suda çözülür. Daha sonra pH 8.8'e ayarlanır. Üzeri 100 ml'ye tamamlanarak Tris-HCl solüsyonu elde edilir.

#### **1.6 Amonyum persülfat (%10)**

0.1 gr amonyum persülfat tartılarak 1 ml distile suda çözülür. Her çalışmada taze olarak hazırlanır.

#### **1.7 2x Laemmlı Buffer**

%10 SDS 4 ml, Gliserol 2 ml, 1 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.2 ml, distile su 2.8 ml olarak karıştırılır. 2 gr. bromphenol blue tartılarak bu karışıma eklenir ve çözdürülür. Daha sonra 100 ml'ye tamamlanarak 2x Laemmlı Buffer elde edilir.

#### **1.8 TBS solüsyonu (10x)**

24 g Tris base, 88 g NaCl bir miktar distile suda çözülür. pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra üzeri 1 litreye tamamlanarak 10x TBS solüsyonu elde edilir.

#### **1.8 TBS-T solüsyonu (1x)**

10x TBS solüsyonundan 100 ml alınır ve üzerine Tween-20'den 1 ml (%0.1) eklenir. Daha sonra 1 litreye tamamlanarak TBS-T (1x) solüsyonu elde edilir.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1987 yılında Ankara'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladı. 2004 yılında Ankara Keçiören İncirli Lisesi'nden mezun oldu ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programını tamamladı ve aynı yıl Doktora programına başladı.