

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

**DR5'İN HÜCRE YÜZEYİ İFADESİNDE HUR VE
VPS39'UN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Ufuk MERT

DOKTORA TEZİ

2017-ANTALYA

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

**DR5'İN HÜCRE YÜZEYİ İFADESİNDE HUR VE
VPS39'UN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Ufuk MERT

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2015-942 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 23/05/2017

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahter Dilşad şANLIOğLU
Akdeniz ¼niversitesi

.....

¼ye : Prof. Dr. ¼zg¼l ALPER
Akdeniz ¼niversitesi

.....

¼ye : Prof. Dr. G¼khan AKKOYUNLU
Akdeniz ¼niversitesi

.....

¼ye : Doç.Dr. Akın YILMAZ
Hitit ¼niversitesi

.....

¼ye : Yrd. Doç.Dr. Çiędem Aydın ACAR
Mehmet Akif Ersoy ¼niversitesi

.....

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Narin DERİN

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

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

Ufuk MERT

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

İmza

TEŐEKKÜR

Bana inanan, sabır gösteren, bilimsel açıdan ve her konuda yolumu aydınlatan, dünyanın en iyi danışmanı Sayın Prof. Dr. Ahter D. ŞANLIOĞLU'na,

Projem kapsamında SBAUM'un bütün olanaklarından yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŐ'e,

Ve Anabilim Dalımızın tüm değerli öğretim üyelerine,

Üzerimde ve tezimde emeği çok büyük olan, varlığının benim için anlamını ve değerini kelimelere dökmenin bir yolu maalesef bulunmayan sevgili dostum Dr. Fatma Zehra HAPİL'e,

Çalışma arkadaşlarım başta Uzm. Dr. Mustafa Gökhan ERTOSUN, Ece ÇOPUROĐLU, Özlem YILMAZ, Erman GÜMÜŐLÜ ve Gökçe ERDOĐAN olmak üzere Anabilim Dalımızın tüm araştırma görevlilerine,

Ve tabi ki canım annem, babam ve kardeşime,

Teőekkürü borç bilirim.

ÖZET

Amaç: TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) ligandı, ölüm reseptörlerine bağlandığında hücreyi apoptoza yönlendirebilen TNF ailesi üyesi bir sitokindir. Apoptotik sinyal iletme yeteneğine sahip iki adet hücre yüzeyi reseptörü bulunmaktadır. TRAIL sinyal yolağına dair birçok nokta aydınlatılmış olmasına rağmen, reseptörlerin regülasyonu hala tam olarak anlaşılammıştır. Kanser hücrelerini TRAIL aracılı apoptoza yönlendirebilmenin ilk koşulu, DR4 ve DR5 reseptörlerinin hücre yüzeyinde ifade edilebilmesidir. DR4'ün plazma membranına taşınma mekanizması kısmen anlaşılmiş olsa da, DR5'in hücre yüzeyine nasıl çıktığı bilinmemektedir.

Yöntem: Tez çalışmamızda, LNCaP ve HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 proteinlerinin ifadeleri, sırasıyla anti-HuR ve anti-Vps39 siRNA'ları ile baskılandıktan sonra, bu hücrelerden sitoplazmik, nüklear ve plazma membran fraksiyonları elde edildi. Bu fraksiyonlarda Western Blot ve ELISA yöntemleriyle DR5 reseptör miktar tayini yapılarak HuR ve Vps39 baskılanmasının DR5 seviyeleri üzerindeki etkileri değerlendirildi. siRNA ile transfeksiyon sonrası TRAIL-aracılı apoptoz ve nekroptoz oranları, ELISA yöntemi aracılığıyla belirlendi.

Bulgular: HuR proteininin baskılanması, Western Blot ve ELISA ($p=0,036$) verilerine göre LNCaP hücre hattında DR5'in hücre yüzeyindeki ifadesini düşürmüştür. Benzer bir sonuç HeLa hücre hattı için de geçerlidir. HeLa hücrelerinde aynı zamanda HuR baskılanması sonucu DR5 yüzey ifadesindeki azalmaya paralel olarak TRAIL aracılı apoptoz engellenmiştir. Vps39'a ilişkin sonuçlarımıza göre ise, bu proteinin baskılandığı durumda her iki hücre hattında da nüklear DR5 miktarının değiştiği, ancak Vps39'un DR5'in hücre yüzey ekspresyonunda direk etkili olmayabileceği görülmüştür.

Sonuç: Sonuç olarak, HuR proteini DR5'in yüzey ifadesini etkilemektedir. Bu mekanizmanın doğrulanabilmesi ve daha ayrıntılı biçimde aydınlatılabilmesi için, farklı hücrelerde de gerçekleştirilecek ileri çalışmalar önemli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: TRAIL, DR5, yüzey ifadesi, HuR, kanser

ABSTRACT

Objective: TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), which is a member of the TNF superfamily of cytokines, can induce apoptosis when bound to its death receptors. It has two apoptosis-initiating receptors. Although much about TRAIL signaling pathway has been elucidated, details regarding to the regulation of its receptors still remain highly elusive. The first requirement for the TRAIL-induced apoptosis to occur in cancer cells is that these cells express the TRAIL death receptors DR4 and/or DR5 on their surface. Unlike DR4, cell surface expression mechanism of which is relatively well understood, translocation means of the DR5 receptor to the plasma membrane is still unknown.

Methods: In the context of this thesis study, following suppression of the HuR and Vps39 expressions via the anti-HuR and anti-Vps39 siRNAs, respectively, in LNCaP and HeLa cell lines; cytoplasmic, nuclear, and membrane fractions were isolated. Effects of HuR and Vps39 knockdown on DR5 expression in different subcellular fractions were evaluated by Western Blot and ELISA assays. Moreover, TRAIL-induced apoptosis and necroptosis levels following siRNA transfections in the above-mentioned transfected cells were determined via the ELISA method.

Results: HuR knockdown in LNCaP cells were found to decrease DR5 surface expression as shown by both Western Blot and ELISA ($p=0,036$). Similar results were obtained from experiments performed on the HeLa cell line. HeLa cells also displayed reduced apoptosis levels in parallel with the HuR knockdown-related decrease in surface expression of DR5. Our results related to the Vps39 protein revealed that, nuclear DR5 expression was altered in both cell lines following its suppression, however that Vps39 may not be directly involved in the cell surface expression of DR5.

Conclusion: As a consequence, HuR protein influences the plasma membrane expression of DR5. In order for these results to be confirmed, and revealed in more detail, further studies to be held also in different cell types will be significant.

Key words: TRAIL, DR5, surface expression, HuR, cancer

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLULAR DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)	3
2.2 TRAIL Sinyalleşmesi	4
2.3 TRAIL-Aracılı Apoptoza Direnç	6
2.4 Hücre İçi DR5 Lokalizasyonu ve Fizyolojik Önemi	7
2.5 HuR ve VPS39	9
3. GEREÇ ve YÖNTEM	15
3.1 Hücre Kültürü	15
3.2. siRNA Aracılığıyla Gen İfadelerinin Baskılanması	16
3.3. Hücre Fraksiyonasyonu	17
3.4. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	18
3.5. SDS-PAGE İçin Örneklerin Hazırlanması	18
3.6. SDS-PAGE Jelin Hazırlanması ve Elektroforez	19
3.7. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi	20
3.8. Western Blot	21
3.9. Strip-off İşlemi	21
3.10. DR5 ELISA	22
3.11. Apoptoz ve Nekrotoz Ölçümü	22
3.12. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1 HuR ve Vps39 siRNA'larının en etkin dozları belirlendi	24
4.2 Hücre Fraksiyon Kiti ile ayrılan membran fraksiyonunda HuR ve Vps39 proteinleri saptanmadı	24
4.3 LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 siRNA'ları, hedef proteinlerini sitoplazmada farklı oranlarda baskıladı	25
4.4 HuR ve Vps39'un baskılanması, LNCaP hücrelerinde sitoplazmik, nükleer, ve membranda ifade edilen DR5 miktarları üzerinde farklı etki gösterdi.	27
	iii

4.5 LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39'un baskılanması, TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz oranlarında artışa yol açtı.	30
4.6 HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 siRNA'ları, hedef proteinlerini sitoplazmada farklı oranlarda baskıladı	32
4.7 HuR ve Vps39'un baskılanması, HeLa hücrelerinde sitoplazmik, nükleer, ve membranda ifade edilen DR5 miktarları üzerinde farklı etki gösterdi.	33
4.8 HeLa hücrelerinde Vps39'un baskılanması, TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz oranlarında artışla sonuçlandı.	38
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. TRAIL reseptörleri	4
Şekil 2.2. TRAIL aracılı apoptoz yolağı	5
Şekil 2.3. Hücre içi DR5 lokalizasyonu	9
Şekil 2.4. Hücre yüzeyinde HuR aracılı reseptör ifadesi	10
Şekil 2.5. DR4 ve DR5 transkriptleri	11
Şekil 2.6. Hücre içi DR5 lokalizasyonunda rol oynayan muhtemel faktörler	12
Şekil 4.1: Etkin siRNA dozunun belirlenmesi.	24
Şekil 4.2: Hücre fraksiyonasyon kitinin etkinliğinin test edilmesi.	25
Şekil 4.3: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 seviyeleri.	26
Şekil 4.4: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının sitoplazmik DR5 seviyelerine etkisi.	28
Şekil 4.5: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının nükleer DR5 seviyelerine etkisi.	28
Şekil 4.6: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının membran DR5 seviyelerine etkisi.	29
Şekil 4.7: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının sitoplazmik ve nükleer DR5 seviyelerine etkisinin ELISA ile belirlenmesi.	29
Şekil 4.8: LNCaP hücrelerinde membran DR5 seviyelerinin ELISA ile belirlenmesi.	30
Şekil 4.9: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoza etkisi.	31
Şekil 4.10: LNCaP hücrelerinde TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoza etkisi.	32
Şekil 4.11: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 seviyeleri.	33
Şekil 4.12: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının sitoplazmik DR5 seviyelerine etkisi.	34
Şekil 4.13: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının nükleer DR5 seviyelerine etkisi.	35

Şekil 4.14: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının membran DR5 seviyelerine etkisi.	35
Şekil 4.15: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının sitoplazmik ve nükleer DR5 seviyelerine etkisinin ELISA ile belirlenmesi.	37
Şekil 4.16: HeLa hücrelerinde membran DR5 seviyelerinin ELISA ile belirlenmesi.	37
Şekil 4.17: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz etkisi.	38
Şekil 4.18: HeLa hücrelerinde TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz.	39
Şekil 4.19: 293T hücrelerinde DR5 aşırı ekspresyonu.	40

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. DR4 ve DR5 aracılı ölümü inhibe eden veya artıran siRNA'lar	12
Tablo 3.1 Kullanılan hücre hatlarının TRAIL duyarlılıkları	15
Tablo 3.2 Kullanılan siRNA ve dizileri	16



SİMGELER ve KISALTMALAR

C-terminal	: Karboksi-terminal
CARD	: Caspase-recruiting domain
DcR	: Yalancı (decoy) reseptör
DD	: Ölüm bölgesi (death domain)
DED	: Ölüm Efektör Domaini (Death Effector Domain)
DISC	: Death-inducing signaling complex
DR	: Ölüm reseptörü
ELAVL1	: Embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila-like 1
ER	: Endoplazmik Retikulum
HuR	: Human Antigen R (HuR)
JNK	: c-Jun N-terminal Kinaz
MADD	: MAPK-aktive edici ölüm bölge protein (MAPK-Activating Death Domain protein)
MAPK	: Mitogen-Aktive Protein Kinaz
mTRAIL	: Membran bağlı TRAIL
N-terminal	: Amino-terminal
NEMO	: NF κ B esansiyel modölatör (IKK γ)
NK	: Negatif Kontrol
NLS	: Nüklear Lokalizasyon Sinyali
nM	: nano Molar
NSLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

OPG	: Osteoprotegerin
PK	: Pozitif Kontrol
PKC	: Protein Kinaz C
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
siRNA	: small interfering RNA
SRP	: Sinyal Tanıma Partikülü (Signal Recognition Particle)
sTRAIL	: Çözünebilir TRAIL
tBid	: Kırpılmış Bid
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TRAF	: TNF reseptör ilişkili faktör (TNF Receptor Associated Factor)
TRAIL	: TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
UTR	: Untranslated Region
Vps39	: Vacuolar protein sorting 39 homolog
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
β_2-AR	: Beta-2-adrenarjik Reseptör
μl	: mikrolitre

1. GİRİŞ

TNF ailesi üyesi olan TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), immün sistemin önemli bileşenlerinden biridir. Bağlanabildiği beş farklı reseptör bulunması bakımından dahil olduğu ailenin diğer üyelerinden ayrılan TRAIL, değişik dokularda çok yaygın ekspresyon göstermesi açısından da özel bir moleküldür. Ayrıca bu alandaki çalışmalar, TRAIL/TRAIL-R sisteminin, apoptotik yollar yanında anti-apoptotik yolları da indükleyebildiğini göstermiştir. Ancak, *in-vitro* ve *in-vivo* ortamlarda kanser hücrelerini öldürürken sağlıklı hücreleri sağ bırakmak gibi çok önemli seçici özelliğinin ortaya çıkartılması, TRAIL üzerine olan ilginin kanser araştırmaları alanında yoğunlaşmasına neden olmuştur. Buna paralel olarak, TRAIL'ın diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve otoimmünite gibi çok önemli patolojilerde rol oynadığı gösterilmiş olsa da, TRAIL üzerine yürütülen çalışmaların ve yayınlanan makalelerin büyük çoğunluğu kanserle ilişkilidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tüm dünyada 2012 yılındaki ölümlerin sayısı 56 milyon kişi olarak verilmiş, bunların 8.2 milyonunun kansere bağlı olarak hayatını kaybettiği ifade edilmiştir. Yine aynı verilere göre 2012 yılında 14 milyon kanser vakası bildirilmiştir ve bu sayının önümüzdeki yirmi sene içinde yılda 22 milyona ulaşması beklenmektedir. Bu çarpıcı tablo, kanserin gelişim mekanizmasının daha iyi anlaşılması, yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi, ve mevcut tedavi yöntemlerine karşı direncin kırılmasına yönelik araştırmaların önemini net bir şekilde ortaya koymaktadır.

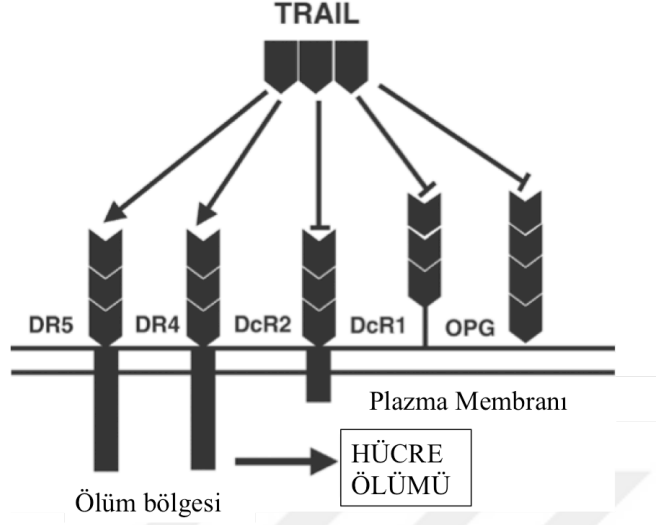
Bir dizi hücre hattında reseptör-selektif mutant oluşturarak yürütülen çalışmalar, TRAIL reseptörlerinden DR5'in apoptoz sinyalleşmesine katkısının DR4'e kıyasla çok daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. DR4 ve DR5'in hücrel kompartimentalizasyonlarının rapor edildiği çalışmaları derleyen 2014 tarihli *Nature* yayınına göre, bir dizi tümör dokusunda ve kanser hücre hattında DR5'in nükleer lokalizasyonuna daha sık rastlanmaktadır. Yine 2014 yılında yayınlanan bir çalışmayla, DR5'e hücre çekirdeğinde rastlanmasına yeni bir açıklama getirilebilmiştir. Buna göre, normalde hücre yüzeyinde bulunması gereken DR5 hem nükleusa geç ederek TRAIL'in etkinliğini düşürmekte, hem de çekirdekte mikroRNA biyogenezine karışarak hücreye ekstra sağkalım avantajı yaratmaktadır. Bu bilgiler ışığında DR5'in hücre yüzeyinde ifade edilmesinin hangi

mekanizmalarla kontrol edildiği sorusu büyük önem kazanmaktadır. DR4 ve DR5'in plazma membranına entegrasyonlarının farklı şekillerde gerçekleştiğinin gösterildiği 2004 yılından bu yana literatürde DR5'in ifade mekanizmasına ilişkin bir çalışma yayınlanmamıştır. TRAIL'in ve reseptör agonistlerinin kanser tedavisinde kullanılması düşüncesi bilim dünyasında büyük heyecan yaratmış ve bu yönde faz çalışmaları başlatılmıştır. Ancak arzu edilen sonuçların elde edilememesi bilim insanlarını TRAIL direncinin mekanizmalarını araştırmaya yöneltmiştir. Bu sayede TRAIL aracılı apoptozu etkileyen pek çok faktör açığa çıkarılmış olmasına rağmen, DR5'in regülasyonu tam olarak anlaşılammıştır. Etkili TRAIL tedavilerinin geliştirilebilmesi için reseptör biyolojisine dair literatürdeki açıkların kapatılması büyük önem arz etmektedir. Bu amaçla, tez projemizde HeLa ve LNCaP hücrelerini kullanarak DR5 reseptörünün hücre yüzeyine çıkış mekanizmasını araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ilk defa 1995 yılında tanımlanmış olan, apoptozu indükleyebilen, TNF ailesi üyesi bir ligandır (Wiley *ve ark.* 1995). N-terminal bölgelerinde korunmuş diziler içermeyen TNF ailesi üyeleri, C-terminal bölgelerinde önemli derece korunmuşlardır (Smith *ve ark.* 1994). TRAIL, C-terminal amino asit dizisi TNF-alfa'ya %23, Fas ligand'a ise %28 (Wiley *ve ark.* 1995) oranında benzerlik gösterdiği için bu isimle anılmaktadır. TRAIL, hem membran bağlı formda (mTRAIL) sentezlenebilir, hem de sistein proteazlar tarafından proteolitik olarak kesilerek çözülebilir formda (sTRAIL) bulunabilir (Wajant *ve ark.* 2001). TNF ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak, TRAIL'ın bağlanabildiği beş farklı reseptör bulunmaktadır. Bunlardan ikisi ölüm reseptörüdür, ve TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5) olarak adlandırılırlar. Bu reseptörler, sitoplazmik kısımlarında bulunan ölüm domaini (DD) sayesinde ligand bağımlı olarak apoptotik sinyal iletebilirler. TRAIL reseptörlerinden diğer ikisi ise fonksiyonel DD bulundurmaz. Bunlar ekstrasellüler bölgelerindeki yüksek homoloji sayesinde DR4 ve DR5 ile ligand bağlama açısından rekabete girerek TRAIL'ın apoptoz yeteneğini etkiledikleri için yalancı/tuzak reseptörler olup, TRAIL-R3 (DcR1) ve TRAIL-R4 (DcR2) olarak adlandırılmıştır. DcR2, sitoplazmik bölgesinde fonksiyonel olmayan kesik bir DD içerirken (Marsters *ve ark.* 1997), DcR1'in sitoplazmik bölgesi yoktur ve hücre membranına sadece bir glikofosfolipid grubu ile bağlıdır (Degli-Esposti *ve ark.* 1997). TRAIL'ın bağlanabildiği beşinci ve son reseptör ise, hücre zarına bağlı bulunmayan osteoprotegerin'dir (OPG/TRAIL-R5) (Pan *ve ark.* 1997, Griffith *ve Lynch* 1998).

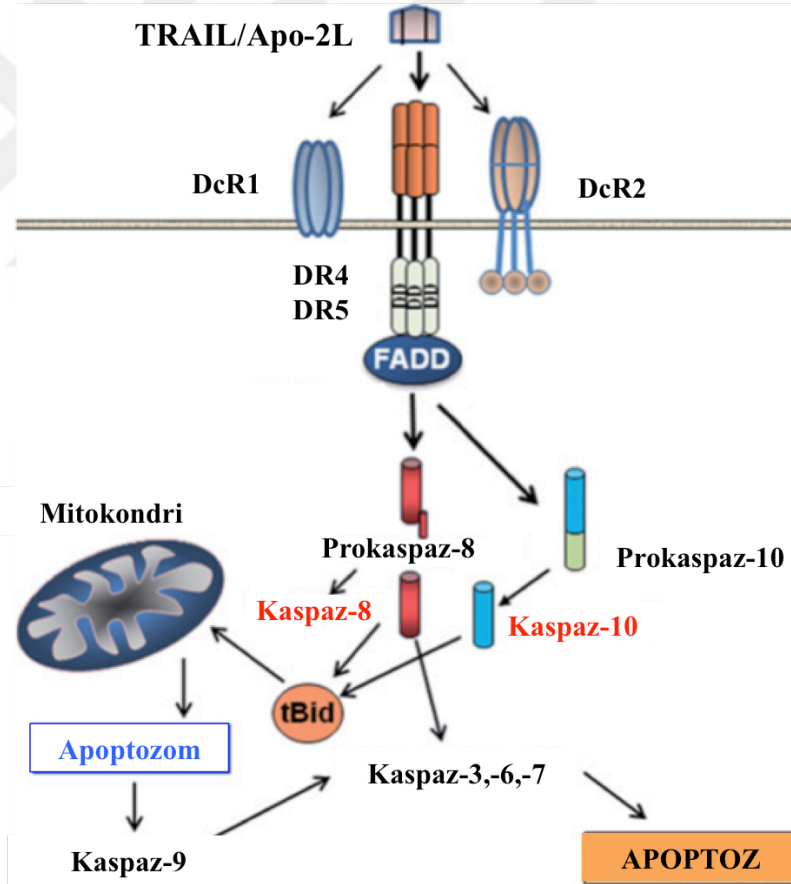


Şekil 2.1. TRAIL reseptörleri (Wang ve El-Deiry 2003)

2.2 TRAIL Sinyalleşmesi

Membrana bağlı veya çözünebilir olarak sentezlenen TRAIL'in, fonksiyonel formu reseptörlerine homotrimerik olarak bağlanır (Pitti *ve ark.* 1996). Trimerik ligandın sistein birimleri tarafından çinko (Zn) bağlanması, hem trimerik yapının stabilitesi, hem de optimal biyolojik aktivitesi için gereklidir (Bodmer *ve ark.* 2000). Ligand bağlanmasının ardından hızla reseptör trimerizasyonu gerçekleşir. Birden fazla reseptör trimerinin özellikle lipid raflarda bir araya gelmesiyle büyük reseptör agregatları oluşur (Song *ve ark.* 2007). Reseptör trimerlerinin moleküler bileşiminin homotrimer mi heterotrimer mi olduğu konusunda çelişkili veriler de mevcuttur (Kischkel *ve ark.* 2000, van der Sloot *ve ark.* 2006, Bin *ve ark.* 2007). Reseptör trimerizasyonunu takiben FADD proteini (Fas-associated death domain-containing protein), yapısındaki ölüm domaini (DD) aracılığıyla reseptör kompleksindeki DD bölgesine bağlanır (Walczak ve Haas 2008). FADD molekülü, diğer fonksiyonel domaini olan DED (Death effector domain) sayesinde prokaspaz-8'i bağlar (Bodmer *ve ark.* 2000). FADD'a bağlanan prokaspaz-8 molekülleri DED domainleri sayesinde başka prokaspaz-8 moleküllerine bağlanarak bir zincir oluştururlar (Dickens *ve ark.* 2012). Böylece, apoptozun başlamasında kritik öneme sahip olan DISC kompleksi (Death-inducing signaling complex) oluşur ve prokaspazların kırılarak aktif kaspaz-8'e dönüşümü gerçekleşir (Pennarun *ve ark.* 2010). Kaspaz-8 aktivasyonu prokaspaz-3, 6, ve 7 gibi diğer prokaspazların kırılıp aktifleşmesine neden olur ve Tip 1 hücreler böylece apoptoza yönelir. Tip 2 hücrelerin

apoptotik ölümü ise hücre içi apoptotik yolların da açılmasını gerektirir. Bir Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid proteini kaspaz-3 tarafından kırılır ve tBid (truncated Bid) oluşur (Huang ve ark. 2016). tBid, mitokondri membranında Bak ve Bax proteinleri ile kompleks oluşturarak membranın geçirgenliğini bozar ve porların açılmasına neden olur (Chalah ve Khosravi-Far 2008). Açılan porlardan salınan sitokrom c molekülleri sitoplazmada Apaf-1'e bağlanır. CARD domaini (Caspase-recruiting domain) sayesinde prokaspaz-9 bağlayan Apaf-1, oligomerik bir yapı oluşturarak apoptozom adı verilen kompleksi meydana getirir. Bu komplekste prokaspaz-9'un kırılarak aktif kaspaz-9'a dönüşümü gerçekleşir (Hu ve ark. 1999). Kaspaz-9 ise efektör kaspazları aktifleştirerek hücrenin apoptoza gitmesine neden olur.



Şekil 2.2. TRAIL aracılı apoptoz yolağı (Safa 2012).

Apoptotik sinyal yollarının yanı sıra, TRAIL'in apoptotik olmayan yolları da aktive ettiği bilinmektedir. Ko-immünopresipitasyon çalışmaları, ligand bağlanmasını takiben TRAIL reseptörleri üzerinde DISC kompleksinin yanı sıra RIP1, TRAF2 (TNF receptor-

associated factor 2) ve NEMO (NF- κ B essential modulator) proteinlerini içeren ikincil bir kompleksin daha oluştuğunu göstermiştir (Varfolomeev *ve ark.* 2005). Her iki TRAIL reseptörünün de NF- κ B yolağını aktive edebildiği gösterilmiştir (Schneider *ve ark.* 1997). MAPK (Mitogen-activated protein kinase) yolaklarının da TRAIL aracılığıyla açılabilirdiği bilinmektedir. TRAIL ile muamele edilen hücrelerde hücre tipine de bağlı olarak kaspaz bağımlı veya bağımsız biçimde JNK (c-Jun N-terminal kinase) yolağının aktive olduğu bildirilmiştir (Muhlenbeck *ve ark.* 1998). Diğer bir MAPK yolağı olan p38'in de TRAIL aracılığıyla aktifleştirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Lee *ve ark.* 2002, Weldon *ve ark.* 2004). Bunun yanı sıra, ERK (Extracellular-signal regulated kinase) proteinlerinin TRAIL aracılığıyla aktifleştirdiği de birden fazla çalışmada rapor edilmiştir (Belyanskaya *ve ark.* 2008, Vilimanovich ve Bumbasirevic 2008). TRAIL'in aktifleştirebildiği bir diğer apoptotik olmayan protein TAK1 (TGF- β activated kinase 1)'dir. HeLa hücrelerinde TAK1'in TRAIL aracılı aktivasyona uğradığı, TAK1 baskılanmasının TRAIL aracılı apoptozu kuvvetlendirdiği gösterilmiştir (Choo *ve ark.* 2006). Tüm bunların yanında PKC (Protein kinase C) (Trauzold *ve ark.* 2001), Akt (Protein kinase B) (Zauli *ve ark.* 2005) ve Src (Song *ve ark.* 2010) kinazların da TRAIL muamelesi sonucu aktifleştirebildiği bilinmektedir.

2.3 TRAIL-Aracılı Apoptoza Direnç

TRAIL molekülünün diğer ölüm ligandlarından farklı olarak, transforme hücreleri apoptoza yönlendirip normal hücrelere zarar vermediğinin keşfedilmesi, özellikle kanser araştırmaları alanında heyecan yaratmıştır (Ashkenazi *ve ark.* 1999, Walczak *ve ark.* 1999). Öyle ki, bu molekülün reseptör agonistlerinin terapide kullanımı için faz çalışmaları başlatılmış ve halen devam etmektedir (Bellail *ve ark.* 2009). TRAIL'in genel olarak normal ve sağlıklı hücrelerde apoptotik etki göstermeyip kanser hücrelerini öldürmesinin, bununla birlikte bazı kanser tiplerinin ve hücre hatlarının TRAIL aracılı apoptoza direnç göstermesinin mekanizması olarak çeşitli senaryolar ortaya atılmıştır. Bunlardan biri, normal hücrelerde kanser hücrelerine göre daha yüksek miktarda DcR1 ve DcR2 ekspresyonu olmasıdır (Sheridan *ve ark.* 1997). Bu yalancı reseptörler, ortamdaki serbest TRAIL moleküllerini üzerlerine çekerek apoptozu indükleyebilen DR4 ve DR5'e bağlanmalarını etkileyebildikleri gibi, DR4 ve DR5 ile heterotrimerik kompleksler oluşturarak bu reseptörlerin fonksiyonunu da değiştirebilirler. Bazı kanser

hücre hatlarında ise, DR4 ve DR5'in sürekli olarak endositoz yoluyla hücre içine alınması apoptoza direnç ile ilişkilendirilmiştir (Zhang ve Zhang 2008). Bu durum da TRAIL direncinin mekanizmalarından biridir. Hücre yüzeyindeki reseptör kombinasyonunun yanı sıra, bu reseptörlerin sitoplazmik birimlerinin diğer proteinlerle etkileşimi de TRAIL direncinin sebeplerinden biri olarak sunulmuştur. cFLIP, MADD (MAPK-activating death domain protein), GSK3, DDX3 ve cIAP-1 bu proteinler arasında gösterilmiştir (Roth ve Reed 2004, Sun *ve ark.* 2008, Li *ve ark.* 2010). Apoptotik sinyallerin reseptör seviyesinde baskılanmasının yanında, apoptoz yolağının ileri basamaklarında rol alan proteinler aracılığıyla da TRAIL molekülünün etkisinin baskılandığı bildirilmiştir. Bcl-2 aşırı ekspresyonu görülen hücrelerde ve XIAP kaspaz inhibitörü kullanılan bazı tümör hücrelerinde TRAIL indüklü apoptozun baskılandığını rapor eden çalışmalar mevcuttur (Fulda *ve ark.* 2002, Schimmer 2004). Son olarak, TRAIL'in Akt, ERK, NF- κ B gibi anti-apoptotik ve mitojenik yolakları aktive edebildiğinin gösterilmesi (Secchiero *ve ark.* 2003, Kavurma *ve ark.* 2008) de yukarıda sözü geçen senaryolara dahil edilebilir.

2.4 Hücre İçi DR5 Lokalizasyonu ve Fizyolojik Önemi

TRAIL reseptörlerinin sadece hücre yüzeyinde değil, sitoplazmada da bulunduğunu gösteren çalışmalar çeşitli gruplar tarafından yayınlanmıştır (Spierings *ve ark.* 2003, Sanlioglu *ve ark.* 2007, Ganten *ve ark.* 2009). Hücre yüzeyindeki reseptörlerin, sentezlenip membrana yönlendirildiği, ve sinyal iletiminin bir parçası olarak internalizasyonla hücre içine geri alındığı bilindiğinden, hücre yüzey reseptörlerine sitoplazmada rastlamak şaşırtıcı değildir.

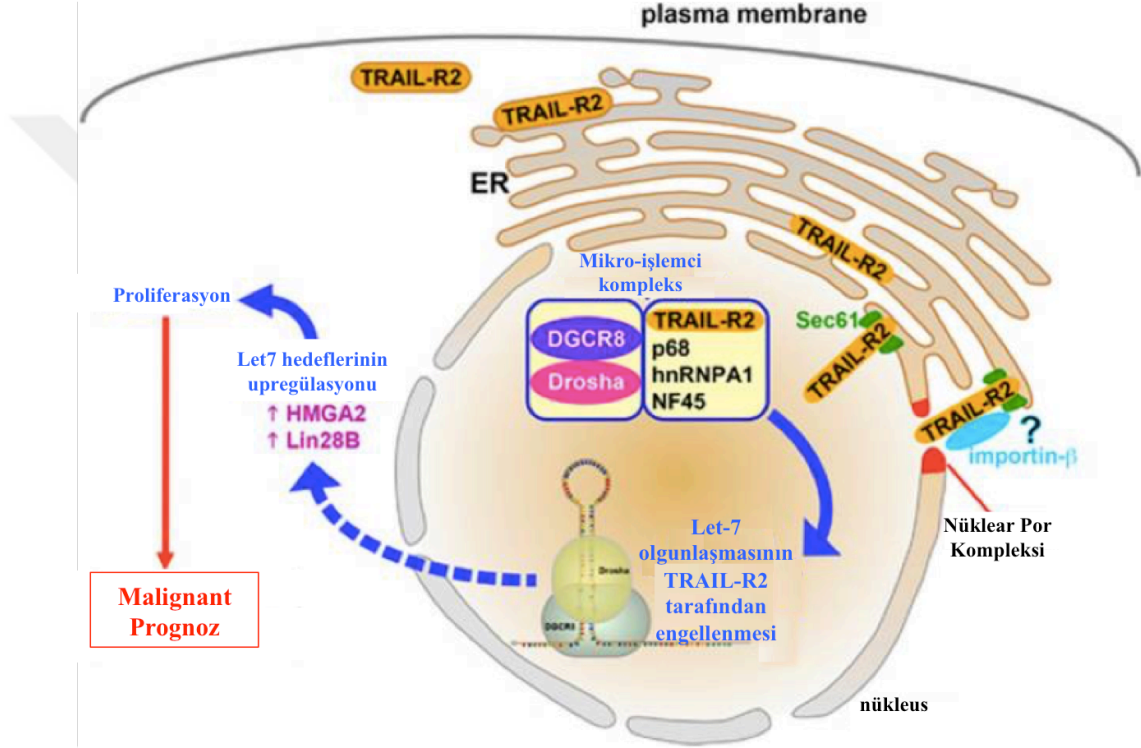
Ölüm reseptörlerinin hücre çekirdeğinde bulunması ise beklenmedik bir durumdur. Örneğin melanoma hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada, DR4'ün çekirdekte lokalize olabildiği gösterilmiştir (Zhang *ve ark.* 2000). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatları ile yapılan bir çalışmada ise DR5'in nüklear lokalizasyonu ilk kez rapor edilmiştir (Leithner *ve ark.* 2009). HeLa, HepG2 ve DU145 hücre hatlarının kullanıldığı 2011 yılına ait bir çalışmada ise HeLa ve HepG2 hücrelerinde DR5'in yoğun olarak çekirdekte bulunduğu, buna karşılık DU145 hücrelerinde yüzeyde ifade edilirken çekirdekte bulunmadığı belirtilmiştir (Kojima *ve ark.* 2011). Aynı çalışmada bu durum,

HeLa ve HepG2 hücrelerinin TRAIL aracılı apoptoza direnç göstermesinin, DU145 hücrelerinin ise TRAIL muamelesi sonrası ölmesinin sebebi olarak gösterilmiştir. Kojima ve ark., DR5'in hücre çekirdeğine importin β 1 aracılığıyla girdiğini saptayarak ilk kez bir ölüm reseptörünün nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) aracılı taşınmasını rapor etmişlerdir (Kojima ve ark. 2011). 2014 yılında yayınlanan bir çalışmada araştırmacılar DR5'in hücre çekirdeğinde spesifik bir rolünün bulunup bulunmadığını sorgulamışlardır.

Başta pankreas kanseri hücre hatları olmak üzere belli tümör hücrelerinde nükleer DR5'in mikroRNA sentezinde görevli p68, NF45 ve hnRNPA1 proteinlerine bağlandığını göstermişlerdir (Haselmann ve ark. 2014). Yazarlar bu etkileşim sonucunda DR5'in let-7 ailesine üye miRNA'ların olgunlaşmasını engellediğini ve söz konusu moleküllerin hedef genlerinde ifade artışına neden olduğunu belirtmektedirler. HMGA2 ve Lin28B gibi tümör gelişimiyle ilişkilendirilmiş let-7 hedef genlerinde TRAIL-R2/DR5 miktarına bağlı değişimler gözlenmektedir. Söz konusu proteinlerin sentezinde DR5 ifadesinin inhibisyonu ile düşüş gözlemlendiği, DR5 aşırı ekspresyonu ile ise artış görüldüğü bildirilmektedir. Bu çalışma ile, daha önce çekirdekte bulunduğu saptanan DR5'in, çekirdeğin yapısal bileşenleri veya aktivitelerinden ziyade nükleoplazmada gen ifadesinin düzenlenmesinde işlev gördüğü ortaya çıkmıştır.

Yukarıda da bahsedildiği gibi TRAIL reseptörlerinin hücre yüzeyindeki dağılımı, hücrenin TRAIL ligandına vereceği cevabı etkilemektedir. Kolon kanseri hücre hattıyla yapılan bir çalışmada, hücrelerin sürekli TRAIL ligandı ile muamele edilmesiyle yaratılan TRAIL direncinin, ekspresyon oranında değişiklik gözlenmeyen DR4 proteininin hücre membranına taşınmaması nedeniyle ortaya çıktığı saptanmıştır (Jin ve ark. 2004). Aynı yıl yayınlanan bir çalışma, hücre içi DR4 ve DR5 trafiğine ışık tutan veriler sunmaktadır. Bu çalışmaya göre DR4'ün HeLa ve HCT-15 hücre hatlarında membrana lokalizasyonu, klasik SRP (Signal Recognition Particle) aracılı ER (Endoplazmik Retikulum) translokasyonu ile başlamaktadır. SRP kompleksi bileşenlerinin "knockdown" edilmesi DR4'ün hücre yüzeyinde ifade edilmesini ve dolayısıyla DR4 aracılı apoptoza engellemektedir. İlginç bir şekilde bu müdahale, hücre yüzeyindeki DR5 ifade miktarını ve DR5 aracılı apoptoza etkilememektedir (Ren ve ark.

2004). Aradan on yıl gibi bir süre geçmiş olmasına rağmen DR5'in hücre yüzeyine nasıl ulaştığı açıklanamamıştır. Hücre yüzeyine varamayan DR5'in TRAIL yolağını etkisiz kılacağı aşikar olmasının yanında, üzerinde taşıdığı NLS sayesinde importin β aracılığıyla çekirdeğe taşınıp (Kojima *ve ark.* 2011) let-7 biyogenezini engelleyerek hücreye ekstra sağkalım ve çoğalma avantajı sağlayacağı (Haselmann *ve ark.* 2014) anlaşılmaktadır.

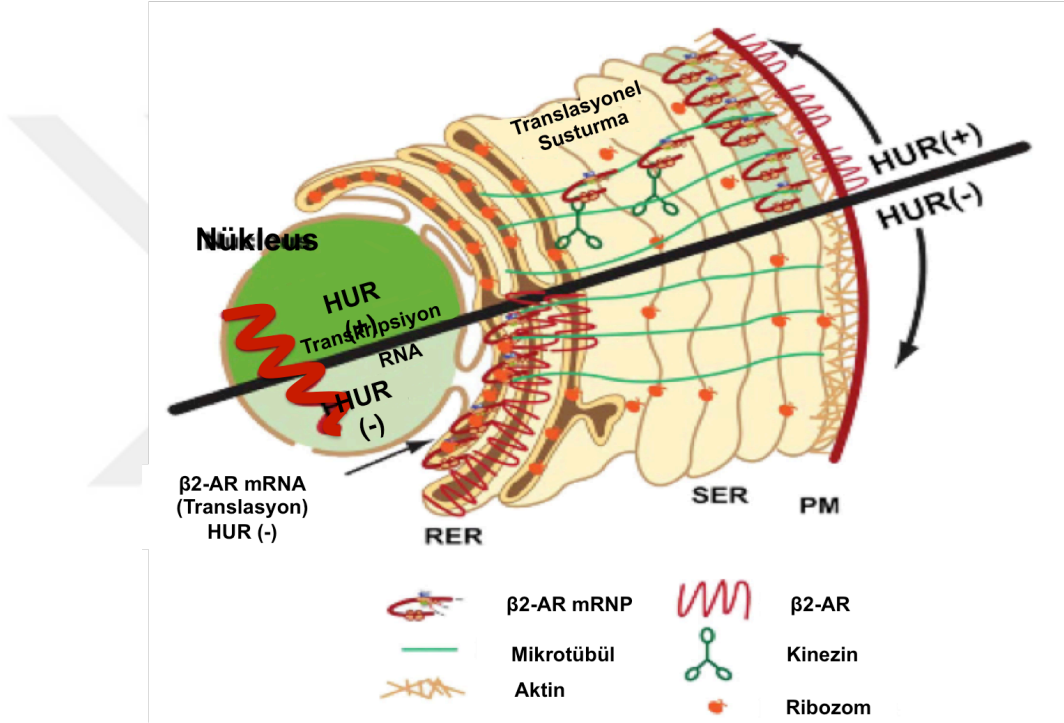


Şekil 2.3. Hücre içi DR5 lokalizasyonu (Bertsch *ve ark.* 2014).

2.5 HuR ve Vps39

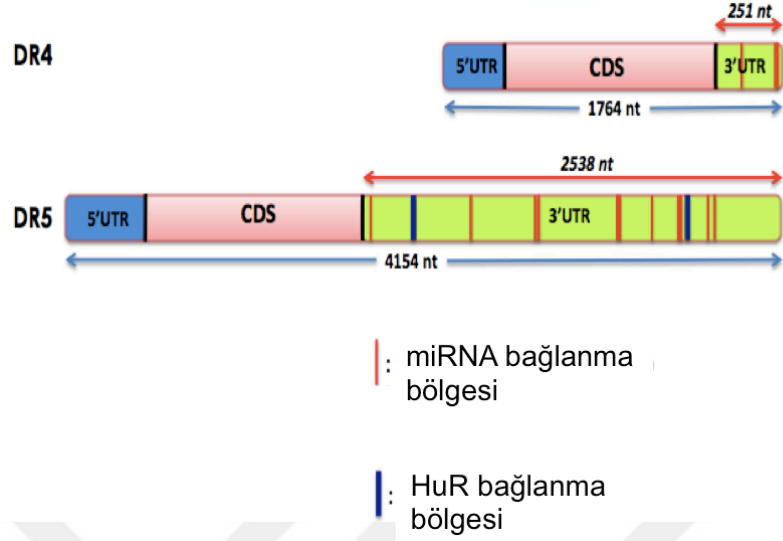
2010 yılında yayınlanan bir çalışmaya göre Beta-Adrenerjik Reseptör (β_2 -AR), hücre zarına Human Antigen R (HuR) veya ELAVL1 (Embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila-like 1) isimli bir RNA-binding protein aracılığıyla taşınmaktadır (Tholanikunnel *ve ark.* 2010). HuR proteini, çekirdekte β_2 -AR mRNA'sına 3'-UTR bölgesinden bağlanarak sitoplazmaya beraber çıkmaktadır ve bu bağlanma mRNA'nın stabilitesini arttırmaktadır. HuR baskılandığında β_2 -AR mRNA seviyesi düşerken, β_2 -AR protein miktarı enteresan biçimde artmaktadır. Zira literatürde HuR'un ana

fonksiyonu, mRNA stabilizasyonu ve translasyonel baskılanma olarak bildirilmektedir (Brennan ve Steitz 2001). Bahsi geçen çalışmada HuR baskılanması sonucu protein seviyesi artan β_2 -AR'ün membrana gidemediği ve çekirdek etrafında biriktiği gözlenmiştir. RNA FISH yöntemi ile inceleme sonucunda, HuR proteininin baskılanmadığı hücrelerde, β_2 -AR mRNA'sı ve HuR'un birlikte lokalize oldukları ve hücre periferinde buldukları gözlenmiştir.



Şekil 2.4. Hücre yüzeyinde HuR aracılı reseptör ifadesi (Tholanikunnel ve ark. 2010).

HuR proteininin benzer biçimde DR5 mRNA'sına da bağlanarak DR5'in ifadesini de posttranskripsiyonel olarak düzenleyebildiği doğrudan ve dolaylı olarak gösterilmiştir. DR4 ve DR5 mRNA'ları incelediğinde, DR4 transkriptinin 1764 nt uzunluğunda olduğu, 3'-UTR bölgesinin uzunluğunun ise 251 nt olduğu görülmektedir. Buna karşılık DR5 mRNA'sı 4154 nt uzunluğundadır ve 2538 nt'lik uzun bir 3'-UTR bölgesine sahiptir.

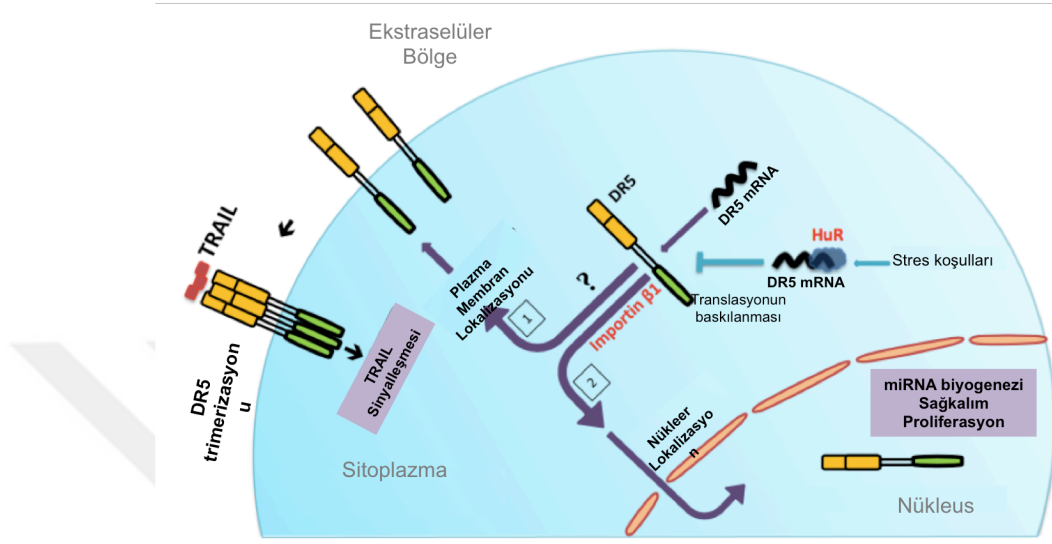


Şekil 2.5. DR4 ve DR5 transkriptleri (Mert ve Sanlioglu 2017).

2011 yılında HuR hedef genlerini belirlemek için yapılan bir çalışmada, DR5'in 3'-UTR bölgesinde bir adet HuR bağlanma bölgesi tanımlanmıştır (ek veriler) (Uren ve ark. 2011). 2013 yılında küçük hücreli-dışı akciğer kanseri (NSCLC) hastalarında artan ölüm riskiyle ilişkilendirilen DR5 geni polimorfizmlerinde 4 önemli SNP'den bir tanesi 3'-UTR'da bulunmuştur (Schabath ve ark. 2013). Son olarak, 2008 yılında LNCaP hücrelerinde HuR proteininin DR5 mRNA'sına 3'-UTR bölgesinden bağlanarak mRNA molekülünü stabilize ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada hücreler PS-341 (VELCADE, bortezomib) adlı proteozom inhibitörü ile muamele edildiğinde DR5 mRNA'sının yarı ömrünün 2 kat arttığı gözlenmiştir.

DR5 transkripti uzun bir 3'-UTR ihtiva ettiğinden, bu bölgenin mRNA stabilizasyonuna katkısı olup olmadığı araştırılmıştır. Reporter genin arkasına klonlandığında 3'-UTR bölgesinin, reporter gen transkriptinin stabilizasyonunu arttırdığı görülmüştür. 3'-UTR dizisi incelendiğinde, HuR proteininin buraya bağlandığı, bortezomib muamelesi ile bu bağlanmanın arttığı, ve HuR'un baskılanması sonucu DR5 mRNA yarı-ömrünün azaldığı gösterilmiştir (Kandasamy ve Kraft 2008). 2012 yılında pankreas kanseri hücre hatları ile yapılan bir çalışmada HuR proteini baskılanan 3 hücre hattından ikisinde DR5 protein miktarının 4 kat arttığı belirtilirken, reseptörün yüzey ekspresyonunun sadece %10 oranında arttığı rapor edilmiştir (Pineda ve ark. 2012). Tüm bu bulgulardan

çıkarılabilecek sonuç, HuR proteininin β_2 -AR örneğinde olduğu gibi DR5 mRNA'sına da bağlanarak reseptörün hücre zarına lokalizasyonunda rol oynuyor olabileceğidir.



Şekil 2.6. Hücre içi DR5 lokalizasyonunda rol oynayan muhtemel faktörler (Mert ve Sanlioglu 2017).

Yukarıda bahsi geçen, DR4 ve DR5'in diferansiyel regülasyonunun araştırıldığı ve iki reseptörün hücre yüzeyine farklı yollardan ulaştığı sonucuna varılan çalışmada (Ren ve ark. 2004), HeLa ve kolon kanseri (HCT-15) hücre hatlarında 543 adet gen siRNA yöntemi ile susturulmuş ve bu genlerin hücre ölümü üzerine etkileri incelenmiştir. Tablo 2.1'de, DR4 ve DR5 aracılı apoptozu en çok baskılayan ve arttıran genler listelenmiştir.

Tablo 2.1. DR4 ve DR5 aracılı ölümü inhibe eden veya arttıran siRNA'lar (Ren ve ark. 2004).

Inhibit					
DR4			DR5		
Acc. number	Symbol	SR	Acc. number	Symbol	SR
NM_003844	TNFRSF10A	3.25	AB018313	VPS39	1.69
NM_003844	TNFRSF10A	3.00	NM_002211	ITGB1	1.50
NM_006947	SRP72	2.95	NM_002759	PRKR	1.49
NM_002467	MYC	2.40	NM_004071	CLK1	1.47
NM_014226	RAGE	2.32	NM_003842	TNFRSF10B	1.44

Enhance					
Acc. number	Symbol	SR	Acc. number	Symbol	SR
NM_002958	RYK	0.30	NM_139158	ALS2CR7	0.22
XM_087575	RIKEN like	0.30	NM_007284	PTK9L	0.25
AC087742	clone RP11-104O19	0.33	NM_002110	HCK	0.26
NM_002576	PAK1	0.34	NM_003600	STK6	0.28
NM_005246	FER	0.35	NM_001229	CASP9	0.29

Tablodan da anlaşıldığı gibi, 543 gen içerisinde Vps39'un susturulması, DR5 aracılı hücre ölümünü en çok baskılayan uygulama olmuştur. Bu proteinin DR5 biyolojisinde veya apoptozda oynadığı rol araştırılmamıştır. Vps39 (Vacuolar protein sorting 39 homolog) (TLP, VAM6, hVam6p), geç endozomlarla lizozomların birleşmesinde fonksiyon gören bir proteindir (Caplan ve ark. 2001). Aynı siRNA'larla yapılan başka bir çalışmada, susturulması apoptozu en çok baskılayan genlerden birinin Vps16 olduğu saptanmıştır (Aza-Blanc ve ark. 2003). Vps proteinlerinin doğrudan mRNA moleküllerine bağlanarak, bu moleküllerin hücre içindeki lokalizasyonlarında rol oynadığı bilinmektedir. Örnek olarak, Drosophila embriyolarının gelişiminde önemli bir yere sahip olan bicoid mRNA'sının spatial dağılımı ve ekspresyonu, Vps36 tarafından gerçekleştirilmektedir (Irion ve St Johnston 2007). 2012 yılında yayınlanan bir çalışmaya göre ise, Vps22'nin baskılanması, HIV-1 genomik RNA'sının hücre içi trafiğini engellemekte ve virüs üretimini sekteye uğratmaktadır (Ghoujal ve ark. 2012). Tüm bu verilerden anlaşılacağı gibi, Vps proteinleri ve özellikle Vps39, hücre yüzeyine DR5 translokasyonunda görev alıyor olabilir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında, DR5 reseptörünün hücre yüzeyine taşınmasında transkriptin 3'-UTR bölgesinin ve buraya bağlanan HuR proteini ile endozomal trafikte görevli Vps39 proteininin rolü olabileceğini hipotez olarak ileri sürdük ve tez projemizde bu rolü araştırdık.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan LNCaP ve HeLa hücrelerinin özellikleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan hücre hatlarının özellikleri

Hücre Hattı	Kökeni	TRAIL Duyarlılığı
HeLa	İnsan serviks kanseri	(+)
LNCaP	İnsan prostat adenokarsinoma, lenf nodu metastazı	(-)

Kullanılan Solüsyonlar ve Cihazlar

- DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium, Biochrom FG0415), besiyeri
- RPMI 1640 (Gibco 11875093), besiyeri
- FBS (Biochrom S0115), Fetal Dana Serumu
- Penisilin/Sreptomisin/Amfoterisin (BI-03033113), antibiyotik/antifungal
- Gentamisin, antibiyotik
- Tripsin/EDTA (Biochrom L2163), tripsin
- PBS (8gr NaCl, 0.2gr KCl, 1.44gr Na₂HPO₄, 0.24gr KH₂PO₄, 1lt, pH7.4), tampon çözeltisi
- Cell Scraper (Corning 353085), hücre kazıyıcı
- 10 cm petri kapları (Corning 430167)
- Toma Lamı (Marienfeld 0640131), hücre sayım lamı
- CO₂ İnkübatörü (SHEL LAB SCO5W)
- Heraeus HS12, Klas II hücre kültürü kabini

Tez çalışmasında insan serviks kanseri hücre hattı HeLa ve insan metastatik prostat kanseri hücre hattı LNCaP kullanıldı. HeLa hücreleri DMEM besiyerinde, LNCaP hücreleri ise RPMI 1640 besiyerinde çoğaltıldı. Her iki ortama da %10 Fetal Dana Serumu, Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin ve Gentamisin eklendi. İnkübasyonlar %5 CO₂, %95 nem ve 37°C sıcaklık koşullarında gerçekleştirildi. Pasaj zamanı gelen hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsinizasyonla kaldırılıp yeni petri kaplarına ekildi.

3.2. siRNA Aracılığıyla Gen İfadelerinin Baskılanması

Kullanılan Solüsyonlar ve Malzemeler

Tablo 3.2 HuR ve Vps39'un baskılanmasında kullanılan siRNA'ların dizileri

siRNA	Dizi
Anti-HuR	5'-UGAACUACGUGACCGCGAATT-3'
Anti-Vps39	5'-GCAGGUCUUUGCUAAACUUTT-3'

-siRNA'lar: Negatif kontrol (Ambion AM4635), GAPDH pozitif kontrol (Ambion 4390850), HuR (Ambion 4390825-s4609), Vps39 (Ambion 4392421-s23599)

-Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen 13778), transfeksiyon ajanı

-Opti-MEM (Gibco 31985062), bazal besiyeri

Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında ters siRNA transfeksiyonu şu şekilde gerçekleştirildi:

90nM siRNA ve 30µl Lipofectamine RNAiMAX 2ml opti-MEM içinde karıştırılıp petri kabına eklendi ve 20 dakika beklendi. Süre sonunda, tripsin ile kaldırılmış olan hücreler Lipofektamin/siRNA kompleksinin üzerine eklenerek inkübatöre kaldırıldı. 48 saat boyunca inkübe edilen hücreler scraper (hücre kazıyıcı) yardımıyla toplandı.

3.3. Hücre Fraksiyonasyonu

Kullanılan Solüsyonlar, Malzemeler, ve Cihazlar

-Plazma Membran Protein İzolasyon Kiti (Abcam ab65400)

-AllPrep DNA/RNA/Protein İzolasyon Kiti (Qiagen 80004)

-İnsülin enjektörü

-Triton X-100

- β -ME, beta-merkaptöetanol

-Etanol

-Homojenizatör (Kimble Kontes)

-Soğutmalı Santrifüj (SIGMA 1-15PK)

siRNA ile transfekte edilen hücreler, Plazma Membran Protein İzolasyon Kiti'nde mevcut olan ve proteaz inhibitörü eklenmiş homojenizasyon tamponu ile toplandıktan sonra homojenizatör yardımıyla parçalandı. Lizatlar 10 dakika 700g hızda ve 4 °C sıcaklıkta santrifüj edilerek hücre çekirdeklerinin dibe çökmesi sağlandı. Temiz tüplere aktarılan dökelti bu sefer 10.000g hızda 4°C'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu aşamada elde edilen dökelti sitozolik proteinleri içermektedir. Söz konusu sitoplazmik fraksiyon alikotlanarak -80 °C'de saklandı. Dibe çökmüş olan çökelti ise total membran fraksiyonundan oluşmaktadır. Hücre zarındaki proteinleri organellerin membran proteinlerinden ayırmak amacıyla, söz konusu çökelti, kitin içeriğindeki üst faz ve alt faz solüsyonları kullanılarak çözüldü. Bir dizi gradient santrifüjden sonra plazma membran proteinleri saflaştırıldı ve Triton X-100 tamponunda çözülüp -80 °C'de saklandı.

Yukarıda söz edilen hücre çekirdeklerinden AllPrep protein izolasyon kiti yardımıyla proteinler ayrıştırıldı. Bunun için, nüklear çökelti kitin içeriğindeki β -ME eklenmiş RLT tamponunda pipetaj yardımıyla çözdürüldü. İnsülin enjektöründen 5'er defa geçirilerek hücre çekirdeklerinin tamamen parçalanması sağlandı. DNA spin kolonuna yüklenen

örnekler 30 saniye kadar 8000g hızda santrifüj edildi. Böylece DNA'dan arındırılmış olan nüklear proteinler, APP tamponu eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek tuzla çöktürüldü. Son hızda 10 dakika santrifüjden sonra %70 etanol ile yıkanıp tekrar santrifüj edilen nüklear fraksiyonlar, kit içeriğindeki ALO tamponunda çözülerek -80°C'de saklandı.

3.4. Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Kullanılan Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar

-BSA (AMRESCO 0332)

-Bradford Reagent (AppliChem A6932)

-96w Plate (Corning 3599)

-MultiSkan Spectrum (Thermo), ELISA okuyucu

Hücre fraksiyonlarındaki protein miktarlarının belirlenmesi ve buna göre SDS-PAGE için her örnekten eşit miktarda yüklenebilmesi için Bradford Assay yapıldı. 1µg/µl konsantrasyondaki BSA standardından 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, ve 5 µl hacimler 3'lü tekrar olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'e dağıtıldı. Örneklerden de 1µl hacim yine üçer tekrar olacak şekilde dağıtılıp her kuyuya 100µl Bradford solüsyonu eklendi. ELISA okuyucusunda 595nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi. Üçer tekrarı yapılmış her örnek ve standardın ortalaması alınıp "blank" değeri bu ortalamadan çıkartıldı. Standartların değerleri kullanılarak Excel programında standard eğrisi ve denklemi oluşturuldu. Bu denklemden faydalanarak örneklerdeki protein miktarları hesaplandı.

3.5. SDS-PAGE İçin Örneklerin Hazırlanması

Kullanılan Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar

-SDS (Merck 8.22050.1000)

-Laemmli Tamponu (1ml gliserol, 3ml %10 SDS, 1,25 ml (1M) Tris-HCl pH6.7, 2µg bromofenol mavisi filtrelenip alikotlandı ve -20°C'de saklandı. Kullanmadan önce 50µl/ml β-merkaptotanol eklendi), yükleme tamponu

-Dry Block (BIOSAN TDB-100)

Bradford testi ile miktarları belirlenen örneklerden 50-75µg'lık miktarlar temiz tüplere alındı. Üzerlerine örnek hacminin iki katı kadar yükleme tamponu eklendi. Kuru ısı bloğunda 5 dakika 95⁰C'de inkübe edildi. Süre sonunda örnekler hızla buz üzerine alındı.

3.6. SDS-PAGE Jelin Hazırlanması ve Elektroforez

Kullanılan Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar

-Resolving (Ayırıcı) Tampon (1.5M Tris Baz, pH8.8)

-Stacking (Hizalayıcı) Tampon (0.5M Tris Baz, pH6.8)

-Yürütme Tamponu (1.5g Tris Baz, 9.4g Glisin, 5ml %10 SDS, 1lt)

-Acr:BisAcr (SIGMA A8887), Akrilamid:Bisakrilamid

-APS (SIGMA A3678), Amonyum persülfat

-TEMED (Merck 1107320100)

-Pipet ucu (ExactaCruz sc-201732)

-Protein Marker (Marka?)

-Elektroforez camları (GE 80-6178-99)

-Elektroforez tankı (Amersham SE600)

-Güç kaynağı (BIO-RAD PowerPac 1000)

Aşağıdaki gibi hazırlanan ayırıştırma jeli dikey elektroforez camlarının arasına döküldü:

%10'luk jel için 11.55ml ddH₂O, 7.5ml resolving buffer, 10.5ml Acr:BisAcr (29:0.8), 300µl %10 SDS, 300 µl APS karıştırıldı. Üzerine 30µl TEMED eklenip tekrar karıştırıldı ve vakit kaybetmeden camların arasına döküldü.

Jelin üst kısmının düz bir şekilde donmasını sağlamak için üzerine %1 SDS eklendi. Resolving jel (ayırıcı jel/alt jel) donduktan sonra üzerindeki %1 SDS dökülüp saf su ile yıkandı. Üzerine, aşağıdaki gibi hazırlanan stacking jel (hizalayıcı jel/üst jel) döküldü:

3ml ddH₂O, 1.25ml stacking buffer, 625µl Acr:BisAcr (29:0.8), 50µl %10 SDS, 50µl APS karıştırıldı, üzerine hemen 5µl TEMED eklenip tekrar karıştırıldı. Donmasına fırsat vermeden alt jelin üzerine dökülüp hızla tarak yerleştirildi. 1 saat kadar donması beklendi.

Üst jel donduktan sonra tarak çıkartılıp kuyular saf su ile yıkandı. Dikey elektroforez tankına yerleştirilen jelin üzerine ve tankın altına jele temas edecek şekilde yürütme tamponu eklendi. Dikey poliakrilamid jele örnek yüklemek için üretilmiş ince uzun pipet uçları ile yukarıda tarif edildiği şekilde hazırlanan örnekler kuyulara yüklendi. İlk kuyuya yükleme tamponu, ikinci kuyuya protein marker ve son kuyuya tekrar yükleme tamponu yüklendi. Yürütme tankının kapağı kapatılıp güç kaynağına bağlandı. Örnekler üst jeli geçene kadar 120V, alt jelde yürüme içinse 150V akım uygulandı.

3.7. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Kullanılan Malzemeler ve Solusyonlar

-Transfer Tamponu (14.5g Tris Baz, 7.5g Glisin, 500ml Metanol, 2lt)

-Metanol (SIGMA 24229)

-PVDF Membran (Millipore IPVH00010)

-Transfer tankı (BIO-RAD)

Transfer için, sandviç kasetinin süngerleri arasına transfer tamponunda ıslatılmış 3 kat Whatman kağıdı yerleştirildi. Üzerlerine, örneklerin yürütüldüğü poliakrilamid jel dikkatlice yerleştirildi. Jelin üzerine, saf metanolde 1 dakika kadar bekletilip aktive edilen PVDF membran yerleştirildi. Membranın üzerine tekrar 3 kat ıslak Whatman kağıdı yerleştirildi. Tüm bu aşamalarda, jel ile membran arası başta olmak üzere her bir katman arasında hava boşluğu kalmamasına özen gösterildi. Sandviç kaseti sıkıştırılarak transfer tankına yerleştirildi. Bu aşamada dikkat edilmesi gereken nokta ise, kasetin düz

yerleştirilmesidir. Aksi takdirde proteinler jelden membrana doğru hareket etmek yerine ters yönde, Whatman kağıdına doğru hareket ederler. Transfer tankının içi transfer tamponu ile doldurulup kapağı kapatıldı ve güç kaynağına bağlanarak gece boyu 72-75V akım uygulandı.

3.8. Western Blot

Kullanılan Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar

-Antikorlar: anti-GAPDH (BioLegend 631401), anti-HuR (Cell Signaling 12582S), anti-Vps39 (Abx037041), anti-DR5 (Abcam ab8416), sekonder antikor (Advansta R-05072), anti-Actin (Abcam ab156302)

-PBS-T (1lt PBS, 1ml Tween20), yıkama tamponu

-Çalkalayıcı (Stuart SSL4)

Transfer işlemi durdurulup kaset açıldıktan sonra PVDF membran üzerindeki proteinlerin sabitlenebilmesi için saf metanolde 1 dakika kadar bekletildi. Ardından, membran üzerinde protein bulunmayan bölgelerin bloklanabilmesi için PBS-T tamponunda çözülmüş %1'lik BSA solüsyonuna daldırıldı ve 2 saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda, bloklama solüsyonuyla 1/1500 oranında seyreltilmiş primer antikorda 1 saat inkübe edildi. Primer antikor uzaklaştırıldıktan sonra 2x30 dakika yıkama tamponunda yıkanan membran 1 saat süreyle sekonder antikorda inkübe edildi. Süre bitiminde sekonder antikor uzaklaştırıldıktan sonra tekrar 2x30 dakika yıkandı. Tüm inkübasyonlar ve yıkamalar oda sıcaklığında çalkalanarak gerçekleştirildi.

3.9. Strip-off İşlemi

Kullanılan Solüsyonlar

-Strip-off solüsyonu (12.5ml Stacking (Hizalayıcı) Tampon, 20ml %10 SDS, 67.5ml ddH₂O, 704µl Beta-merkaptöetanol)

Blotlanan membranların başka bir antikorla tekrar işaretlenebilmesi için öncelikle bağlanmış antikorlardan temizlenmesi gerekmektedir. Bunun için, hazırlanan strip-off solüsyonu 55°C sıcaklığa getirildi. Strip-off solüsyonuna daldırılan membranlar

çalkalamalı inkübatörde yine 55°C’de 5-7 dakika çalkalandı. Ardından solüsyon uzaklaştırılıp membranlar yıkama tamponunda 2x15 dakika çalkalanarak yıkandı. Böylelikle membranlar bir sonraki işaretleme (örneğin normalizasyon için Aktin veya GAPDH işaretleme) için hazır hale gelmiş oldu.

3.10. DR5 ELISA

Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar:

-DR5 ELISA Kiti (CUSABIO CSB-E13164h)

Öncelikle, her kuyuya eşit miktarda protein yükleyebilmek için örneklerin protein miktarı Bradford Assay ile belirlendi. Kitin içeriğinde bulunan, DR5 antikoru ile kaplanmış kuyulara standart ve örneklerden 100’er µl konularak 37°C’de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyular boşaltılıp kitin içeriğindeki biotin bağlı DR5 antikorundan 100µl eklenerek 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Ardından kuyular boşaltılarak kitin içeriğindeki yıkama tamponu ile üçer defa yıkandı. Her kuyuya kitin içeriğindeki HRP-avidin solüsyonundan 100’er µl eklenip 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyular beşer defa yıkayıp kitin içeriğindeki TMB solüsyonundan 90µl eklendi. Karanlık ortamda ve 37°C’de, renk değişimi gerçekleşene kadar inkübe edildi. Süre sonunda kitin içeriğindeki stop solüsyonundan 50µl eklenerek ELISA okuyucusunda 450nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

3.11. Apoptoz ve Nekroptoz Ölçümü

Kullanılan Malzeme, Solüsyon ve Cihazlar

-HücreSEL DNA Fragmantasyon Kiti (Roche 11585045001)

-sTRAIL ligand (R&D Systems 375-TL)

-Stop Solüsyonu (0.16M Sülfürik Asit)

-Çok Kanallı Mikropipet

-Mikrodalga Fırın (Çeba)

Hücreler kitin içeriğindeki Bromodeoksiüridin (BrdU) ile gece boyu inkübe edilerek, çoğalan hücrelerde yeni sentezlenen DNA'ya BrdU molekülünün entegre olması sağlandı. Düz tabanlı 96 kuyuluk plate'lere yukarıda tarif edildiği şekilde kaplanan siRNA+lipofektamin kompleksinin üzerine 10.000 adet BrdU işaretlenmiş hücre ekilip 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücreler insan sTRAIL ligandı (100nM/ml) ile 4 saat muamele edildi. Ardından, 96 kuyulu plate 250g hızda 10 dk santrifüj edilip dökelti nekroptoz ölçümü için toplandı ve -20°C'de muhafaza edildi. Kitin içeriğinde bulunan inkübasyon solüsyonundan her kuyuya 200µl dağıtılıp oda sıcaklığında 30 dakika beklenerek apoptotik vesiküllerdeki DNA parçalarının açığa çıkması sağlandı. Süre sonunda plate tekrar 250g hızda 10 dk santrifüj edilip dökelti toplandı ve -20°C'de saklandı.

Boş bir 96 kuyulu plate'e kitin içeriğindeki anti-DNA solüsyonundan 100µl eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Kuyularda anti-DNA antikoru ile kaplanmayan bölgelerin bloklanması için kitin içeriğindeki inkübasyon solüsyonundan 200µl eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda kuyular kit içeriğindeki yıkama solüsyonu ile üçer defa yıkandı. Yıkamanın ardından -20 °C'de saklanmış olan örnekler kuyulara eklenerek 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda üçer defa yıkanan plate, üçüncü yıkama solüsyonu uzaklaştırılmadan mikrodalga fırında 500W güçte 5 dakika ısıtıldı. Böylece DNA molekülleri sabitlenip denatüre edildi. Kuyulardaki yıkama solüsyonu oda sıcaklığına geldiğinde dökülerek, kitin içeriğindeki HRP konjüge anti-BrdU solüsyonundan 100µl eklenerek 90 dakika inkübe edildi. Süre sonunda kuyular üçer defa yıkanıp 100µl substrat solüsyonu eklendi ve karanlıkta inkübe edildi. Renk değişimi gözlemlendiğinde 25µl stop solüsyonu eklenip ELISA okuyucusunda 450nm dalga boyunda ve 690nm referans dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi.

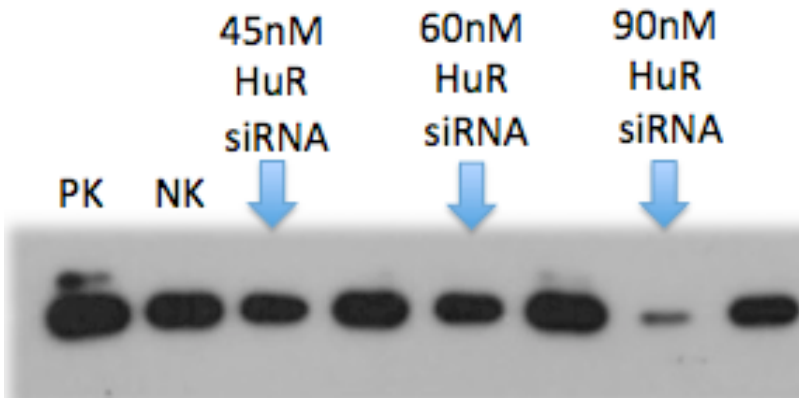
3.12. İstatistiksel Analiz

Western blot filmleri tarayıcı yardımıyla bilgisayara aktarılıp bant yoğunlukları ImageJ programı ile analiz edildi. (İstatistiksel yöntemin ismi?) Tüm grafiklerin çiziminde ve istatistiksel analizlerde GraphPad Prism 6 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1 HuR ve Vps39 siRNA'larının en etkin dozları belirlendi

HeLa ve LNCaP hücreleri 60nM anti-GAPDH siRNA, 60nM negatif kontrol siRNA, 45/60/90 nM anti-HuR ve 45/60/90 nM anti-Vps39 siRNA ile transfekte edilip 72 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücrelerden toplanan lizatlarda gerçekleştirilen Western Blot analizleri sonrasında, her iki hücre hattında da 90 nM HuR ve Vps39 siRNA'ları kullanıldığında, sırasıyla HuR ve Vps39 proteinlerinin ifadelerinin etkin bir şekilde baskılanabildiği gözlemlendi. HeLa hücrelerine ait sonuçlar gösterilmektedir (Şekil 4.1). Tez kapsamında gerçekleştirilen sonraki tüm deneylerde de 90 nM HuR ve Vps39 siRNA dozları kullanıldı.



Şekil 4.1: Etkin siRNA dozunun belirlenmesi. HeLa hücrelerine farklı dozlarda HuR siRNA'sı uygulandıktan sonra en etkin siRNA dozunun belirlenebilmesi için hücre lizatlarında anti-HuR antikoru ile Western Blot yapıldı. NK: Negatif Kontrol (scrambled siRNA). PK: Pozitif Kontrol (anti-GAPDH siRNA).

4.2 Hücre Fraksiyon Kiti ile ayrılan membran fraksiyonunda HuR ve Vps39 proteinleri saptanmadı

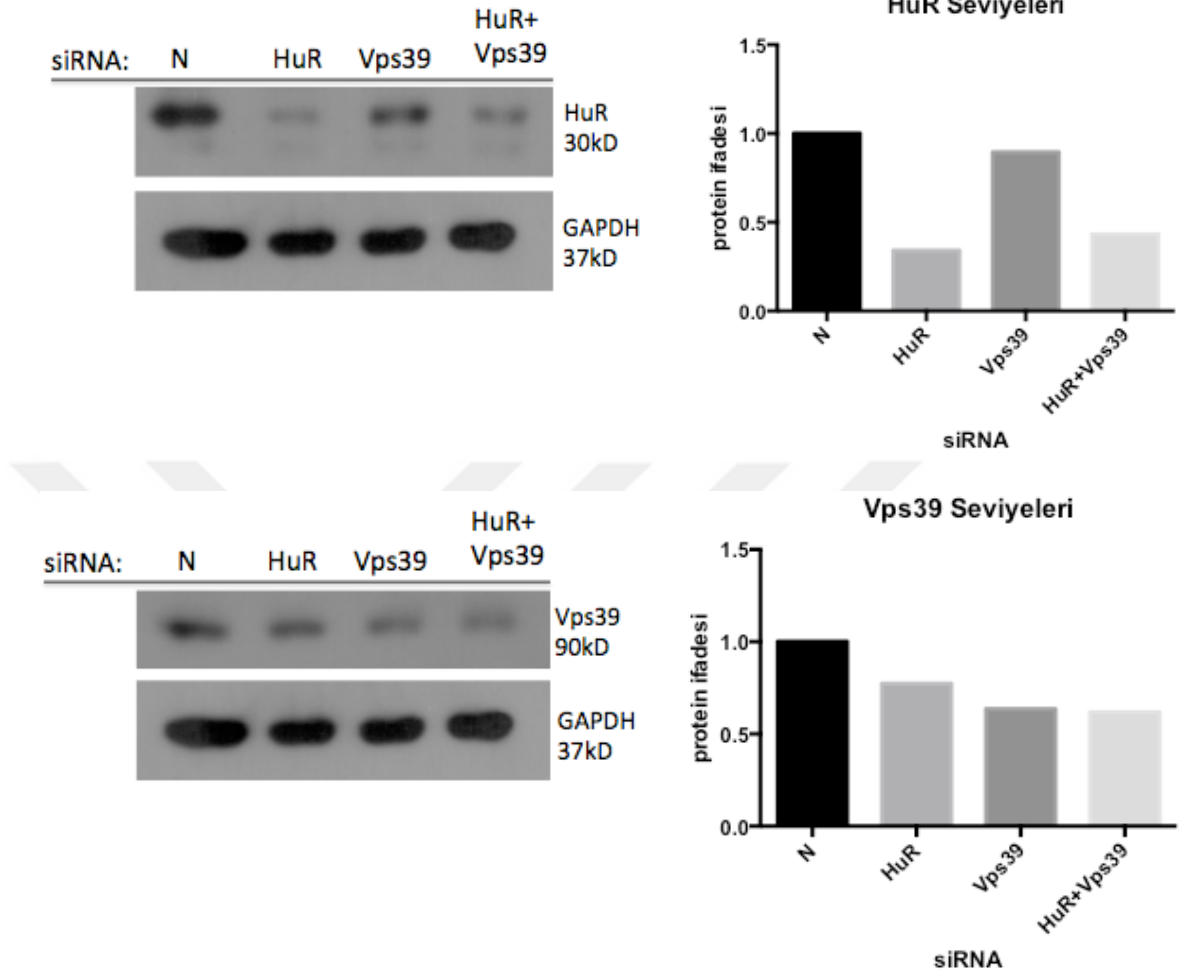
Plazma membran protein izolasyon kiti ile ayrıştırılan HeLa hücre membran fraksiyonlarında anti-HuR ve anti-Vps39 antikoru ile yapılan işaretlemelerin sonucu Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Sitoplazmik proteinler olan HuR ve Vps39'un, hücrelerin membran fraksiyonunda gözlenmemesi kitin iki fazı ayırma konusundaki başarısına işaret etmektedir. Membran fraksiyonlarında, transmembran reseptör olan DR5 ekspresyonu rahatlıkla gösterilebilmiştir (Örneğin Şekil 4.14, 4.16).



Şekil 4.2: Hücre fraksiyonasyon kitinin etkinliğinin test edilmesi. HeLa hücrelerinin kit ile elde edilen plazma membran fraksiyonlarında hücre membranıyla ilişkili olmadığı bilinen HuR ve Vps39 proteinlerini tanıyan antikolarla Western Blot yapıldı.

4.3 LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 siRNA'ları, hedef proteinlerini sitoplazmada farklı oranlarda baskıladı

LNCaP hücrelerinde siRNA transfeksiyonu sonrası kit yardımıyla fraksiyonasyon gerçekleştirildi ve sitoplazmik, nüklear ve membran lizatları olmak üzere üç farklı lizat elde edildi. siRNA transfeksiyonunun etkinliğini belirleyebilmek için sitoplazmik lizatlardan anti-HuR ve anti-Vps39 antikoları ile Western Blot yapıldı. LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 proteinlerinin baskılanma oranları Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



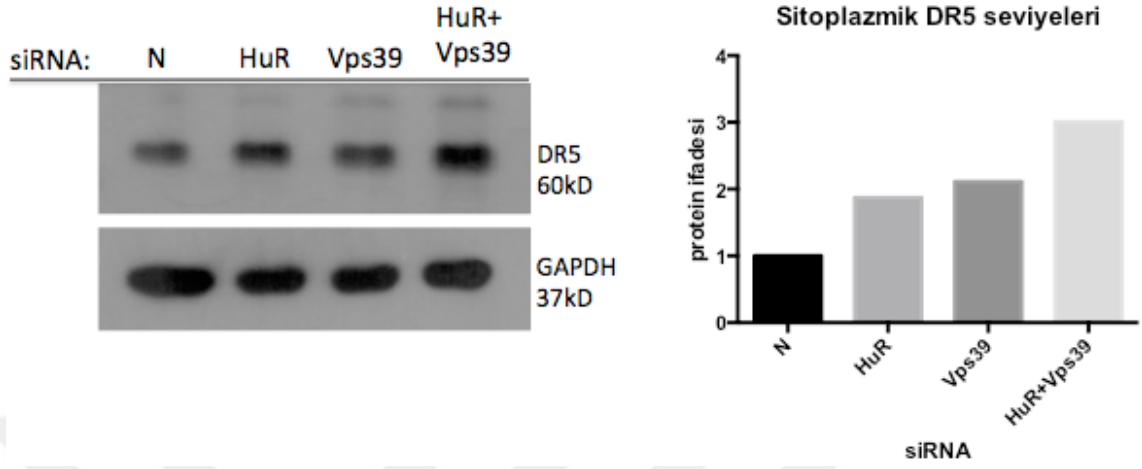
Şekil 4.3: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 seviyeleri. Sitoplazmik lizatlardan anti-HuR ve anti-Vps39 antikorları ile yapılan işaretleme sonrası elde edilen bantlar ImageJ programında analiz edilerek bant yoğunluklarının sayısal değerleri belirlendi. Grafikler bu değerler kullanılarak GraphPad Prism programında çizildi. Grafiklerde negatif kontrol değerleri 1 olarak hesaplanıp diğer değerler buna göre oranlandı. N: Negatif Kontrol siRNA

Şekilde görüldüğü gibi, LNCaP hücrelerinin anti-HuR siRNA ile transfekte edilmesi, sitoplazmik HuR oranlarını yaklaşık %60 oranında baskımlarken, anti-Vps39 siRNA'sı ile transfekte edilmesi, sitoplazmik Vps39 oranlarını yaklaşık %40 oranında baskılamıştır. Bunun yanında, Vps39'un baskılanması, sitoplazmik HuR seviyelerinde çok az bir düşüğe yol açmış, HuR'un baskılanması ise sitoplazmik Vps39 miktarlarını %20 civarında azaltmıştır. HuR ve Vps39 siRNA'nın birlikte uygulanması, hedef protein açısından tek uygulamalardan farklı bir sonuç vermemiştir.

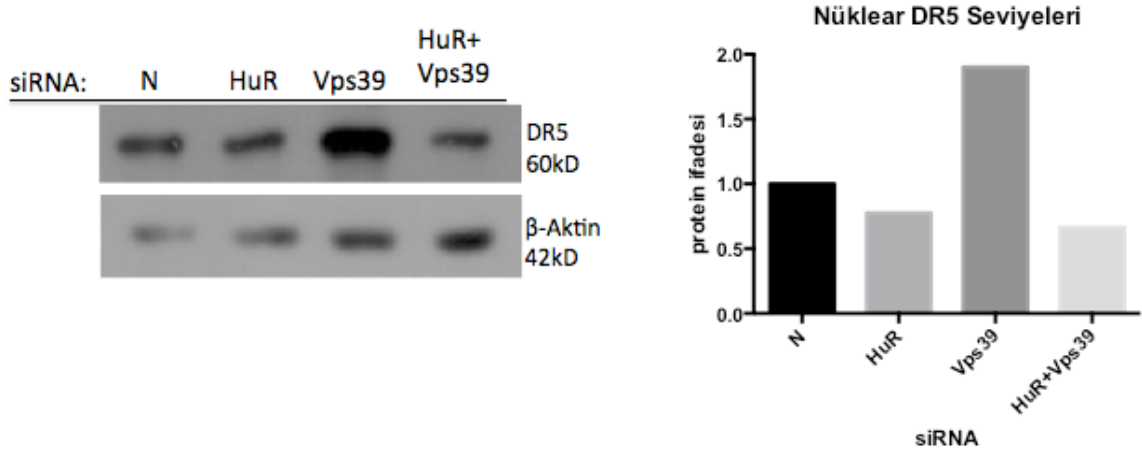
4.4 HuR ve Vps39'un baskılanması, LNCaP hücrelerinde sitoplazmik, nükleer, ve membranda ifade edilen DR5 miktarları üzerinde farklı etki gösterdi.

Proje dahilinde cevap aradığımız sorulardan biri, HuR protein ifadesinin baskılanmasının hücrede DR5 ekspresyon oranlarında farklılığa neden olup olmayacağı idi. Bu amaçla, siRNA transfeksiyonu sonrası elde edilen hücre fraksiyonlarının lizatları SDS-PAGE ile yürütülüp PVDF membrana aktarıldıktan sonra membranlar anti-DR5 antikoru ile işaretlendiler.

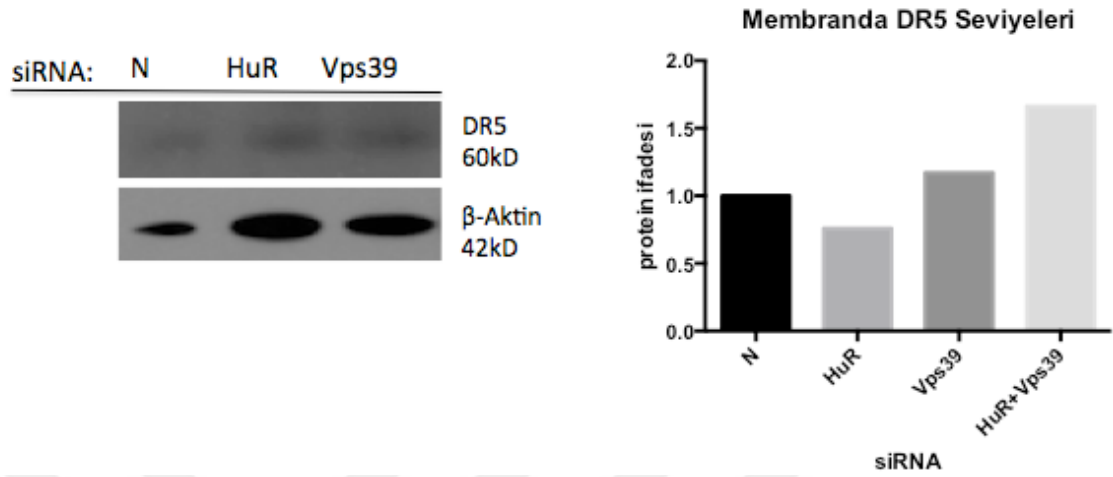
Deneyler sonucunda, hem HuR hem de Vps39'un baskılanması sonucu, sitoplazmadaki DR5 miktarının yaklaşık iki kat arttığı gözlemlendi (Şekil 4.4). İki protein ifadesinin aynı anda baskılanması sonucunda ise DR5'in sitoplazmada normal seviyelerinin üç katına çıktığı görüldü. HuR'un baskılanması, sitoplazmadaki DR5 miktarını artırırken, hücre çekirdeğindeki DR5 miktarını azalttı (Şekil 4.5). Vps39 baskılandığında ise, nükleer DR5 miktarı da artış gösterdi. Sitoplazmadaki en yüksek DR5 ifadesi, HuR ve Vps39'un birlikte baskılanması sonucu elde edildi. Membran proteinleri, hem miktarlarının az olması hem de yüksek oranda hidrofobik bölgeler içermeleri sebebiyle manipülasyonu kolay olmayan proteinlerdir. HuR ve Vps39 ifadelerinin baskılanması sonrası membrandaki DR5 oranlarını belirlemek için uygulanan Western Blot deney sonuçlarına göre, HuR'un baskılanması ile DR5 proteininin hücre membranında ifadesinin düştüğünü, Vps39'un baskılanması sonrasında ise düşük oranda bir artış gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 4.4: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının sitoplazmik DR5 seviyelerine etkisi. Sitoplazmik lizatların yürütülüp transfer edildiği PVDF membranlarda anti-DR5 antikoruna ile işaretleme yapıldı. Yükleme kontrolü olarak membran, strip-off sonrası anti-GAPDH antikoruna ile işaretlendi. Bant yoğunlukları ImageJ ile belirlendi, GAPDH bantları ile normalizasyon yapıldıktan sonra grafikler GraphPad ile çizildi. N: Negatif Kontrol siRNA.

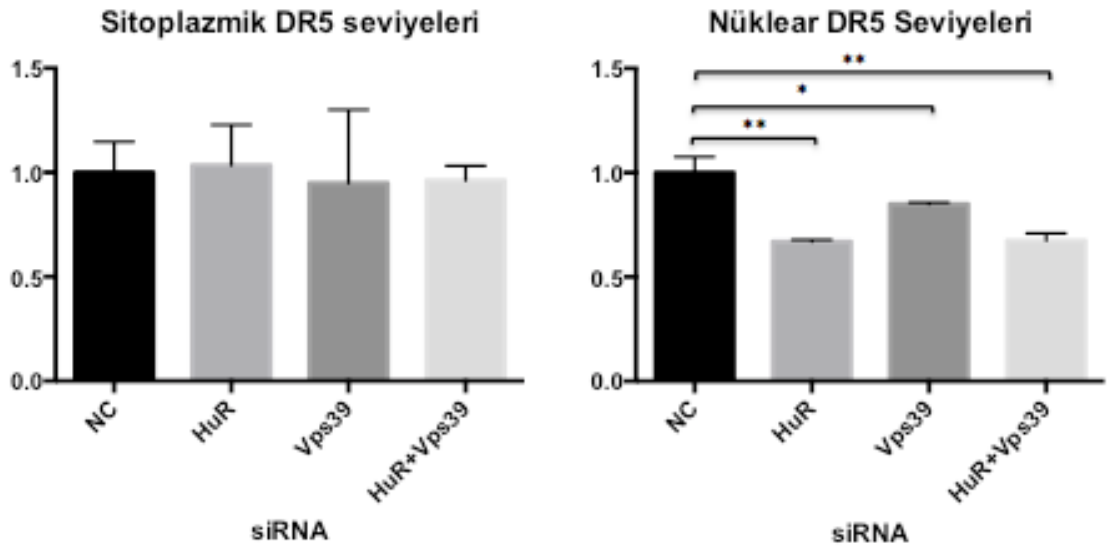


Şekil 4.5: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının nükleer DR5 seviyelerine etkisi. Nüklear lizatların yürütülüp transfer edildiği PVDF membranlarda anti-DR5 antikoruna ile işaretleme yapıldı. Bant yoğunlukları ImageJ ile belirlendi, β -Aktin bantları ile normalizasyon sonrası grafikler GraphPad ile çizildi. N: Negatif Kontrol siRNA.



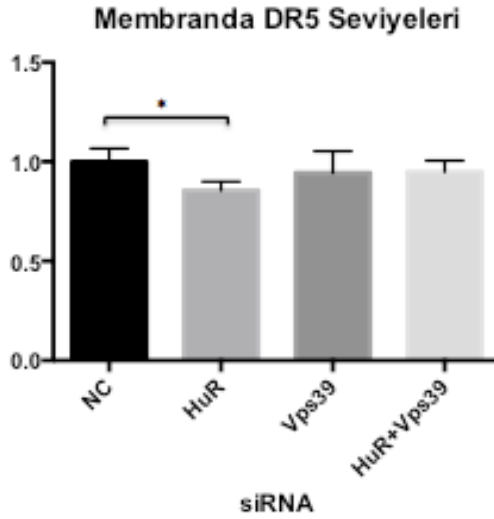
Şekil 4.6: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının membran DR5 seviyelerine etkisi. Plazma membran fraksiyonları SDS-PAGE ile yürütülüp PVDF membrana aktarıldıktan sonra ilk olarak anti-DR5 antikoru ile, daha sonra strip-off işlemini takiben anti-β-Aktin antikoru ile işaretleme yapıldı. Bant yoğunlukları ImageJ ile belirlendi, β-Aktin bantları ile normalizasyon sonrası grafikler GraphPad ile çizildi. N: Negatif Kontrol siRNA.

LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanması sonrası DR5 miktarlarının sitoplazmik, nüklear ve membran fraksiyonlarındaki değişimleri ELISA yöntemiyle de tayin edildi (Şekil 4.7, 4.8).



Şekil 4.7: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının sitoplazmik ve nüklear DR5 seviyelerine etkisinin ELISA ile belirlenmesi. Nüklear ve sitoplazmik lizatlar kit içeriğinde bulunan, anti-DR5 antikoru ile önceden kaplanmış ELISA kuyularına üçer tekrar olacak şekilde yüklendi. Kit prosedürüne uyularak ELISA işlemi gerçekleştirildikten sonra grafik çizimi ve analizler GraphPad Prism programında gerçekleştirildi. NC: Negatif Kontrol siRNA.

Üç tekrarlı ELISA sonuçlarına göre, HuR veya Vps39'un baskılanması, sitoplazmik DR5 miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır (Şekil 4.7). Nükleer DR5 ELISA sonuçlarına göre ise, HuR baskılandığında DR5 miktarında mock siRNA'ya (negatif kontrol) kıyasla anlamlı ($p=0,0017$) bir düşüş gözlenmektedir ve bu sonuç Western Blot sonuçlarıyla uyumludur. Vps39 baskılanması sonucu ise negatif kontrole kıyasla yine anlamlı derecede ($p=0,0268$) düşüş gözlenirse de, bu sonuç Western Blot sonucu ile uyumlu değildir. Her iki genin de susturulduğu durumda ELISA ile Western Blot sonuçları uyumlu olup, DR5 seviyesinde negatif kontrole kıyasla anlamlı oranda ($p=0,0025$) düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.8: LNCaP hücrelerinde membran DR5 seviyelerinin ELISA ile belirlenmesi. Plazma membran fraksiyonlarına ait lizatlar kit içeriğinde bulunan, anti-DR5 antikoruna ile önceden kaplanmış ELISA kuyularına üçer tekrar olacak şekilde yüklendi. Kit prosedürüne uyularak ELISA işlemi gerçekleştirildikten sonra grafik çizimi ve analizler GraphPad Prism programında gerçekleştirildi. ($p=0,036$) NC: Negatif Kontrol siRNA.

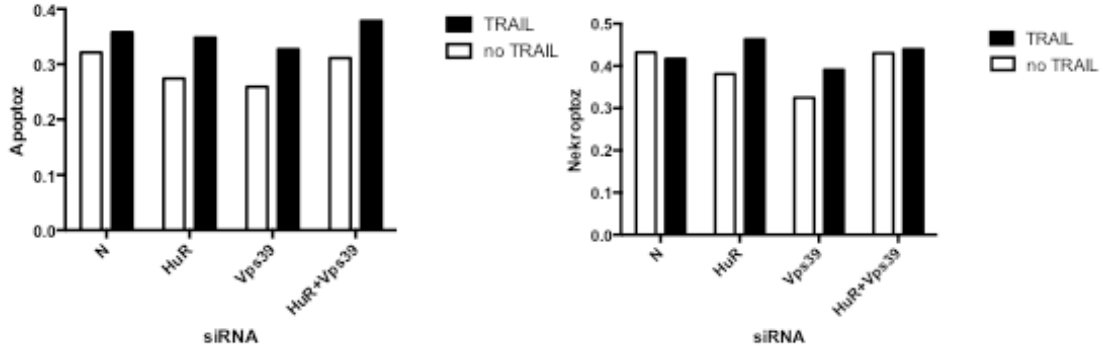
HuR proteininin baskılandığı durumda hücre zarındaki DR5 miktarında ise, Western Blot sonuçları ile uyumlu olarak azalma gözlenmiştir (Şekil 4.8). Gözlenen azalma istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p=0,036$).

4.5 LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39'un baskılanması, TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz oranlarında artışa yol açtı.

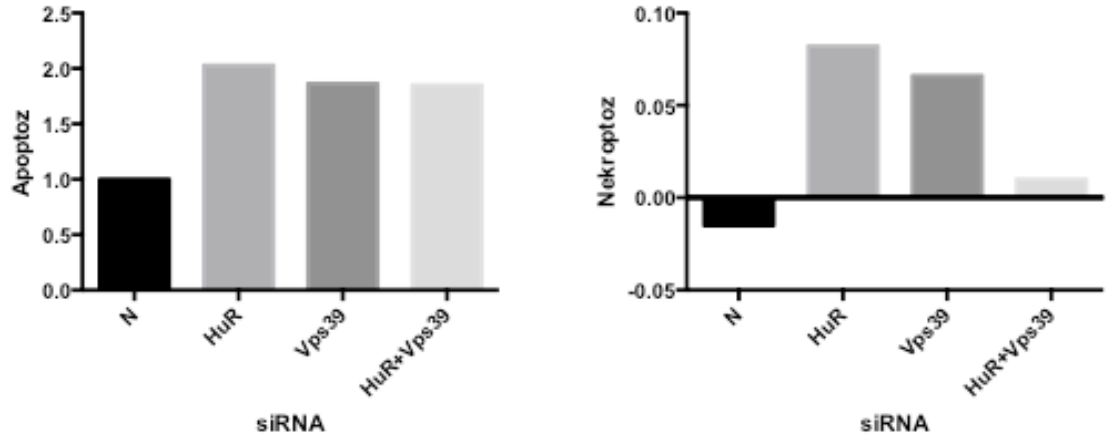
TRAIL'in kanser hücrelerinde hem apoptoz hem de nekroptoz aracılı ölüme sebebiyet verebildiği bilinmektedir (Voigt *ve ark.* 2014). DR5'in her iki ölüm şeklinde de önemli

rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmamızda cevap aradığımız sorulardan biri, HuR ve Vps39 baskılanmasının DR5'in hücre yüzey ifadesini değiştirerek hücrelerde apoptotik ve nekroptotik ölüm oranlarında değişikliğe yol açıp açmayacağıydı.

HuR, Vps39 ve her iki genin birlikte susturulmasının TRAIL aracılı apoptoza ve nekroptoza etkisi, "Cellular DNA Fragmentation ELISA" kiti kullanılarak Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde belirlendi. İki tekrarın ortalaması alınarak elde edilen sonuçlar şekil 4.9'da verilmiştir. Deney sonuçlarına göre, HuR ve Vps39'un ayrı ayrı veya birlikte baskılanması LNCaP hücrelerinde apoptozda artışa sebep olurken, HuR'un ve Vps39'un ayrı ayrı baskılanması sonucunda nekroptozda artış gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, TRAIL muamelesi sonucunda elde edilen apoptoz ve nekroptoz değerlerinden TRAIL ile muamele edilmemiş hücrelerdeki spontan apoptoz ve nekroptoz oranları çıkarılarak da gösterilmiştir (Şekil 4.10).



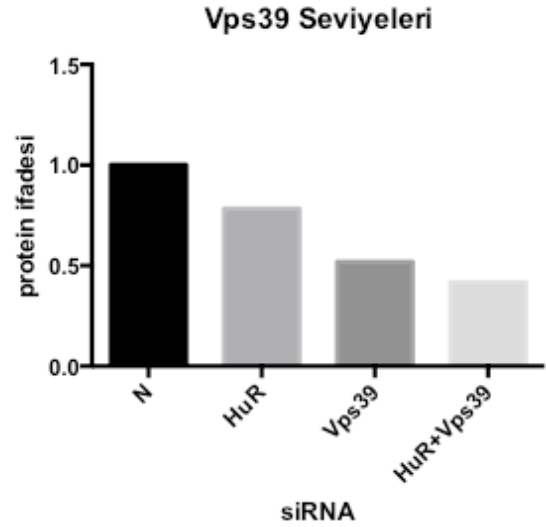
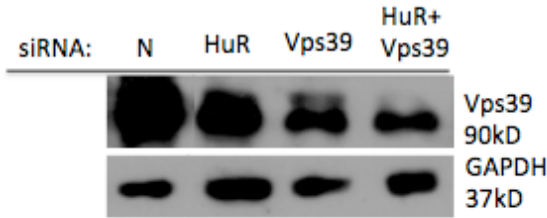
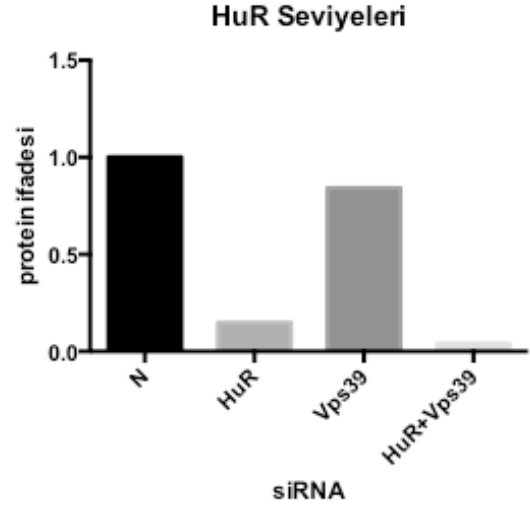
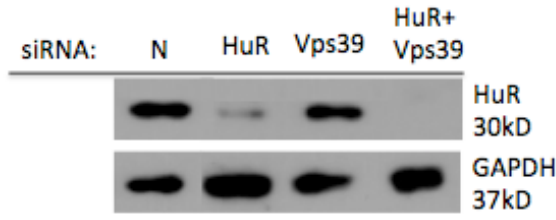
Şekil 4.9: LNCaP hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoza etkisi. BrdU işaretlemesinden sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilen hücreler siRNA ile transfekte edildi. Her siRNA için iki kuyucuk hücre 100nM/ml sTRAIL ile muamele edilirken iki kuyucuk hücreye kontrol olarak TRAIL muamelesi uygulanmadı. Hücre süpernatantları ve lizatları Gereç ve Yöntem kısmında tarif edildiği şekilde toplanarak, örneklerden ELISA işlemiyle hücre ölümü belirlendi. Grafiklerin oluşturulmasında GraphPad Prism programı kullanıldı. N: Negatif Kontrol siRNA.



Şekil 4.10: LNCaP hücrelerinde TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz. Şekil 4.9’da grafiğe dökülmüş sonuçlar kullanılarak, TRAIL muamelesi sonucu elde edilen değerlerden kontrol (TRAIL uygulanmamış) değerlerinin çıkarılması sonucu oluşan grafikler. N: Negatif Kontrol siRNA.

4.6 HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 siRNA’ları, hedef proteinlerini sitoplazmada farklı oranlarda baskıladı.

HeLa hücrelerinde siRNA transfeksiyonu sonrası kit yardımıyla fraksiyonasyon gerçekleştirildi ve sitoplazmik, nüklear ve membran olmak üzere üç farklı lizat elde edildi. siRNA transfeksiyonunun etkinliğini belirleyebilmek için sitoplazmik lizatlar SDS-PAGE ile yürütülüp elektroforezle ayrılan proteinler PVDF membrana aktarıldı. Membranlar anti-HuR ve anti-Vps39 antikoru ile işaretlenerek Western Blot yapıldı. İşaretleme sonuçları filme aktarıldıktan sonra bant yoğunlukları ImageJ programında analiz edildi. Sayısal değerler GraphPad Prism programıyla grafiğe dönüştürüldü. HeLa hücrelerinde sitoplazmik HuR ve Vps39 proteinlerinin baskılanma oranları şekil 4.11’de gösterilmiştir.



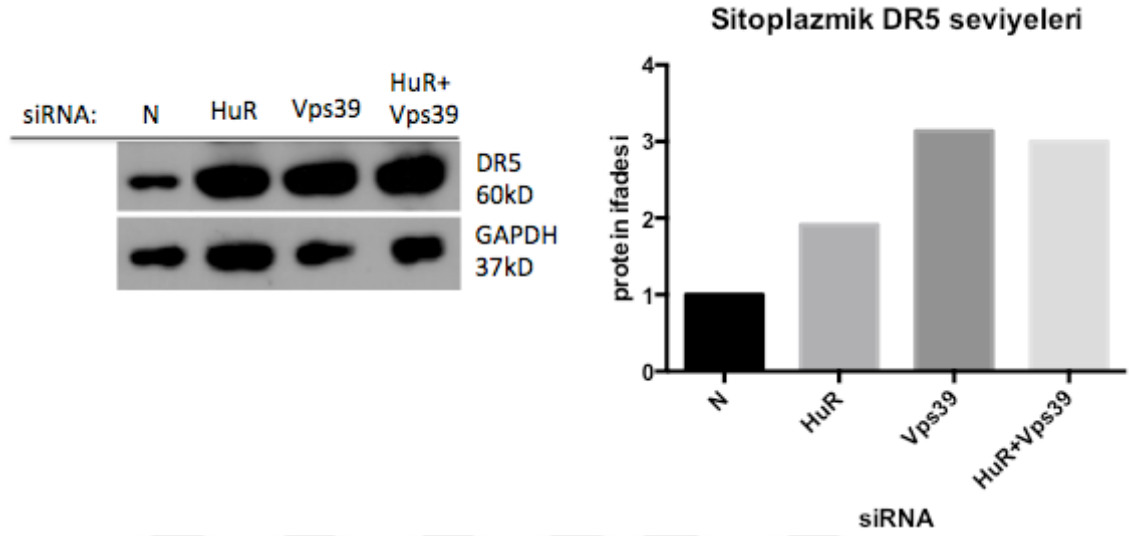
Şekil 4.11: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 seviyeleri. siRNA ile transfekte hücrelerin sitoplazmik lizatlarından SDS-PAGE yürütmesi sonrası örnekler PVDF membrana aktarıldı ve anti-HuR ve anti-Vps39 antikorları ile Western Blot işaretlemesi yapıldı. N: Negatif Kontrol siRNA.

Şekilde görüldüğü gibi, HeLa hücrelerinde anti-HuR siRNA transfeksiyonu sonrası HuR proteini miktarında yaklaşık %90 azalma, anti-Vps39 siRNA transfeksiyonu sonrasında ise yaklaşık %50 azalma gözlemlendi. Sonuçlar LNCaP hücreleriyle de paralellik göstermektedir.

4.7 HuR ve Vps39'un baskılanması, HeLa hücrelerinde sitoplazmik, nükleer, ve membranda ifade edilen DR5 miktarları üzerinde farklı etki gösterdi.

siRNA transfeksiyonu sonrası elde edilen hücre fraksiyonlarının lizatları SDS-PAGE ile yürütülüp PVDF membrana aktarıldıktan sonra membranlar anti-DR5 antikoruna ile

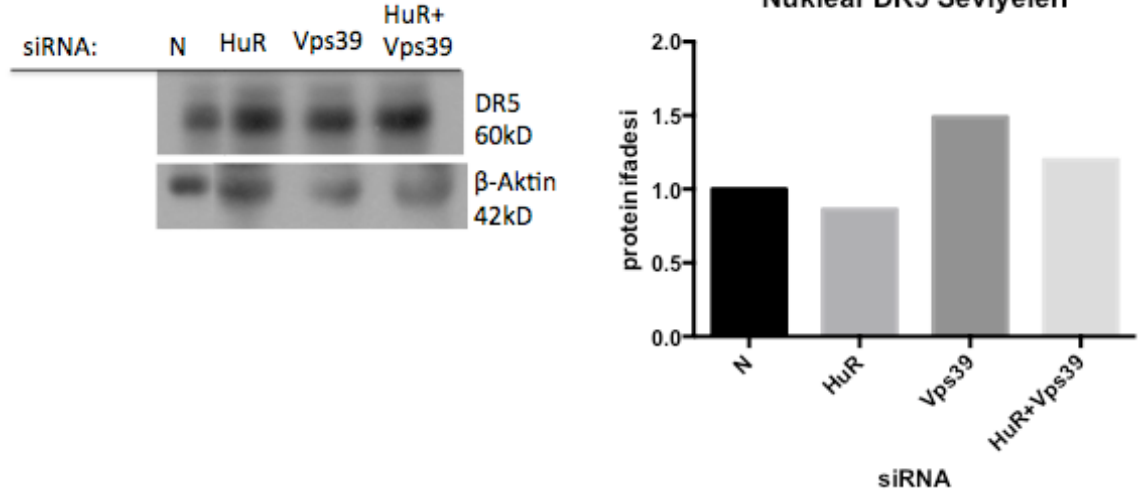
işaretlendi. HuR, Vps39 ve her iki genin birlikte susturulmasının farklı hücresel kompartmanlardaki DR5 ekspresyonlarına etkisi Western Blot yöntemiyle incelendi. Sonuçlar aşağıdaki gibidir:



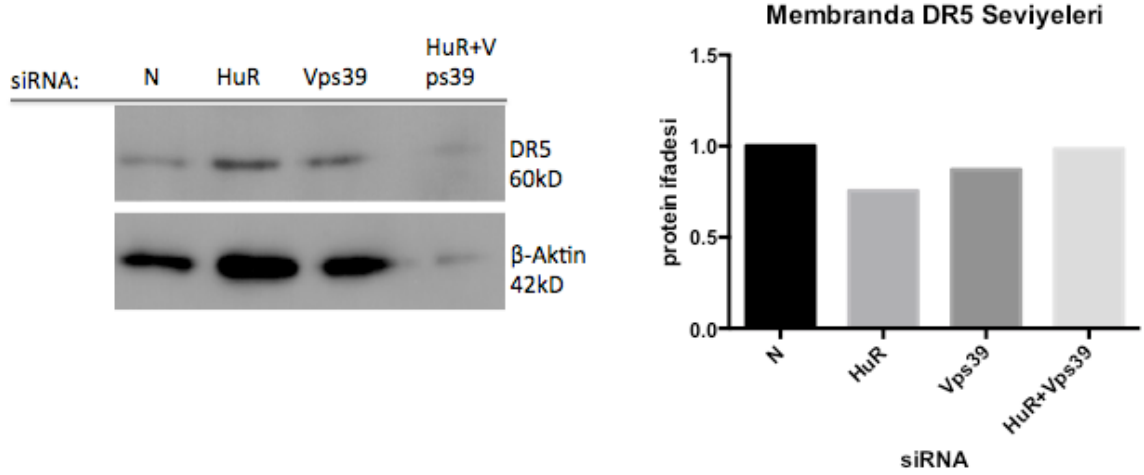
Şekil 4.12: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının sitoplazmik DR5 seviyelerine etkisi. Sitoplazmik lizatların yürütülüp transfer edildiği PVDF membranlarda anti-DR5 antikoruna ile işaretleme yapıldı. Yükleme kontrolü olarak strip-off sonrası anti-GAPDH antikoruna ile işaretlendi. Bant yoğunlukları ImageJ ile belirlendi, GAPDH bantları ile normalizasyon yapıldıktan sonra grafikler GraphPad ile çizildi. N: Negatif Kontrol siRNA.

Anti-HuR siRNA transfeksiyonu sonucu sitoplazmik DR5 ekspresyonu yaklaşık iki katına çıkarken, Vps39'un veya HuR ve Vps39'un birlikte baskılanmasıyla DR5 ifadesi sitoplazmada yaklaşık üç kat arttı (Şekil 4.12). Anti-HuR siRNA transfeksiyonu sonucu HeLa hücrelerindeki nüklear DR5 seviyesi LNCaP hücreleriyle de paralellik göstererek azaldı (Şekil 4.13). Vps39 baskılandığında ise sitoplazmada üç kat artan DR5 ekspresyonu çekirdekte 1,5 kat artış gösterdi. Her iki genin birlikte susturulduğu durumda da, nüklear DR5 ifadesinde artış gözlemlendi.

HeLa hücrelerinin plazma membranındaki DR5 miktarı, LNCaP hücrelerinde olduğu gibi, HuR baskılanması sonucu azaldı (Şekil 4.14). Vps39'un baskılandığı durumda da DR5 ifadesinde daha düşük oranda azalma gözlemlendi.



Şekil 4.13: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının nüklear DR5 seviyelerine etkisi. Nüklear lizatların yürütülüp transfer edildiği PVDF membranlarda anti-DR5 antikoruna ile işaretleme yapıldı. Bant yoğunlukları ImageJ ile belirlendi, β -Aktin bantları ile normalizasyon sonrası grafikler GraphPad ile çizildi. N: Negatif Kontrol siRNA.



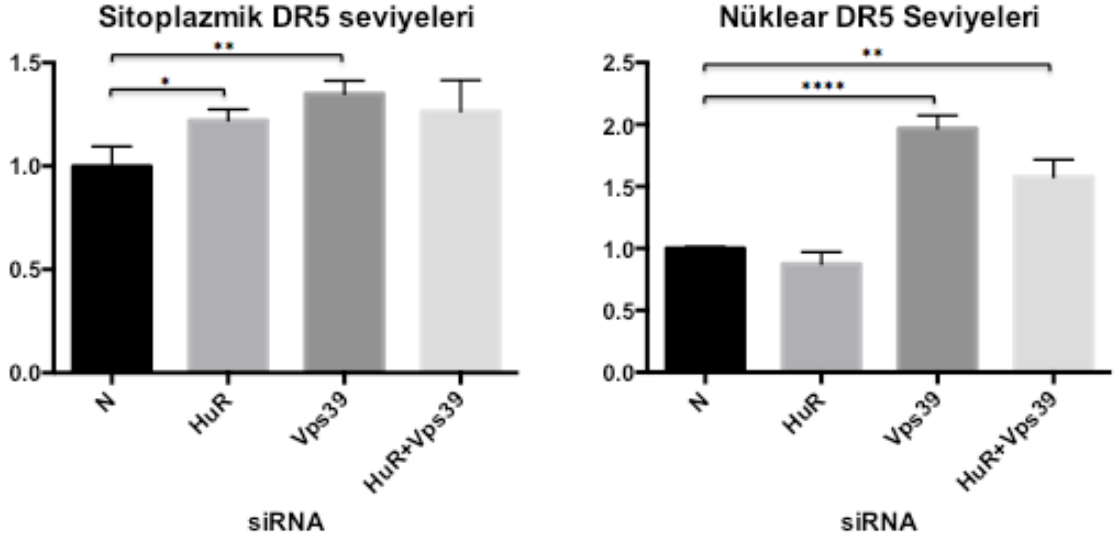
Şekil 4.14: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının membran DR5 seviyelerine etkisi. Plazma membran fraksiyonları SDS-PAGE ile yürütülüp PVDF membrana aktarıldıktan sonra ilk olarak anti-DR5 antikoruna ile, daha sonra strip-off işlemini takiben anti- β -Aktin antikoruna ile işaretleme yapıldı. Bant yoğunlukları ImageJ ile belirlendi, β -Aktin bantları ile normalizasyon sonrası grafikler GraphPad ile çizildi. N: Negatif Kontrol siRNA.

HuR ve Vps39 proteinlerinin susturulması sonrasında hücresel fraksiyonlarda DR5 miktarlarındaki değişiklikler, ELISA yöntemi kullanılarak da belirlendi. Deney sonuçlarına göre, HeLa hücrelerinin sitoplazmasındaki DR5 seviyeleri, HuR proteininin baskılanması sonucu Western Blot sonuçları ile de uyumlu olarak arttı (Şekil 4.15). Söz

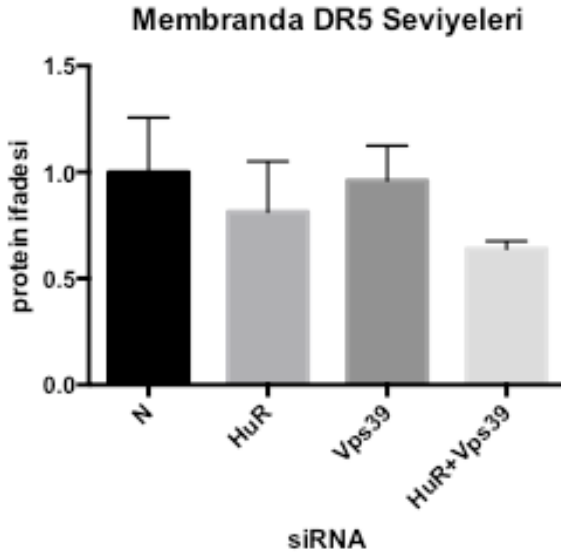
konusu artış Western Blot sonucundaki kadar belirgin olmasa da, istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0255$). Vps39 proteininin baskılanması da, sitoplazmik DR5 miktarında Western Blot sonuçları ile uyumlu olarak artış ile sonuçlandı ($p=0,0061$). Her iki genin susturulduğu durumda ise, Western Blot sonucunun aksine DR5 oranlarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.

ELISA ile ölçülen nüklear DR5 seviyeleri, Western Blot yöntemiyle elde edilen sonuçlarla benzerdi (Şekil 4.15). Anti-HuR siRNA transfeksiyonu sonucu DR5 miktarında düşüş gözlenirse de, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi. Vps39 baskılandığında ise nüklear DR5 ifadesinde yaklaşık iki kat artış gözlemlendi ($p<0,0001$). HuR ve Vps39 proteinlerinin aynı anda baskılanması, çekirdekdeki DR5 seviyesinde 1,5 kat artış ile sonuçlandı ($p=0,0022$).

ELISA yöntemiyle elde edilen hücre membranı DR5 seviyeleri, her iki genin birlikte susturulduğu durum dışında Western Blot sonucuyla uyumlu idi (Şekil 4.16). Anti-HuR siRNA transfeksiyonu sonucu plazma membranındaki DR5 ekspresyonunda negatif kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşüş gözlemlendi. İki proteinin birlikte baskılanması membrandaki DR5 ifadesinde düşüşle sonuçlansa da, fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.



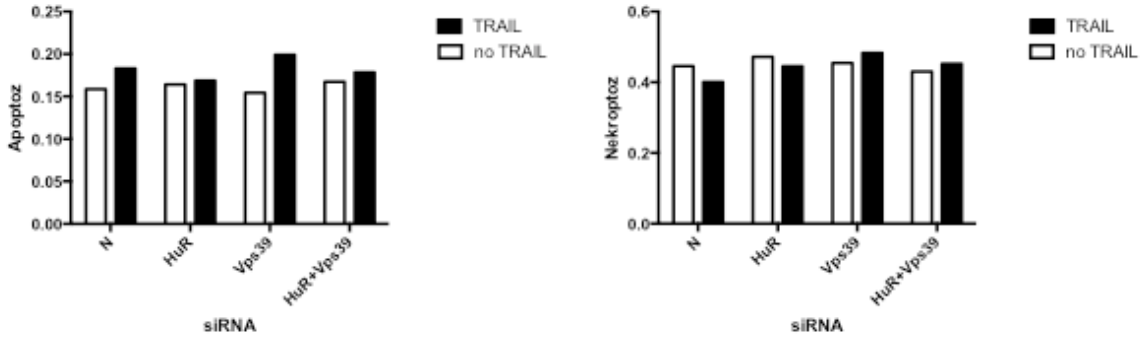
Şekil 4.15: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının sitoplazmik ve nüklear DR5 seviyelerine etkisinin ELISA ile belirlenmesi. Nüklear ve sitoplazmik lizatlar kit içeriğinde bulunan, anti-DR5 antikoruna ile önceden kaplanmış ELISA kuyularına üçer tekrar olacak şekilde yüklendi. Kit prosedürüne uyularak ELISA işlemi gerçekleştirildikten sonra grafik çizimi ve analizler GraphPad Prism programında gerçekleştirildi. N: Negatif Kontrol siRNA



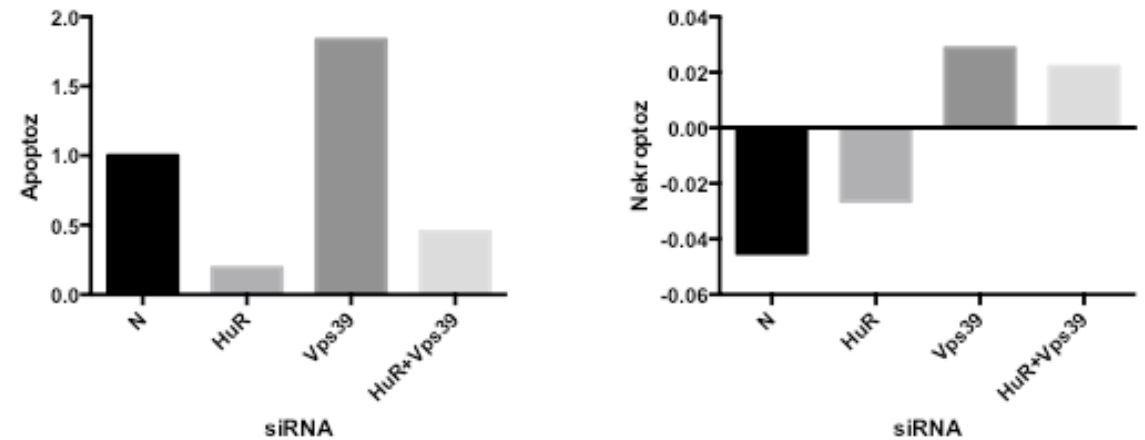
Şekil 4.16: HeLa hücrelerinde membran DR5 seviyelerinin ELISA ile belirlenmesi. Plazma membran fraksiyonlarına ait lizatlar kit içeriğinde bulunan, anti-DR5 antikoruna ile önceden kaplanmış ELISA kuyularına üçer tekrar olacak şekilde yüklendi. Kit prosedürüne uyularak ELISA işlemi gerçekleştirildikten sonra grafik çizimi ve analizler GraphPad Prism programında gerçekleştirildi. N: Negatif Kontrol siRNA.

4.8 HeLa hücrelerinde Vps39'un baskılanması, TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz oranlarında artışla sonuçlandı.

siRNA aracılı yaklaşımlarla HuR ve Vps39 gen ifadelerinin baskılanmasının HeLa hücrelerindeki TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz etkisi, LNCaP hücrelerinde olduğu gibi "Cellular DNA Fragmentation ELISA" kiti kullanılarak Gereç ve Yöntem bölümünde belirtildiği şekilde belirlendi. Şekil 4.17'de verilen grafikler iki tekrarın ortalamasıyla elde edilmiştir. TRAIL muamelesi sonucunda elde edilen apoptoz ve nekroptoz değerlerinden TRAIL ile muamele edilmemiş hücrelerdeki spontan apoptoz ve nekroptoz oranları çıkarıldığında Şekil 4.18'de gösterilen grafikler elde edildi.



Şekil 4.17: HeLa hücrelerinde HuR ve Vps39 baskılanmasının TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz etkisi. BrdU işaretlemesinden sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekilen hücreler siRNA ile transfekte edildi. Her siRNA için iki kuyucuk hücre 100nM/ml sTRAIL ile muamele edilirken iki kuyucuk hücreye kontrol olarak TRAIL muamelesi uygulanmadı. Hücre süpernatantları ve lizatları gereç ve yöntem kısmında tarif edildiği şekilde toplanarak, örneklerden ELISA işlemiyle hücre ölümü belirlendi. Grafiklerin oluşturulmasında GraphPad Prism programı kullanıldı. N: Negatif Kontrol siRNA.



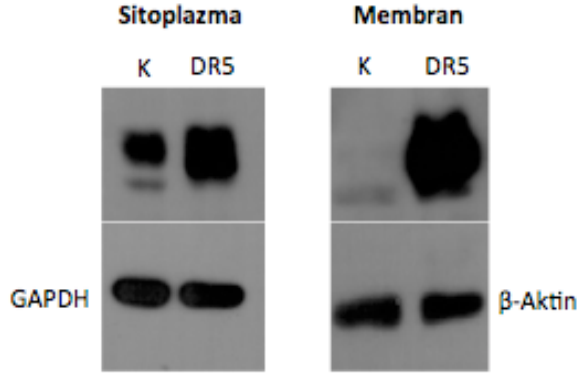
Şekil 4.18: HeLa hücrelerinde TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz. Şekil 4.17’de grafiğe dökülmüş sonuçlar kullanılarak, TRAIL muamelesi sonucu elde edilen değerlerden kontrol (TRAIL uygulanmamış) değerlerinin çıkarılması sonucu oluşan grafikler. N: Negatif Kontrol siRNA.

Deney sonuçlarına göre, HuR proteininin baskılandığı HeLa hücrelerinde TRAIL aracılı apoptoz oranında yaklaşık %90 oranında düşüş gözlemlendi (Şekil 4.18). Vps39’un baskılandığı hücrelerde ise apoptoz oranı, mock siRNA transfekte edilmiş hücrelerin yaklaşık iki katına çıktı. İki genin birlikte susturulduğu hücrelerde ise TRAIL aracılı apoptoz oranında yaklaşık %40 düşüş görüldü.

TRAIL muamelesi sonrasında, HuR siRNA ile transfekte hücrelerde nekroptoz oranı daha düşüktü (Şekil 4.18). Vps39’un susturulduğu hücrelerde TRAIL muamelesi sonucu hem apoptoz hem de nekroptoz oranında artış gözlemlendi. Her iki genin susturulduğu hücrelerde ise apoptoz oranı negatif kontrole kıyasla %50 civarında azalırken, nekroptoz oranında artış gözlemlendi.

4.9 293T hücrelerinde aşırı ekspresyonu gerçekleştirilen ve transkriptinde 3’-UTR bölgesi bulunmayan DR5 proteini hücre yüzeyine çıkmaktadır.

DR5 proteininin 3’-UTR dizisi olmadan da hücre membranına lokalize olup olamayacağını görmek için, sadece kodlayan bölgenin klonlandığı, 3’UTR içermeyen plazmidler ile 293T hücreleri transfekte edildi. Şekil 4.19’da görüldüğü gibi, DR5 proteini 3’-UTR bölgesi olmadan da hücre membranında yoğun olarak eksprese olabilmektedir.



Şekil 4.19: 293T hücrelerinde DR5 aşırı ekspresyonu. DR5 geninin kodlayan bölgesini taşıyan plazmid ile transfekte edilen 293T hücrelerinin sitoplazmik ve membran fraksiyonlarında DR5 ifadesi Western Blot ile incelendi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH ve β -Aktin antikorları ile işaretleme yapıldı. K: Kontrol

5. TARTIŞMA

TRAIL molekülü, keşfedilmesinden kısa bir süre sonra normal hücelere zarar vermeyip kanser hücrelerini öldürebildiğinin anlaşılmasıyla, kanser araştırmalarında ilgi odağı olmuştur (Ashkenazi *ve ark.* 1999, Walczak *ve ark.* 1999). Sonraki çalışmalar, hücre tipine ve hücrenin bulunduğu evreye göre güçlü apoptotik etkisi olabilen bu molekülün, bazı hücrelerde sağkalım ve proliferasyonu da indükleyebildiğini göstermiştir (Harith *ve ark.* 2013). TRAIL, TNF ailesinin diğer üyelerinden farklı özellikler sergiler; insan dokularında yaygın olarak ifade edilir, ve bağlanabildiği beş farklı reseptör vardır. Bu reseptörlerden yalnızca ikisi –TRAILR1 (DR4) ve TRAILR2 (DR5)- apoptotik sinyal iletmeye yeteneğine sahiptir. Bu iki reseptör, yapısal ve fonksiyonel olarak birbirlerine benzese de, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve translasyonel regülasyonları önemli farklılıklar gösterir. DR5'in transkripsiyonel regülasyon mekanizmalarının önemli bir kısmı açığa çıkarılmış olmasına rağmen (Mert ve Sanlioglu 2017), hücre içi lokalizasyon mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. İlginçtir ki, DR5 reseptörünün nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) barındırdığı, ve importin-β1 aracılığıyla çekirdeğe taşınabildiği gösterilmiştir (Kojima *ve ark.* 2011). Çekirdekte ise, Drosha, DGCR8 ve diğer regülatör proteinlerle etkileşime girerek let-7 mikroRNA ailesi üyelerinin olgunlaşmasını engellediği, bunun sonucunda da LIN28B ve HMGA2 gibi let-7 hedefi onkogenlerin ifadesinin arttığı bilinmektedir (Haselmann *ve ark.* 2014). Bu durum, DR5 proteininin hücre içi trafiğinde etkili olan regülasyon mekanizmalarının önemini ortaya koymaktadır. Ancak DR5'in hücre yüzeyine çıkış mekanizması henüz açığa çıkarılamamıştır. Tez projemizde, bu bilimsel problemin yanıtlanmasına katkıda bulunmayı amaçladık.

İleri sürdüğümüz hipotez, DR5'in hücre yüzeyinde ifade edilmesinde DR5 mRNA'sının 3'-UTR bölgesine bağlandığı bilinen HuR proteininin, ve endozomal vezikül transportunda rol alan Vps39 proteininin rol alabileceği yönündeydi. Hipotezimizi test edebilmek için, HeLa ve LNCaP hücre hatlarında HuR ve Vps39 ifadelerinin siRNA yöntemi ile baskılanması sonrasında farklı hücre fraksiyonlarında DR5 ifadesindeki farklılıkları, ve TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz oranlarındaki değişiklikleri belirledik. Projemizde HeLa ve LNCaP hücre hatlarını kullanmamızın sebebi, bu

hücrelerde DR5 transkriptine HuR bağlanmasının (Kandasamy ve Kraft 2008) ve DR5'in membrana lokalizasyonunun SRP bağımsız olarak gerçekleştiğinin (Ren ve ark. 2004) gösterilmiş olması idi. Bu hücrelerde HuR ve Vps39 genlerinin baskılanması için siRNA transfeksiyonu gerçekleştirdik (Şekil 4.3 ve 4.11).

DR5 mRNA'sının 3' UTR bölgesi, 2538 nt uzunluğundadır. Bu, TRAIL'in diğer ölüm reseptörü olan DR4'ün 251 nt'lik 3'UTR bölgesinin yaklaşık 10 katıdır (Şekil 2.5). Apoptoza dirençli primer melanoma hücrelerinde ve TRAIL muamelesi ile seçilmiş dirençli melanoma hücre hatlarında, DR5 mRNA seviyeleri ile protein ekspresyon oranlarının uyumlu olmadığı, mRNA seviyelerinin görece sabit kaldığı durumlarda DR5 translasyonunun baskılanabildiği gözlenmiştir (Zhang ve ark. 2004). Örneğin TRAIL'a dirençli hale getirilen hücre hatlarında dirençli olmayan hücrelere göre DR5 ekspresyonu düşük iken, mRNA seviyelerinde farklılık gözlenmemiştir. Aynı çalışmada, DR5 transkriptinin 3'-UTR dizilerine bağlanan proteinlerin bu regülasyonda etkili olabileceği gösterilmiştir. Listelenen bu proteinler arasında HuR da yer almaktadır (Kandasamy ve Kraft 2008, Yang ve ark. 2015). Vps39 proteininin siRNA ile baskılandığı durumda ise DR5 aracılı apoptoz engellenmektedir (Tablo 2.1) (Ren ve ark. 2004).

HuR bağlanmasının LNCaP hücrelerinde DR5 mRNA'sının ömrünü uzattığı, baskılanmasının ise DR5 mRNA'sının stabilitesini azalttığı bildirilmiştir (Kandasamy ve Kraft 2008). Bu durumun LNCaP hücrelerinde total DR5 seviyelerini nasıl etkilediğini doğrudan gösteren bir çalışma olmasa da, üç pankreas kanseri hücre hattından ikisinde HuR baskılanması sonucu DR5 protein miktarında artış olduğu bildirilmiştir (Pineda ve ark. 2012). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, LNCaP hücrelerinde HuR'un baskılanmasıyla sitoplazmik DR5 seviyesinde artış olduğu Western Blot yöntemiyle gösterildi (Şekil 4.4). Aynı örneklerde uygulanan ELISA yönteminde ise DR5 miktarında artış tespit edilemedi (Şekil 4.7).

Literatürde DR5'in nüklear lokalizasyonuna dair çok az çalışma mevcuttur. Çalışmamızda, LNCaP hücrelerinde HuR baskılandığında sitoplazmada DR5 proteininin oranının arttığı, ancak çekirdekteki miktarında artış olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4 ve 4.5). ELISA sonuçları da aynı doğrultuda idi (Şekil 4.7). HeLa hücrelerinde HuR siRNA

transfeksiyonu yaptığımızda da HuR proteininin etkili biçimde baskılandığı gözlemlendi (Şekil 4.11). Bu durumda da, LNCaP hücrelerinde olduğu gibi sitoplazmik DR5 seviyesinde hem Western Blot yöntemiyle (şekil 4.12), hem de ELISA ile (şekil 4.15) gösterilebilen bir artış gerçekleşti. Sonuçlara göre, sitoplazmada ekspresyonu artan DR5'in, LNCaP hücrelerinde olduğu gibi HeLa hücrelerinde de çekirdeğe gidemediği anlaşılmaktadır (Şekil 4.13 ve 4.15). Yukarıda da belirtildiği gibi, DR5 reseptörü nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) taşımaktadır ve HeLa hücrelerinde importin-β1 aracılığıyla çekirdeğe göç etmektedir (Kojima *ve ark.* 2011). Söz konusu çalışmada importin-β1 baskılanmasının DR5'in hücre yüzey ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir. Buna karşın, sitoplazmada DR5 miktarındaki artışın nükleer DR5 seviyelerine neden yansımadağı sorusu cevaplanmayı beklemektedir. Sitoplazmada DR5 miktarı artarken, çekirdeğe transportu için gerekli importin-β1 moleküllerinin sayısının sabit kalıyor olabileceği düşünülebilir.

HuR proteininin baskılanmasıyla DR5 reseptörünün hücre yüzey ekspresyonunda Western Blot yöntemiyle belirlenen değişimler LNCaP hücreleri için Şekil 4.6'da, HeLa hücreleri için Şekil 4.14'te verilmiştir. Membran proteinlerinin sitoplazmik proteinlere kıyasla yoğun oranda hidrofobik bölgeler içermeleri nedeniyle agregat oluşturma eğiliminde oldukları, bu nedenle çözünürlüklerinin düşük olduğu ve izolasyon ve manipülasyonlarının zor olduğu bilinmektedir. Buna rağmen, Western Blot sonuçlarından anlaşıldığı üzere HuR baskılanması durumunda hücre membranındaki DR5 seviyesi düşmektedir. LNCaP hücrelerinde ELISA sonuçları da bu bulguyu desteklemektedir ($p=0,036$) (Şekil 4.8). HeLa hücrelerinin ELISA sonuçlarında ise membrandaki DR5 ifadesinin istatistiksel anlamlılık bulunmasa da azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.16). Bu bulgular, DR5 reseptörünün hücre yüzeyine çıkış mekanizmasında HuR'un rolünün olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda, LNCaP hücrelerinde HuR'un baskılanması ile membranda ifade edilen DR5 seviyelerinde düşüş gözlemlendi (Şekil 4.6 ve 4.8). DR5, TRAIL'a duyarlı hücrelerde TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptoz gibi ölüm mekanizmalarına aracılık eden güçlü bir ölüm reseptörüdür. Dolayısıyla bu durumda ilk beklenen, bu hücrelerde apoptoz ve nekroptoz oranlarında düşme gözlenmesi olabilir. Ancak sonuçlarımıza göre, HuR'un

baskılanması ile membrandaki DR5 miktarlarında %10-20 dolayında düşüş gözlenmiş olmasına rağmen, apoptoz ve nekroptoz oranları yaklaşık 2 kat artmıştır (Şekil 4.10). DR5, güçlü bir ölüm reseptörü olmasına karşın, bu yöndeki araştırmalar, hücrelerin TRAIL'a duyarlılığını belirleyen iki ana mekanizma olduğunu göstermiştir. Bunların biri hücre yüzeyindeki TRAIL reseptör profilidir. Hücre yüzeyinde ifade edilen DR4 ve DR5 ölüm reseptörlerinin, ve DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerin oranları, TRAIL duyarlılığını belirlemede önemli rol oynar (LeBlanc ve Ashkenazi 2003). DR4 reseptörünün de TRAIL aracılı apoptozda önemli rol üstlendiği ve deneylerimizde ne tür etkiye sahip olduğunun bilinmediği de dikkate alınmalıdır. Hücre yüzeyindeki DcR1 ve DcR2 yalancı reseptör oranlarının yüksek olması da hücrelerde TRAIL'a dirençte katkıda bulunabilmektedir (Aydın *ve ark.* 2007).

Hücre yüzeyindeki reseptör profili yanında, hücre içi antiapoptotik protein oranlarının da hücrelerin TRAIL'a duyarlılığını etkilediği bilinmektedir (Lemke *ve ark.* 2014). HuR proteininin; XIAP, apoptozom inhibitörü protimosin alfa, SIRT1, Bcl-2 gibi anti-apoptotik faktörlerin mRNA'larına bağlanarak ekspresyonlarını düzenlediği ve genel bir anti-apoptotik etki gösterdiği literatürde rapor edilmektedir (Abdelmohsen *ve ark.* 2007, Durie *ve ark.* 2011). Bu durum, HuR baskılanması sonucu TRAIL aracılı apoptozda artış gözlenmesinin muhtemel sebebi olabilir.

HeLa hücrelerinde HuR'un susturulmasının TRAIL aracılı apoptozu ciddi oranda baskıladığı gözlemlendi (Şekil 4.18). HeLa hücrelerinde DR4 yüzey ekspresyonunun ihmal edilebilir düzeyde olduğu bildirilmiştir (Kojima *ve ark.* 2011) (supp. figür). Dolayısıyla, TRAIL aracılı apoptoz sinyalinin bu hücrelerde sadece DR5 reseptörü üzerinden iletildiği varsayılabilir. Sonuçlarımıza göre HeLa hücrelerinde TRAIL muamelesi, hücreleri apoptozu yönlendirmektedir. HuR susturulduğunda ise apoptotik hücre oranları önemli ölçüde azalmaktadır.

Vps39'un baskılanması ile, hem LNCaP hem de HeLa hücrelerinde sitoplazmik ve nükleer DR5 seviyelerinde önemli değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 4.5 ve 4.13). Vps39 siRNA transfeksiyonu sonucunda LNCaP hücrelerinde sitoplazmik DR5 seviyesi kontrole kıyasla iki katına, Vps39'un görece daha iyi baskılandığı HeLa hücrelerinde ise üç katına çıkmaktadır. Vps39 proteininin endozomal veziküllerin lizozomlarla

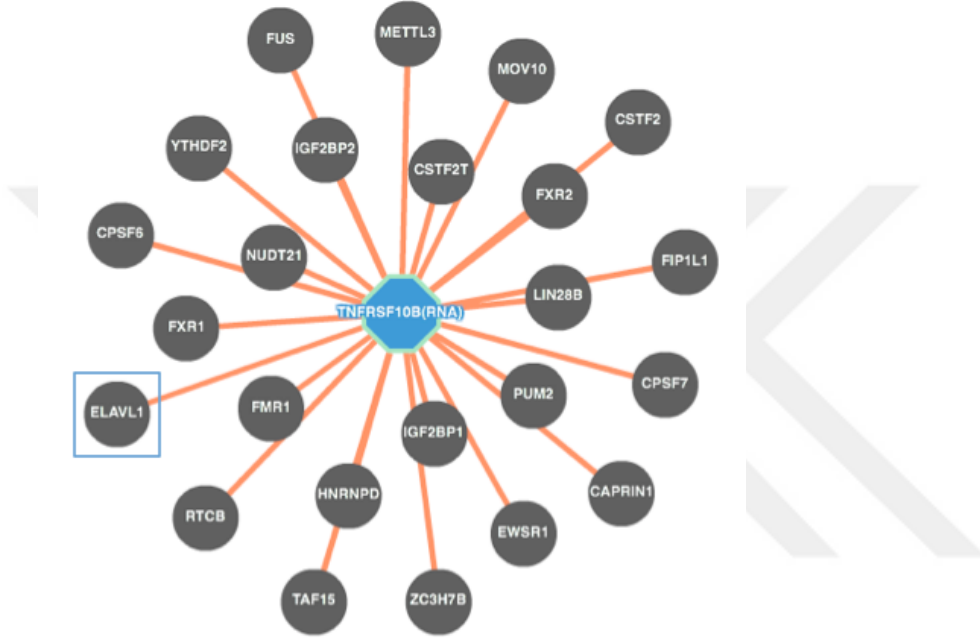
füzyonunda görevli olduğu bilinmektedir (Pols ve ark. 2013). Dolayısıyla Vps39'un susturulması, internalize olan reseptörlerin degradasyonunu engelleyerek sitoplazmik DR5 seviyelerinde artışa yol açıyor olabilir. Western Blot yöntemiyle saptanan söz konusu artış, LNCaP hücrelerinde ELISA ile doğrulanamasa da (Şekil 4.7), HeLa hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0061$) (Şekil 4.15). Sitoplazmik DR5 artışı, HuR'ın baskılandığı durumun tersine, Western Blot bulgularına göre çekirdekteki DR5 seviyelerine de yansımaktadır (Şekil 4.5 ve 4.13). ELISA sonuçları LNCaP hücrelerinde Western Blot sonucuyla çelişse de (Şekil 4.7), HeLa hücrelerinde Western bulgularıyla uyumlu ve istatistiksel olarak oldukça anlamlıdır ($p<0,0001$) (Şekil 4.15). Hem HuR hem de Vps39 susturulduğunda sitoplazmik DR5 seviyesi yükselirken, HuR baskılanması ile çekirdekteki DR5 miktarının artmaması fakat Vps39 baskılandığında artması, projemizin yan sonuçlarından biridir ve bu durumun daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Membran fraksiyonundaki DR5 seviyeleri incelendiğinde, Vps39 baskılanmasının her iki hücre hattında da kontrole kıyasla anlamlı bir değişime neden olmadığı görülmektedir. Western Blot sonuçları ile ELISA verileri bu anlamda birbiriyile uyumludur. DR5 reseptörünün hücre yüzeyine çıkış yolağında Vps39'un rolü olabileceğini düşünmemizin temel nedeni, Vps39 susturulmasının DR5 aracılı apoptozu baskıladığının rapor edilmiş olmasıydı (Tablo 2.1). Ancak projemizin bulguları buna zıtlık göstermektedir. Öyle ki, her iki hücre hattında da Vps39'un baskılanması ile TRAIL aracılı apoptoz ve nekroptozda kontrole kıyasla artış gözlenmektedir (şekil 4.10 ve 4.18). Bu konu henüz çok az çalışılmıştır, ve farklı şartlardaki sonuçlar ileri deneylerle araştırılmalıdır.

Projemizin ana hipotezi, DR5 reseptörünün hücre yüzeyine çıkışının, mRNA'sına bağlanan HuR proteini aracılığıyla etkilenebileceği idi. Bulgularımıza göre, HuR baskılanmasının DR5'in plazma membranına lokalizasyonunu kısmen de olsa engellediği söylenebilir.

Son yıllardaki bulgular, mRNA'ların 3'-UTR uzunluğunun ve bu bölgelere bağlanan faktörlerin protein lokalizasyonunda önemli rol oynadıklarını ortaya koymaktadır. DR5 mRNA'sının oldukça uzun bir 3'-UTR bölgesi vardır. Şekil 5.1'de POSTAR (POST-

transcriptional Regulation coordinated by RNA-binding proteins) veri tabanında yer alan, DR5 mRNA'sına bağlandığı deneysel olarak doğrulanmış proteinler gösterilmektedir.



Şekil 5.1 DR5 transkriptine bağlanan proteinler (ELAVL1=HuR) (Hu ve ark. 2017).

Bu proteinlerden RNA işlenmesinde ve translasyonda görevli olduğu bilinenler dışındakilerin reseptör lokalizasyonunda rol oynayıp oynamadığı araştırılması gereken bir konudur. Projemizde söz konusu proteinlerden sadece bir tanesinin muhtemel rolü araştırılmıştır. Bununla birlikte, DR5'in 3'-UTR dizisinden bağımsız olarak hücre yüzeyine taşıyıcı olabileceğine dair veriler de mevcuttur. Söz konusu ihtimali destekleyen verilerden biri Şekil 4.19'da verilmektedir. Buna göre, DR5 3'-UTR dizisini bulundurmuyan, sadece protein kodlayan cDNA dizisinin klonlandığı plazmidlerle transfekte edilen HEK293T hücrelerinden, projemizde kullanılan fraksiyonasyon kitiyle lizatlar elde edilmiş ve Western Blot yöntemiyle DR5 ekspresyonu belirlenmiştir. HEK293T hücreleri, plazmid transfeksiyon deneyleri için çok uygun bir hücre hattı olup, SV40 large T-antijen içermesinden dolayı transfekte edilen plazmidin güçlü replikasyonuna olanak tanımaktadır.

Proteinlerin ektopik aşırı ekspresyonlarının yanlış hücrel lokalizasyonlarda ifade edilmelerine sebep olabileceğini göz ardı etmemekle birlikte, aşırı ekspresyona zorlanan DR5 reseptörlerinin yoğun biçimde hücre membranında yer aldıkları anlaşılmaktadır. Hücre membranına taşınma yönteminin ise hücreler arasında farklılık göstermesi olasıdır.

Özefagus karsinoma hücreleriyle yapılan bir çalışmada, total DR5 ifadesinin, hücre yüzeyindeki yaklaşık 10 katı olduğu rapor edilmektedir. Aynı çalışmada, adherent özelliğe sahip bu hücrelerin petri yüzeyine tutunmaları engellendiğinde membrandaki DR5 miktarının arttığı, ancak Golgi veziküllerinin trafiğini engelleyen Brefeldin A molekülü ile muamelenin söz konusu artışı engellediği bildirilmektedir (Liu *ve ark.* 2009). 293T hücrelerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada, insan CMV virüsü ile enfekte hücrelerde bu virüse ait UL141 proteininin, DR5 reseptörüyle interaksiyona girip endoplazmik retikulumda (ER) hapsolmesine neden olduğu ve hücre yüzeyine çıkışını engellediği gösterilmiştir (Smith *ve ark.* 2013). Söz konusu çalışmalar, DR5'in hücre yüzeyine çıkışında hücre iskelet proteinlerinin ve ER/Golgi yolağının rolü olduğunu ima etmektedir. Her ne kadar DR5 reseptörünün, DR4'ün aksine SRP (signal recognition particle) aracılı kotranslasyonel translokasyonla lokalize olmadığı açık biçimde gösterilmiş olsa da (Ren *ve ark.* 2004), SRP bağımsız ER translokasyon yolları da tanımlanmıştır (Ast *ve Schuldiner* 2013).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmamızda, DR5'in hücre yüzeyine çıkış mekanizmasında HuR ve Vps39'un olası rolünü araştırdık. Sonuçlarımız, DR5 mRNA'sına bağlanan proteinlerden biri olan HuR proteininin hipotezimizde ileri sürdüğümüz gibi DR5'in yüzey ifadesinde etkili olabileceğini, ancak HuR'un baskılanmasının DR5 yüzey ifadesini beklendiği kadar düşürmediğini gösterdi. Vps39 proteininin ise, DR5'in hücre yüzeyindeki ekspresyonunda direkt etkili olmayabileceği gözlemlendi.

Tez sonuçlarımızın, DR5 reseptörünün hücre yüzeyine çıkış mekanizmasının aydınlatılmasında bir basamak görevi göreceği inancındayız. HuR ve VPs39'un tüm hücre fraksiyonlarında birden fazla siRNA kullanılarak susturulabilmesi/büyük oranda baskılanabilmesi mümkün olabilir. Bu durumun sonuçları nasıl etkileyeceği test edilmelidir. Buna paralel olarak, DR5'in hücre yüzeyine taşınmasında rol alabilecek diğer moleküllerin de farklı hücrelerde çalışılması önemli olacaktır. Hücre membranında ifade edilen proteinlerle çalışma zorlukları dikkate alındığında, Flow Sitometri ile gerçekleştirilecek membran DR5 miktar tayinleri de, gerçekleştirilebilecek ek analizler arasındadır.

KAYNAKLAR

K. Abdelmohsen, A. Lal, H. H. Kim and M. Gorospe (2007). "Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR." *Cell Cycle* 6(11): 1288-1292.

A. Ashkenazi, R. C. Pai, S. Fong, S. Leung, D. A. Lawrence, S. A. Marsters, C. Blackie, L. Chang, A. E. McMurtrey, A. Hebert, L. DeForge, I. L. Koumenis, D. Lewis, L. Harris, J. Bussiere, H. Koeppen, Z. Shahrokh and R. H. Schwall (1999). "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." *J Clin Invest* 104(2): 155-162.

T. Ast and M. Schuldiner (2013). "All roads lead to Rome (but some may be harder to travel): SRP-independent translocation into the endoplasmic reticulum." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48(3): 273-288.

C. Aydin, A. D. Sanlioglu, B. Karacay, G. Ozbilim, L. Dertsiz, O. Ozbudak, C. A. Akdis and S. Sanlioglu (2007). "Decoy receptor-2 small interfering RNA (siRNA) strategy employing three different siRNA constructs in combination defeats adenovirus-transferred tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in lung cancer cells." *Hum Gene Ther* 18(1): 39-50.

P. Aza-Blanc, C. L. Cooper, K. Wagner, S. Batalov, Q. L. Deveraux and M. P. Cooke (2003). "Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening." *Mol Cell* 12(3): 627-637.

A. C. Bellail, L. Qi, P. Mulligan, V. Chhabra and C. Hao (2009). "TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges." *Rev Recent Clin Trials* 4(1): 34-41.

L. L. Belyanskaya, A. Ziogas, S. Hopkins-Donaldson, S. Kurtz, H. U. Simon, R. Stahel and U. Zangemeister-Wittke (2008). "TRAIL-induced survival and proliferation of SCLC cells is mediated by ERK and dependent on TRAIL-R2/DR5 expression in the absence of caspase-8." *Lung Cancer* 60(3): 355-365.

U. Bertsch, C. Roder, H. Kalthoff and A. Trauzold (2014). "Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: emerging role of nuclear TRAIL-R2." *Cell Death Dis* 5: e1390.

L. Bin, J. Thorburn, L. R. Thomas, P. E. Clark, R. Humphreys and A. Thorburn (2007). "Tumor-derived mutations in the TRAIL receptor DR5 inhibit TRAIL signaling through the DR4 receptor by competing for ligand binding." *J Biol Chem* 282(38): 28189-28194.

J. L. Bodmer, N. Holler, S. Reynard, P. Vinciguerra, P. Schneider, P. Juo, J. Blenis and J. Tschopp (2000). "TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8." *Nat Cell Biol* 2(4): 241-243.

J. L. Bodmer, P. Meier, J. Tschopp and P. Schneider (2000). "Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL." *J Biol Chem* 275(27): 20632-20637.

C. M. Brennan and J. A. Steitz (2001). "HuR and mRNA stability." *Cell Mol Life Sci* 58(2): 266-277.

S. Caplan, L. M. Hartnell, R. C. Aguilar, N. Naslavsky and J. S. Bonifacino (2001). "Human Vam6p promotes lysosome clustering and fusion in vivo." *J Cell Biol* 154(1): 109-122.

A. Chalah and R. Khosravi-Far (2008). "The mitochondrial death pathway." *Adv Exp Med Biol* 615: 25-45.

M. K. Choo, N. Kawasaki, P. Singhirunnusorn, K. Koizumi, S. Sato, S. Akira, I. Saiki and H. Sakurai (2006). "Blockade of transforming growth factor-beta-activated kinase 1 activity enhances TRAIL-induced apoptosis through activation of a caspase cascade." *Mol Cancer Ther* 5(12): 2970-2976.

M. A. Degli-Esposti, P. J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C. P. Huang, R. F. DuBose, R. G. Goodwin and C. A. Smith (1997). "Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family." *J Exp Med* 186(7): 1165-1170.

L. S. Dickens, R. S. Boyd, R. Jukes-Jones, M. A. Hughes, G. L. Robinson, L. Fairall, J. W. Schwabe, K. Cain and M. Macfarlane (2012). "A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death." *Mol Cell* 47(2): 291-305.

D. Durie, S. M. Lewis, U. Liwak, M. Kisilewicz, M. Gorospe and M. Holcik (2011). "RNA-binding protein HuR mediates cytoprotection through stimulation of XIAP translation." *Oncogene* 30(12): 1460-1469.

S. Fulda, E. Meyer and K. M. Debatin (2002). "Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression." *Oncogene* 21(15): 2283-2294.

T. M. Ganten, J. Sykora, R. Koschny, E. Batke, S. Aulmann, U. Mansmann, W. Stremmel, H. P. Sinn and H. Walczak (2009). "Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer." *J Mol Med (Berl)* 87(10): 995-1007.

B. Ghoujal, M. P. Milev, L. Ajamian, K. Abel and A. J. Mouland (2012). "ESCRT-II's involvement in HIV-1 genomic RNA trafficking and assembly." *Biol Cell* 104(12): 706-721.

T. S. Griffith and D. H. Lynch (1998). "TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms." *Curr Opin Immunol* 10(5): 559-563.

H. H. Harith, M. J. Morris and M. M. Kavurma (2013). "On the TRAIL of obesity and diabetes." *Trends Endocrinol Metab* 24(11): 578-587.

V. Haselmann, A. Kurz, U. Bertsch, S. Hubner, M. Olempska-Muller, J. Fritsch, R. Hasler, A. Pickl, H. Fritsche, F. Annewanter, C. Engler, B. Fleig, A. Bernt, C. Roder, H. Schmidt, C. Gelhaus, C. Hauser, J. H. Egberts, C. Heneweer, A. M. Rohde, C. Boger, U. Knippschild, C. Rocken, D. Adam, H. Walczak, S. Schutze, O. Janssen, F. G. Wulczyn, H. Wajant, H. Kalthoff and A. Trauzold (2014). "Nuclear death receptor TRAIL-R2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells." *Gastroenterology* 146(1): 278-290.

B. Hu, Y. T. Yang, Y. Huang, Y. Zhu and Z. J. Lu (2017). "POSTAR: a platform for exploring post-transcriptional regulation coordinated by RNA-binding proteins." *Nucleic Acids Res* 45(D1): D104-D114.

Y. Hu, M. A. Benedict, L. Ding and G. Nunez (1999). "Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis." *EMBO J* 18(13): 3586-3595.

K. Huang, J. Zhang, K. L. O'Neill, C. B. Gurumurthy, R. M. Quadros, Y. Tu and X. Luo (2016). "Cleavage by Caspase 8 and Mitochondrial Membrane Association Activate the BH3-only Protein Bid during TRAIL-induced Apoptosis." *J Biol Chem* 291(22): 11843-11851.

U. Irion and D. St Johnston (2007). "bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex." *Nature* 445(7127): 554-558.

Z. Jin, E. R. McDonald, 3rd, D. T. Dickler and W. S. El-Deiry (2004). "Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the

cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis." *J Biol Chem* 279(34): 35829-35839.

K. Kandasamy and A. S. Kraft (2008). "Proteasome inhibitor PS-341 (VELCADE) induces stabilization of the TRAIL receptor DR5 mRNA through the 3'-untranslated region." *Mol Cancer Ther* 7(5): 1091-1100.

M. M. Kavurma, M. Schoppet, Y. V. Bobryshev, L. M. Khachigian and M. R. Bennett (2008). "TRAIL stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappaB and induction of insulin-like growth factor-1 receptor." *J Biol Chem* 283(12): 7754-7762.

F. C. Kischkel, D. A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K. J. Kim and A. Ashkenazi (2000). "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." *Immunity* 12(6): 611-620.

Y. Kojima, M. Nakayama, T. Nishina, H. Nakano, M. Koyanagi, K. Takeda, K. Okumura and H. Yagita (2011). "Importin beta1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells." *J Biol Chem* 286(50): 43383-43393.

H. N. LeBlanc and A. Ashkenazi (2003). "Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors." *Cell Death Differ* 10(1): 66-75.

M. W. Lee, S. C. Park, Y. G. Yang, S. O. Yim, H. S. Chae, J. H. Bach, H. J. Lee, K. Y. Kim, W. B. Lee and S. S. Kim (2002). "The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis." *FEBS Lett* 512(1-3): 313-318.

K. Leithner, E. Stacher, R. Wurm, F. Ploner, F. Quehenberger, C. Wohlkoenig, Z. Balint, J. Polachova, A. Olschewski, H. Samonigg, H. H. Popper and H. Olschewski

(2009). "Nuclear and cytoplasmic death receptor 5 as prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy." *Lung Cancer* 65(1): 98-104.

J. Lemke, S. von Karstedt, J. Zinngrebe and H. Walczak (2014). "Getting TRAIL back on track for cancer therapy." *Cell Death Differ* 21(9): 1350-1364.

P. Li, S. Jayarama, L. Ganesh, D. Mordi, R. Carr, P. Kanteti, N. Hay and B. S. Prabhakar (2010). "Akt-phosphorylated mitogen-activated kinase-activating death domain protein (MADD) inhibits TRAIL-induced apoptosis by blocking Fas-associated death domain (FADD) association with death receptor 4." *J Biol Chem* 285(29): 22713-22722.

G. C. Liu, J. Zhang, S. G. Liu, R. Gao, Z. F. Long, K. Tao and Y. F. Ma (2009). "Detachment of esophageal carcinoma cells from extracellular matrix causes relocalization of death receptor 5 and apoptosis." *World J Gastroenterol* 15(7): 836-844.

S. A. Marsters, J. P. Sheridan, R. M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A. D. Goddard, P. Godowski and A. Ashkenazi (1997). "A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain." *Curr Biol* 7(12): 1003-1006.

U. Mert and A. D. Sanlioglu (2017). "Intracellular localization of DR5 and related regulatory pathways as a mechanism of resistance to TRAIL in cancer." *Cell Mol Life Sci* 74(2): 245-255.

F. Muhlenbeck, E. Haas, R. Schwenzer, G. Schubert, M. Grell, C. Smith, P. Scheurich and H. Wajant (1998). "TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways." *J Biol Chem* 273(49): 33091-33098.

G. Pan, K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni and V. M. Dixit (1997). "The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." *Science* 276(5309): 111-113.

B. Pennarun, A. Meijer, E. G. de Vries, J. H. Kleibeuker, F. Kruyt and S. de Jong (2010). "Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer." *Biochim Biophys Acta* 1805(2): 123-140.

D. M. Pineda, D. W. Rittenhouse, C. C. Valley, J. A. Cozzitorto, R. A. Burkhart, B. Leiby, J. M. Winter, M. C. Weber, E. R. Londin, I. Rigoutsos, C. J. Yeo, M. Gorospe, A. K. Witkiewicz, J. N. Sachs and J. R. Brody (2012). "HuR's post-transcriptional regulation of Death Receptor 5 in pancreatic cancer cells." *Cancer Biol Ther* 13(10): 946-955.

R. M. Pitti, S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore and A. Ashkenazi (1996). "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." *J Biol Chem* 271(22): 12687-12690.

M. S. Pols, C. ten Brink, P. Gosavi, V. Oorschot and J. Klumperman (2013). "The HOPS proteins hVps41 and hVps39 are required for homotypic and heterotypic late endosome fusion." *Traffic* 14(2): 219-232.

Y. G. Ren, K. W. Wagner, D. A. Knee, P. Aza-Blanc, M. Nasoff and Q. L. Deveraux (2004). "Differential regulation of the TRAIL death receptors DR4 and DR5 by the signal recognition particle." *Mol Biol Cell* 15(11): 5064-5074.

W. Roth and J. C. Reed (2004). "FLIP protein and TRAIL-induced apoptosis." *Vitam Horm* 67: 189-206.

A. R. Safa (2012). "c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator." *Exp Oncol* 34(3): 176-184.

A. D. Sanlioglu, I. T. Koksall, A. Ciftcioglu, M. Baykara, G. Luleci and S. Sanlioglu (2007). "Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues." *J Urol* 177(1): 359-364.

M. B. Schabath, A. R. Giuliano, Z. J. Thompson, E. K. Amankwah, J. E. Gray, D. A. Fenstermacher, K. A. Jonathan, A. A. Beg and E. B. Haura (2013). "TNFRSF10B polymorphisms and haplotypes associated with increased risk of death in non-small cell lung cancer." *Carcinogenesis* 34(11): 2525-2530.

A. D. Schimmer (2004). "Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice." *Cancer Res* 64(20): 7183-7190.

P. Schneider, M. Thome, K. Burns, J. L. Bodmer, K. Hofmann, T. Kataoka, N. Holler and J. Tschopp (1997). "TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB." *Immunity* 7(6): 831-836.

P. Secchiero, A. Gonelli, E. Carnevale, D. Milani, A. Pandolfi, D. Zella and G. Zauli (2003). "TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways." *Circulation* 107(17): 2250-2256.

J. P. Sheridan, S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski and A. Ashkenazi (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." *Science* 277(5327): 818-821.

C. A. Smith, T. Farrah and R. G. Goodwin (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." *Cell* 76(6): 959-962.

W. Smith, P. Tomasec, R. Aicheler, A. Loewendorf, I. Nemcovicova, E. C. Wang, R. J. Stanton, M. Macauley, P. Norris, L. Willen, E. Ruckova, A. Nomoto, P. Schneider, G. Hahn, D. M. Zajonc, C. F. Ware, G. W. Wilkinson and C. A. Benedict (2013). "Human cytomegalovirus glycoprotein UL141 targets the TRAIL death receptors to thwart host innate antiviral defenses." *Cell Host Microbe* 13(3): 324-335.

J. H. Song, M. C. Tse, A. Bellail, S. Phuphanich, F. Khuri, N. M. Kneteman and C. Hao (2007). "Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells." *Cancer Res* 67(14): 6946-6955.

J. J. Song, J. H. Kim, B. K. Sun, M. A. Alcala, Jr., D. L. Bartlett and Y. J. Lee (2010). "c-Cbl acts as a mediator of Src-induced activation of the PI3K-Akt signal transduction pathway during TRAIL treatment." *Cell Signal* 22(3): 377-385.

D. C. Spierings, E. G. de Vries, W. Timens, H. J. Groen, H. M. Boezen and S. de Jong (2003). "Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors." *Clin Cancer Res* 9(9): 3397-3405.

M. Sun, L. Song, Y. Li, T. Zhou and R. S. Jope (2008). "Identification of an antiapoptotic protein complex at death receptors." *Cell Death Differ* 15(12): 1887-1900.

B. G. Tholanikunnel, K. Joseph, K. Kandasamy, A. Baldys, J. R. Raymond, L. M. Luttrell, P. J. McDermott and D. J. Fernandes (2010). "Novel mechanisms in the regulation of G protein-coupled receptor trafficking to the plasma membrane." *J Biol Chem* 285(44): 33816-33825.

A. Trauzold, H. Wermann, A. Arlt, S. Schutze, H. Schafer, S. Oestern, C. Roder, H. Ungefroren, E. Lampe, M. Heinrich, H. Walczak and H. Kalthoff (2001). "CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells." *Oncogene* 20(31): 4258-4269.

P. J. Uren, S. C. Burns, J. Ruan, K. K. Singh, A. D. Smith and L. O. Penalva (2011). "Genomic analyses of the RNA-binding protein Hu antigen R (HuR) identify a complex network of target genes and novel characteristics of its binding sites." *J Biol Chem* 286(43): 37063-37066.

A. M. van der Sloot, V. Tur, E. Szegezdi, M. M. Mullally, R. H. Cool, A. Samali, L. Serrano and W. J. Quax (2006). "Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23): 8634-8639.

E. Varfolomeev, H. Maecker, D. Sharp, D. Lawrence, M. Renz, D. Vucic and A. Ashkenazi (2005). "Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." *J Biol Chem* 280(49): 40599-40608.

U. Vilimanovich and V. Bumbasirevic (2008). "TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2." *Cell Mol Life Sci* 65(5): 814-826.

S. Voigt, S. Philipp, P. Davarnia, S. Winoto-Morbach, C. Roder, C. Arenz, A. Trauzold, D. Kabelitz, S. Schutze, H. Kalthoff and D. Adam (2014). "TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells." *BMC Cancer* 14: 74.

H. Wajant, D. Moosmayer, T. Wuest, T. Bartke, E. Gerlach, U. Schonherr, N. Peters, P. Scheurich and K. Pfizenmaier (2001). "Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative." *Oncogene* 20(30): 4101-4106.

H. Walczak and T. L. Haas (2008). "Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex." *Methods Mol Biol* 414: 221-239.

H. Walczak, R. E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R. G. Goodwin, C. T. Rauch, J. C.

Schuh and D. H. Lynch (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nat Med* 5(2): 157-163.

S. Wang and W. S. El-Deiry (2003). "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors." *Oncogene* 22(53): 8628-8633.

C. B. Weldon, A. P. Parker, D. Patten, S. Elliott, Y. Tang, D. E. Frigo, C. M. Dugan, E. L. Coakley, N. N. Butler, J. L. Clayton, J. Alam, T. J. Curiel, B. S. Beckman, B. M. Jaffe and M. E. Burow (2004). "Sensitization of apoptotically-resistant breast carcinoma cells to TNF and TRAIL by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling." *Int J Oncol* 24(6): 1473-1480.

S. R. Wiley, K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith and et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." *Immunity* 3(6): 673-682.

Y. C. Yang, C. Di, B. Hu, M. Zhou, Y. Liu, N. Song, Y. Li, J. Umetsu and Z. J. Lu (2015). "CLIPdb: a CLIP-seq database for protein-RNA interactions." *BMC Genomics* 16: 51.

G. Zauli, S. Sancilio, A. Cataldi, N. Sabatini, D. Bosco and R. Di Pietro (2005). "PI-3K/Akt and NF-kappaB/IkappaBalpha pathways are activated in Jurkat T cells in response to TRAIL treatment." *J Cell Physiol* 202(3): 900-911.

X. D. Zhang, A. V. Franco, T. Nguyen, C. P. Gray and P. Hersey (2000). "Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells." *J Immunol* 164(8): 3961-3970.

X. Y. Zhang, X. D. Zhang, J. M. Borrow, T. Nguyen and P. Hersey (2004). "Translational control of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptor expression in melanoma cells." *J Biol Chem* 279(11): 10606-10614.

Y. Zhang and B. Zhang (2008). "TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5." *Mol Cancer Res* 6(12): 1861-1871.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ufuk	Uyruğu	T.C.
Soyadı	Mert	Tel no	05063001813
Doğum tarihi	03/12/1984	e-posta	ufukmrt@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	İzmir Buca Anadolu Lisesi	2003
Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	İstanbul Üniversitesi	2012

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	93,75/100

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Tip 2 Diyabet'te TRAIL Molekülünün Fonksiyonel Rolünün Araştırılması ve TRAIL Kodlayan Lentiviral Vektörlerin Terapötik Etkinliklerinin Belirlenmesi	TÜBİTAK	2013-2016

Burslar-Ödüller:

- TÜBİTAK Proje Bursiyeri
- En İyi Sözlü Bildiri İkincilik Ödülü (53. Ulusal Diyabet Kongresi, 2017).

Yayınlar ve Bildiriler:

Yayınlar:

- **Mert U**, Sanlioglu AD. Intracellular localization of DR5 and related regulatory pathways as a mechanism of resistance to TRAIL in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2017 Jan;74(2):245-255.
- **Mert U**, Özgür E, Tiryakioğlu D, Dalay N and Gezer U (2012). Induction of p53-inducible microRNA miR-34 by gamma radiation and bleomycin are different. *Front. Gene.* 3:220. doi: 10.3389/fgene.2012.00220.
- Özgür E, **Mert U**, Isin M, Okutan M, Dalay N, Gezer U. Differential expression of long non-coding RNAs during genotoxic stress-induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells. *Clin Exp Med.* 2013 May;13(2):119-26.
- Gezer U, **Mert U**, Özgür E, Yörükler E, Holdenrieder S, Dalay N. Correlation of histone methyl marks with circulating nucleosomes in blood plasma of cancer patients. *Oncology Letters* 2012; 5: 1095-1098.
- Yoruker EE, Buğra D, **Mert U**, Dalay N. Promoter and histone methylation and p16INK4A gene expression in colon cancer. *Exp Ther Med.* 2012 Nov;4(5):865-870. Epub 2012 Aug 24.

Bildiriler:

1. Özlem Yılmaz, **Ufuk Mert.**, Hasan Ali Altunbaş, Asef Moballegh, Ahter D Şanlıoğlu. *Lentiviral Vektör Aracılı TRAIL ve Çözülebilir TRAIL'in Birlikte*

Uygulanması, C57BL6 Farelerde Obezite ve Tip2 Diyabet ile İlişkili Bulguları Hafifletici Etki Gösterdi 53. Ulusal Diyabet Kongresi, 2017 **Sözlü Bildiri** (En iyi sözlü bildiri ikincilik ödülü)

2. O Yılmaz U **Mert** H A Altunbas A Moballeghe A D Sanlioglu *Lentiviral vector-mediated TRAIL transfer together with sTRAIL application improved obesity and type 2 diabetes-related abnormalities in C57BL6 mice.* ESGCT 2016 **Poster Bildirisi**
3. Ertesun MG, Hapil FZ., **Mert U**, Ozes ON. *E2F1 transcription factor is post-translationally regulated by Protein Kinase A (PKA)* 41st FEBS Congress, 2016 **Sözlü Bildiri**
4. **Mert Ufuk**, Yılmaz Özlem, Altunbaş Hasan Ali, Şanlıoğlu Ahter Dilşad *C57BL6 Farelerde Tip 2 Diyabet Oluşturmak için Etkin Bir Yöntem.* 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 2015 **Sözlü Bildiri**
5. **Mert Ufuk**, Üstek Duran, Özgür Emre, Işın Mustafa, Dalay Nejat, Gezer Uğur *Kan Plazmasında H3K9me3 ve H4K20me3 İlişkili Nükleozomal DNA'nın Yen Nesil Dizileme Yöntemiyle Karakterizasyonu.* 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 2011 **Sözlü Bildiri**
6. Özgür E, **Mert U**, Isin M, Okutan M, Dalay N, Gezer U. *Genotoksik stres ilişkili apoptozda kodlanmayan RNA analizi.* 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 2011 **Sözlü Bildiri**
7. Dağoğlu N, Ağaoğlu F, Kovancılar M, Deligezer U, **Mert U**, Dizdar Y, Sakallıoğlu B, Karaman Ş, Darendeliler E. *Prostat Kanseri Hücre Soyunda Androjen Baskılanmasının Farklı Radyoterapi Dozlarında Radyoduyarlayıcı Etkisi: DNA Metilasyon Analizi.* 19. Ulusal Kanser Kongresi 2011 **Sözlü Bildiri**
8. Gezer U, **Mert U**, Yörüker E, Dalay N. *Kan Dolaşımında Histon Modifikasyonların Nükleozomlarla Korelasyonu.* 19. Ulusal Kanser Kongresi 2011 **Sözlü Bildiri**