



**KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNİN ANTI-TÜMÖR İMMÜN
YANITLARINA DUYARLILIĞININ ARTTIRILMASI**

ESRA YILMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

DR. ÖĞRETİM ÜYESİ ERCAN ÇAÇAN

Ağustos - 2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMAN PAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNİN ANTI-TÜMÖR İMMÜN YANITLARINA
DUYARLILIĞININ ARTTIRILMASI

ESRA YILMAZ

TOKAT
Ağustos- 2019

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2019/15 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Esra YILMAZ tarafından hazırlanan “Kolorektal Kanser Hücrelerinin Anti-Tümör İmmün Yanıtlarına Duyarlılığının Arttırılması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 02/08/2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Ercan ÇAÇAN

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Şenol ÇİTLİ

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Dursun KISA

Bartın Üniversitesi

E. Çakan
S. Çitli
D. Kisa

ONAY

Prof. Dr. Cevat ÇEKİCİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

06.08.2019

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdđiđi yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

ESRA YILMAZ
2 AğUSTOS 2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KOLOREKTAL KANSER HÜCRELERİNİN ANTI-TÜMÖR İMMÜN YANITLARINA DUYARLILIĞININ ARTTIRILMASI

ESRA YILMAZ

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DR. ÖĞRETİM ÜYESİ ERCAN ÇAÇAN

Kolorektal kanseri dünyada en yaygın görülen üçüncü kanser türü olup, ileri evrelerde tanı konularının beş yıllık sağ kalım oranı oldukça düşüktür. Kanser tedavisinde kullanılan standart tedaviler ileri aşamada olan kanserlerin tedavisinde yetersiz kalmaktadır. Ancak tümör spesifik immün yanıtın aktifleştirilmesi bu tür kanserlerin tedavisinde büyük umut vadetmektedir. Bortezomib FDA onaylı bir kemoterapi ajanı olup çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır ve yapılan çalışmalarda bortezomib'in immünojenik hücre ölümünü tetikleyebildiği ortaya konulmuştur. Başka bir kemoterapötik ajan olan epirubisin, özellikle meme kanseri tedavisinde diğer kemoterapötik ilaçlarla da kullanılabilen bir antrasiklin ajan olarak bilinmektedir. Bu tez çalışmasında iki kemoterapötik ajan olan bortezomib ile epirubisin'nin düşük dozlarda kombinasyon şeklinde kullanılarak immünojenik hücre ölümünde rol oynayan önemli genlerin ifadelerinin artırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda normal kolorektal hücre hattı ile metastatik özelliğe sahip iki kolorektal kanseri hücre hatları kullanılarak bortezomib ve epirubisin ile farklı dozlarda muamele edilmiş ve bu hücrelerdeki minimum toksisite etkileri MTT testleri ile belirlenmiştir. Daha sonra bu dozların immünojenik hücre ölümünde görev alan *DR4*, *DR5* ve *NKG2DL* genlerin ifadeleri üzerindeki etkileri RT-PCR ile ortaya konulmuştur. Elde edilen veriler gösteriyor ki kombinasyon muamelesi *DR4*, *DR5* ve *NKG2DL* genlerinin transkripsiyon ekspresyonlarını kolorektal tümör hücrelerinde önemli bir derecede artırırken, normal kolorektal hücrelerde kayda değer bir artış göstermemiştir. Dolayısıyla, bortezomib ve epirubisin'in düşük dozlarda kullanımı tümör hücrelerinin immünojenitesini artırıp buda tümör spesifik immün yanıtın aktifleşmesine katkı sağlayabileceği kanaati hasıl olmuştur.

2019, 57 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Bortezomib, Epirubisin, İmmünojenik Hücre Ölümü, *DR4*, *DR5* ve *NKG2DL*

ABSTRACT

MASTER THESIS

SENSITISATION OF COLORECTAL CANCER CELLS TO ANTI-TUMOR IMMUNE RESPONSES

ESRA YILMAZ

**TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOLOGY

ASST. PROF. DR. ERCAN ÇAÇAN

Colorectal cancer is the third most common cancer in the world and the five-year survival rate of those diagnosed in advanced stages is very low. Current standard treatments are insufficient in the treatment of advanced cancers. On the other side, activation of tumor-specific immune responses holds great promise in the treatment of such cancers. Bortezomib is an FDA-approved chemotherapy agent that is used in the treatment of various cancers and studies have shown that bortezomib can trigger immunogenic cell death. Epirubicin, another chemotherapeutic drug, is known as an anthracycline agent which can be used with other chemotherapeutic drugs, particularly in the treatment of breast cancer. The aim of this study was to increase the expression of important genes involved in immunogenic cell death by using low doses of two chemotherapeutic agents, bortezomib and epirubicin, in combination. For this purpose, normal colorectal cell line and metastatic two colorectal cancer cell lines were treated with bortezomib and epirubicin in variety of doses and the minimum toxicity effects on these cells were determined by MTT assays. The effects of these two agents on the expression of *DR4*, *DR5* and *NKG2DL* genes which are involving in immunogenic cell death were then analyzed by RT-PCR. The obtained data showed that the combination treatment significantly increased the transcription expression of *DR4*, *DR5* and *NKG2DL* genes in colorectal tumor cells, but did not show a significant increase in normal colorectal cells. Thus, the use of bortezomib and epirubicin at low doses may increase the immunogenicity of tumor cells which can contribute to the activation of tumor-specific immune responses.

2019, 57 PAGE

KEYWORDS: Bortezomib, Epirubicin, Immunogenic Cell Death, *DR4*, *DR5* and *NKG2DL*

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda yol gösteren ve çalışmalarımnda beni destekleyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ercan ÇAÇAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen ve bir aile ortamı sağlayan yüksek lisans öğrencisi Merve USTA, Arş. Gör. Burak KÜÇÜK ve Arş. Gör. Çağlar BERKEL'e teşekkür ediyorum.

Son olarak manevi desteklerini benden esirgemeyen eşim Ali YILMAZ'a çocuklarım Emre Aytuğ YILMAZ ve Mustafa Berk YILMAZ' a ayrıca her daim yanımda olan şefkatini esirgemeyen annem Emine KÖSE' ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Esra YILMAZ
Ağustos 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT.....	i.
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolorektal Kanser.....	3
2.3. Kolorektal Kanserin Moleküler Temelleri.....	5
2.4. Hücre Ölüm Yolakları.....	8
2.4.1. Otofajik hücre ölümü.....	9
2.4.2. Nekrozis.....	10
2.5. Tümör Tedavisine Yaklaşım.....	23
2.6. Bortezomib ve Epirubisin.....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Hücre Kültürü.....	27
3.2. Hücre proliferasyon ölçümü ve IC ₅₀ değerinin belirlenmesi.....	28
3.3. Kombinasyon Muamelesinin Kolorektal Hücrelerdeki Bazı İmmünojenik Genlerin İfadesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi.....	29
3.4. İstatistiksel Analizler.....	29
4. BULGULAR.....	32
4.1. Bortezomib'in Normal ve Kolorektal Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	33
4.2. Epirubisin'in Normal ve Tümör Kolorektal Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	36
4.3. Düşük Dozlardaki Bortezomib ve Epirubisin Kombinasyon Uygulaması Normal ve Kolorektal Tümör Hücre Hatları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	38

4.4. Bortezomib, Epirubisinin ve Kombinasyon Muamelesinin Bazı İmmünojenik Genler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.....	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	47
6. KAYNAKÇA.....	50
7. ÖZGEÇMİŞ.....	57



SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	Adenomatöz Polipozis Coli
CD8+T	Sitotoksik T Hücresi
cDNA	Complementer DNA
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DR4	TRAIL Reseptörü 1
DR5	TRAIL Reseptörü 2
EtOH	Etanol
FADD	Ölüm Domaini İçeren Fas-ilişkili Protein
Fas L	Fas Ligand
Fas R	Fas Reseptörü
FBS	Fetal Bovin Serum
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrejenaz
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
NKG2DL	Doğal Öldürücü Grup 2 Ligandı
Th	Yardımcı T Hücresi

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Epidermal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümündeki genomik dengesizlik	7
Şekil 2.2. Mitokondi tarafından indüklenen apoptozis.....	13
Şekil 2.3. CD8+T hücrelerinin TRAIL/TRAIL Reseptör aracılığı ile gerçekleştirilen tümör hücrelerinin apoptozis yolağı.....	17
Şekil 2.4. NKG2D reseptörü tümör hücresinde bulunan NKG2DL ile bağlanarak NK hücreleri perforinler aracılığıyla tümör hücresinin yok edilmesini sağlar.....	21
Şekil 2.5. Bortezomib'in kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.6. Epirubisin'in kimyasal yapısı.....	27
Şekil 4.1. Artan bortezomib konsantrasyonlarının normal ve tümör kolorektal hücre hatları üzerindeki etkisi.....	33
Şekil 4.2. Artan epirubisin konsantrasyonlarının normal ve tümör kolorektal hücre hatları üzerindeki etkisi.....	35
Şekil 4.3. Bortezomib ve epirubisin kombinasyon uygulamasının kolorektal hücre hatları üzerindeki etkisi.....	38
Şekil 4.4. Bortezomib ve Epirubisin uygulamasından sonra <i>DR4</i> transkripsiyon ekspresyonu.....	40
Şekil 4.5. Bortezomib ve Epirubisin uygulamasından sonra <i>DR5</i> transkripsiyon ekspresyonu.....	43
Şekil 4.6. Bortezomib ve Epirubisin uygulamasından sonra <i>NKG2D</i> ve <i>NKG2DL</i> transkripsiyon ekspresyonu.....	46

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Tablo 1: qRT-PCR da gen ifadesini belirlemek amacıyla kullanılan primerler.....33



1. GİRİŞ

Kolorektal kanser dünyada en yaygın görülen üçüncü kanser türü olarak gösterilmiş ve hastalığı ileri dönemde olan vakalarda beş yıllık sağ kalım oranı %30 'dan az olarak belirlenmiştir (Siegel ve ark., 2014). Kolorektal kanserler kadın ve erkeklerde en sık görülen kanserler arasında yer almaktadır ve dünya genelinde 1,2 milyondan fazla kişide görülmektedir. Bu hastalığın tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerin başında cerrahi, kemoterapi ya da radyoterapi gibi yöntemler gelmektedir. Kemoterapi veya radyoterapi gibi yöntemler hızla bölünen hücrelerin öldürülmesinde etkilidir ve artan dozun miktarına göre bu etkinlikleri artmaktadır. Ancak çoğu zaman kullanılan bu yöntemler kanserli hücreler ile normal hücreler arasındaki farkı ayırt edemediğinden kanserli hücrelerle birlikte normal sağlıklı hücrelerinde büyük hasara uğramasına neden olmaktadır. Ayrıca kemoterapötik ilaçlara karşı kanser hücrelerinin direnç göstermesi tedavide büyük bir engel teşkil etmektedir.

Uzun yıllar boyunca bağışıklık sisteminin kanserin başlaması, ilerlemesi ve yayılması sürecindeki rolleri bilinmiyordu. Günümüzde ise bilimsel ve klinik kanıtlar, kanserin büyümesini kontrol etmede hem doğal hem de edinsel bağışıklık sisteminin önemli bir yer teşkil ettiği bilinmektedir. Tümör biyolojisinin ve tümör immünolojisinin tümör mikro-ortamı ile nasıl etkileşime girdiğinin daha iyi anlaşılmasıyla hedeflenen kanser terapötiklerinin yanı sıra immün terapötiklerinin de gelişimini arttırmıştır (Kaufmann ve Simon, 2015).

İmmünoterapötik yöntemler özellikle ilerlemiş kanserlerin tedavisi için umut vadetmektedir çünkü bağışıklık sistemi sistematik bir şekilde çalışarak metastazı önleyebilme kabiliyetine sahiptir. Tümörlere özgü sitotoksik T lenfositleri (CTL) ve aktive edilmiş doğal öldürücü (NK) hücreler tümörlerin yok edilmesinde önemli rol oynar ve immünoterapinin temelini oluştururlar. Bu immün hücrelerinin tümör hücrelerine karşı aktifleşmelerinin çeşitli yolları mevcutken, bu yollardan bir tanesi de apoptotik ölüm yollarını aktifleştirmesidir. Özellikle ölüm reseptörleri olarak bilinen DR4 (TRAIL-R) ve DR5 (TRAIL-R2) gibi tümör nekroz faktörü reseptör üst ailesinin (TNFRSF) üyelerinin tümör hücresi üzerindeki ekspresyon seviyelerini arttırıp, sitotoksik T ve doğal öldürücü gibi immün hücrelerinin bu reseptörlere bağlanma

kabiliyetlerini arttırarak tümör hücrelerindeki apoptozu indüklemektir (Khosravi ve Esposti, 2004).



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

Kolon ya da rektumdan köken alan kanserler kolorektal kanser olarak ifade edilmektedir. Kolon ve rektum sindirim sisteminde görevli ve kalın bağırsağı oluşturan yapılardır. Kolorektal kanserler (KRK) oluşturdukları bölgeye göre kolon ya da rektum olarak adlandırılırsalar da birçok ortak özelliğe sahip oldukları için aynı grup içerisinde yer almaktadırlar. Kolon ve rektumun iç yüzeyi birçok katmandan oluşmaktadır. Bunlar içten dışa doğru mukoza, submukoza, kas tabakası ve seroza olarak sıralanmaktadır (American Cancer Society, 2018). Kolorektal kanser bağırsağın mukoza adı verilen en iç tabakada ortaya çıkar ve sonra diğer yüzeylere doğru büyümeye başlar. Bağırsak ilişkili bu malign hastalık sıklıkla hücre büyümesinin kontrolünde rol oynayan kilit genlerde genetik değişiklikler biriktiren kolon epitel hücrelerinde gelişmektedir (Kalluri ve Weingbeng, 2009) Kolorektal kanser patogenezinde daha çok genomik ve epigenomik kararsızlık yer alırken, hücre çoğalması, farklılaşması, programlı hücre ölümü, anjiogenez ve invazyon gibi karsinogenezde kritik olayları düzenleyen genlerin mutasyonları ve bunun sonucu değişen sinyal yolları da önemli yer tutar (Spilianakis ve ark., 2005). Ayrıca kolorektal kanser çok adımlı genomik hasarlar ile değişikliğe uğramış hücreler, kanserojen içeren çevresel faktörlerden veya *Helicobacter pylori* dahil genotoksik mikrobik patojenlerden de kaynaklanabilmektedir (Strofilas ve ark., 2012).

2.2. Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Kolorektal kanserin genç bireylerde görülme sıklığı düşük olsada 50 yaş ve üzeri bireylerde görülme sıklığı artabilmektedir (Howlader ve ark., 2012). Sosyal ve ekonomik düzeyi gelişmiş ülkelerde bu yaş ortalaması 70 olarak belirtilmiştir. Kolorektal kanser de en yüksek insidans Avrupa, Kuzey Amerika ve Okyanusya ülkelerinde bildirilirken; Güney, Orta Asya ve Avrupa'daki bazı ülkelerde görülme sıklığı düşebilmektedir (Draft ve ark., 2013). Bununla birlikte İspanya, Doğu Avrupa ve Doğu Asya'daki bazı ülkeler daha önce düşük riskli kısımda yer alırken yapılan son

araştırmalarda kansere yakalanma açısından hızlı bir artış kaydedilmiştir. Bu artışa sebep olabilecek etmenler arasında batı yaşam tarzı ve ülkelerdeki diyet düzenlerindeki değişikliklere bağlanmıştır. ABD ve diğer yüksek gelirli ülkelerde sigmoidoskopi ve polipektomili kolonoskopi kullanımı ile tümörün erken teşhis edilmesiyle insidans stabilize olmuş veya azalmaya başladığı tespit edilmiştir (Kuipers ve ark., 2016; Zauber 2012). Türkiye’de kolorektal kanseri kadın ve erkeklerde en sık görülen ilk beş kanser arasında yer almaktadır. Son 50 yılda yapılan çalışmalarda kolorektal kanser sebepli ölümler kadınlarda düşüş gösterirken, erkeklerde bu oranın değişmediği belirtilmiştir.

Yapılan alışmalar sonucunda kolorektal kanser hastalığının heterojen bir yapıda olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla kolorektal kanser genetik, epigenetik ve çevresel etmenlerden meydana gelebilmektedir (Dranoff ve ark., 2004; McLean ve ark., 2011). Epidemiyolojik çalışmalarda hastalardan alınan öykü (anamnez) sonucunda kolorektal kansere neden olan unsurlar inflamatuvar bağırsak hastalığı, sigara ve aşırı alkol tüketimi, aşırı işlenmiş kırmızı et tüketimi, obezite ve diabetus mellitus olarak saptanmıştır. Yeni ortaya konulan bulgulara göre *Helicobacter pylori* ve *Fusobacterium spp.* gibi diğer bulaşıcı ajanların oluşturduğu enfeksiyonlar kolorektal kansere neden olabilmektedir (Strofilas ve ark., 2012). Yapılan araştırmalara göre kolorektal kanser riski aynı zamanda kalıtsal faktörlerle ilişkilendirilmiş ancak riski belirleyen genetik faktörlerin tümü tam olarak açıklanamamıştır. Ayrıca epigenetik mekanizmalarda meydana gelen düzenlemelerinde kolorektal kanserin gelişmesinde önemli rolleri olduğu ortaya konulmuştur. Epigenetik mekanizmalarda, çeşitli kovalent histon modifikasyonları ve DNA’daki sitozin metilasyonu belirgin gen düzenleme modlarını temsil etmektedirler (Plass ve ark., 2013). Kolorektal kanser de en çok araştırılan epigenetik mekanizmalar ise CpG adacıklarında meydana gelen metilasyon ve histon modifikasyonlarıdır. Bununla birlikte kodlayıcı olmayan RNA’nın ifadesi gibi epigenetik modifikasyonlara katkıda bulunan farklı yollar da bulunmaktadır. Epigenetik mekanizmalar, kanserdeki gen mutasyonları kadar önemli olabilirler fakat tümör gelişimindeki rolü henüz çok fazla anlaşılamamıştır.

Kolorektal kanser de tümör heterojenliğine katkıda bulunan faktörler, mutasyonların varlığı, genetik polimorfizmler, tümörün poliklonal bileşimi ve tümör mikro ortamının (hücre dışı matriks, stromal hücreleri ve bağışıklık hücrelerinin) dengesinin sağlanması

ile ilişkilendirilebilir. Bu etkileşimler normal neoplastik olmayan hücrelerin bileşimine bağlıdır ve bu yüzden tümörlerin biyolojik davranışları kişinin genetik özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir. Tüm bunlara istinaden bu genetik ve genomik varyasyonların fenotipik yapısı, diyet, hormonal değişiklikler, komorbiditiler vb. gibi dış etmenler tarafından da modifiye edilebilmektedir. Tüm bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda kolorektal kanser de tek bir moleküler değişikliğin klinik öneme sahip olmadığı ancak çoklu bir değişikliğin tümörün fenotipi ve agresifliğini değiştirebildiği kanısına varılmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011).

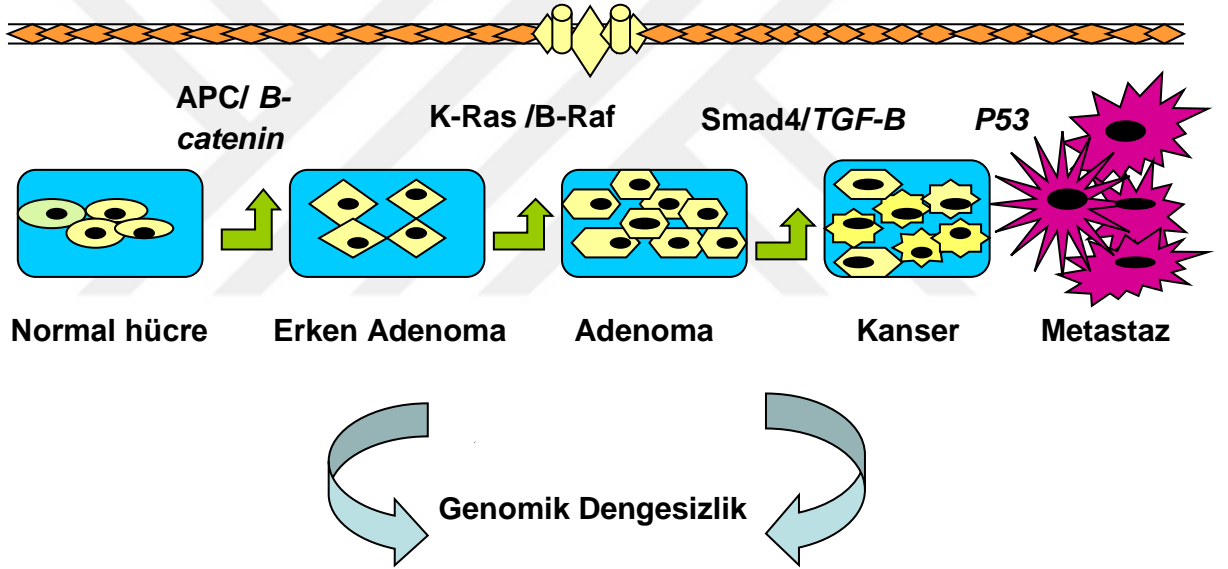
2.3. Kolorektal Kanserin Moleküler Temelleri

Kolorektal kanserin klinik belirtileri, moleküler özellikleri, tedavilere duyarlılığı ve prognozu açısından heterojen bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Kolorektal kanserin patogenezi, histolojik farklılıklara neden olan hem genetik hem de epigenetik değişiklikleri içermektedir ve en açık olarak Fearan ve Vogelstein tarafından önerilen adenom-karsinom dizisi modelinde ifade edilmektedir (Miliani de Marval ve Zhang, 2011). Bu modelde kolorektal kanserin patogenezi, normal mukozanın bir adenoma dönüşümüne katkıda bulunan genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimini ve daha sonra malign bir evreye ilerlemesini sağlayan aşamalı bir işlem olarak açıklanmıştır. Kolorektal kanserin oluşumunda önemli üç moleküler yolak mevcuttur: Adenomatöz Polipozis Coli (APC), SMAD4 ve TP53 gibi tümör baskılayıcı genin etkisizleştirilmesinden kaynaklanan somatik veya genomik dengesizlik; anormal DNA metilasyonu, yanlış eşleşme mutasyonlarının neden olduğu DNA onarım kusurları; BRAF, RAS, fosfotidil inositol3- kinaz (PIK3) dahil olmak üzere onkojenik yolların aşırı aktivasyonudur (Markowitz ve Bertagnolli, 2009). Genel olarak bakıldığında bir bağırsak hücresinin kansere dönüşmesi için iki temel özelliğe uyması gereklidir. Bunlar, başlangıçta bağırsakta klonal genişlemeye izin vermek için seçici bir avantaja sahip genetik istikrarsızlık ve tümör ilerlemesinden sorumlu genlerde multiple mutasyonların meydana gelmesidir. APC geninin inaktivasyonu her iki durumu da yerine getirmektedir (Folde, 2002). APC mutasyonları kromozom kararsızlığına yol açabilmektedir. APC geni bozulduğu takdirde veya başka bir deyişle mutasyona maruz kalması Wnt sinyal yolağının uzun süreli aktivasyonu ile sonuçlanır (Polakis, 1997; Kinzler ve ark., 1996). APC / Wnt / beta- catenin yolu hem sporadik hem de kalıtsal

KRK karsinogenezinde önemli rol oynamaktadırlar. APC gen fonksiyonunun kaybı beta-cateninin aşırı miktarda birikimine dolayısıyla nükleus proteinlerinin sentezinin artmasına yol açarak hücre çoğalmasının artmasına ve apoptozun azalmasına neden olmaktadır (Harvey ve ark., 2007). Yapılan çalışmalarda kolonda meydana gelen ilk adenom mutasyonundan APC geninin sorumlu olduğu ve bunu takiben KRAS ve BRAF mutasyonları aracılığıyla adenoma büyümesi gerçekleştiği gösterilmektedir (Tan ve Du, 2012). KRAS, bir GTPaz proteindir ve proto-onkogen tarafından kodlanmaktadır. Ekson 2 'nin kodonları 12 ve 13 'teki nokta mutasyonları veya ekson 3'ün kodonu 61'deki mutasyonlar RAS sinyal yolunun kurucu aktivasyonuna yol açabilir. Bu nedenle KRAS geninin genetik bozukluğu kolorektal kanseri dahil olmak üzere birçok kanserin gelişiminde önemli adımlardan birisi olmuştur (Huncharek ve ark., 1999). KRK vakalarının büyük bir kısmında KRAS mutasyonlarına rastlanmaktadır (Morris ve ark., 2007). Raf genleri ailesinde üç farklı serin / treonin kinaz (ARAF, BRAF, RAF) bulunur. BRAF, KRAS 'ın RAS / RAF / MAPK sinyalizasyon yolu içindeki efektörüdür. BRAF gen mutasyonunun, KRK gelişimi ve hastaların kötü prognozu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Fransén ve ark., 2004). Önceki çalışmalara dayanarak BRAF gen mutasyonları yaşlanma dışı, cinsiyet, proksimal kolon yerleşimi, zayıf farklılaşma, müsin histolojisi, infiltrate lenfositler ve hastalığın ileri evresi ile ilişkilendirilmiştir (Li W Q ve ark., 2006; de la Chapelle A. 2009).

Kolorektal kanserin ilerlemesini teşvik eden genler arasında hem sık mutasyonlar hem de ilgili biyolojik fonksiyonlar için TP53 geni önemli bir rol oynamaktadır. Bağırsak epitelyum hücrelerine özgü P53 genini inaktifleştirerek kullanılan farelerde sadece P53 kaybının kolonda kanserojen yapının başlamasına neden olmak için yeterli olmadığı ancak metastatik yayılım gösterdiği saptanmıştır (Levine ve ark., 2009). TP53 geninin bu etkisi tümör baskılayıcı genin hücre döngüsü düzenlemesi, apoptoz ve yaşlanmadaki köklü rolünden bağımsız olarak bir fonksiyon aracılığıyla kolon kanseri üzerindeki işlevini yerine getirdiğini göstermektedir (Schwitalla S. 2012). TP53 geni büyümenin durması, apoptoz, DNA hasarı ve strese verilen tepkiler oksidatif stres ve anormal proliferatif sinyaller gibi farklı hücresel süreçlerin merkez regülatörü olarak görev yapan önemli bir tümör baskılayıcı gendir. TP53 protein fonksiyon bozukluğuna bağlı adenomların %25 'inden fazlasını ve KRK 'li hastaların %50 veya %70 'inde bildirilen

solid tümörlerin ortak özelliklerini oluşturur. TP53 mutasyonları sporadik KRK hastalarının yarısından fazlasında bildirilmiştir (Wu W ve ark., 2013). Birçok çalışma fosfotidil-inositol-3 kinaz (PIK3) mutasyonları KRK 'deki işlevini ortaya koymaktadır. Yakın zamanda yapılan incelemelerde intestinal epitelyumde yapısal bir PIK3 ekspresyonuna dayalı aktivasyonunun doku hiperplazisi ve invaziv mukus adenokarsinomlarının oluşumuyla gösterilmiştir (Leystra ve ark., 2012). Kolorektal kanserde sıklıkla mutasyona uğrayan genlerden biriside TGF- β ailesidir. Bu yol reseptör ile ilişkili SMAD2 ve SMAD3 'ün fosforilasyonu ile sonuçlanmıştır. TGF-y ligandlarının bağlanmasında aktive edilen iki membran reseptörünü içermektedir. SMAD2 ve SMAD3 sayesinde SMAD4 'ü bağlar ve bunun sonucunda moleküler kompleksin düzenlenmesini sağlamıştır.



Şekil 2.1. Epidermal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümündeki genomik dengesizlik.

APC ve TP53 tümör baskılayıcı genlerinin mutasyonu sonucunda inaktivasyonu, K-Ras proto-onkogenlerin aktivasyonunun arttırılmasıyla sonuçlanır ve bu mutasyonlara kolorektal tümörlerinde sık sık rastlanmaktadır (Sjoblom ve ark., 2006). Aktive edilmiş Ras genleri bir dizi farklı hücre tipinde tümör hücresi hareketliliğini, yayılmasını ve hayatta kalmasını desteklemektedir. Tümör hücrelerinde metastaz oluşumu ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile baskılanabilir (Koshkina ve ark., 2007). Bu konuda en iyi çalışılan ölüm reseptörleri Fas (CD95) ve Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz

indükleyen ligand (TRAIL) reseptörleridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TRAIL ve FasL'nin eksojen uygulamalarında K-RAS mutasyonlu kanser hücrelerinde proliferasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, K-RAS mutasyonuna uğramış hücrelerde endojen TRAIL provaziv bir rolünün olduğu keşfedilmiştir (Hoogwater ve ark., 2010). Tüm bu moleküler olaylar, hücre büyümesinin kontrolünün kaybına müsaade eder, hücre çoğalmasını ve hücre sağ kalımını fazlalaştırır, apoptozu baskılayarak hücre kontrol metabolizmasını bozabilir ve böylece metastaz oluşumunu destekleyebilir. Kolorektal kanser de mezanşimal geçiş için epitelyum hücrelerini aktifleştirir, anjiyogenez oluşturur, bağışıklık sistemini farklılaştırır ve bağırsak metabolizmasını bozmaktadır.

2.4. Hücre Ölüm Yolakları

Vücudumuzdaki hücre ölümleri ile hücrelerin çoğalması arasındaki denge sistemik açıdan önem arz etmektedir. Hücre ölüm ve yaşam arasındaki bu denge; organların gelişimi, dokuların yeniden biçimlenmesi, bağışıklık tepkisi ve tümörün bastırılması için temel bir kavramdır. Canlılarda hücre ölümleri önemli hasarlar sonucunda (travma, hipoksi, iskemi) oluşabilir ancak çoğu zaman hücre ölümü belirli sinyal uyarıları aracılığıyla programlanmış bir şekilde gerçekleştirilir. Hücre ölümünde başlatıcı sinyallerden kaynaklı farklılardan dolayı birçok hücre ölüm şekli görülmesine rağmen, hücre ölümleri tipik olarak otofajik, nekrotik, programlanmış ve immünolojik hücre ölümü olarak dört grupta incelenmektedir (Galluzzi ve ark., 2007).

2.4.1. Otofajik hücre ölümü

Otofajik hücre ölümü büyük hücre içi veziküllerin ortaya çıkması ve kendini yeme mekanizmasının birleşmesi ile karakterize edilmektedir. Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kese içerisine alınarak lizozomlar aracılığıyla parçalanıp yok edilmesini sağlamaktadır. Genel olarak otofaji; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Makrotofaji hasarlı organellerin ve protein kalıntılarının parçalanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Mikrotofaji, lizozom zarının iç tarafa doğru çökmesi ile sitoplazmanın lizozom aracılığıyla direkt olarak alınması ve

salgılarının lizozom içinde sindirilmesi işleminden sorumludur. Şaperon aracılı otofaji yanlış katlanmış proteinleri ve yanlışlıkla meydana gelmiş sitozolik proteinlerin bir grubunu indirgeyerek işlev yapmaktadır (Xie ve Klionsky, 2007). Otofaji, temel olarak bir metabolik krize yani düşük ATP seviyeleri, besin ve aminoasit yoksunluğuna cevap vermek, hasarlı organelleri ya da protein agregatlarını uzaklaştırmak için yapılan hayatta kalma sürecini ifade etmektedir. Bu yolla organizmada anabolik ve katabolik fonksiyonlar dengelenir ve hasarlı organeller ortadan kaldırılmaktadır. Bir vakuol içine alınan hücre içi makro moleküllerin ve organellerin primer lizozomlarla kaynaşıp parçalanması ile gerçekleşen bir mekanizmadır. Sitoplazmanın bir kısmı ya da bir organel ilk olarak endoplazmik retikulum hücre dışındaki membrana sarılır. Primer lizozomlar bu yapıyla birleşir ve sekonder lizozom yani otofagozom denilen bir yapı oluşur ve hücre hidrolitik enzimlerle parçalanır. (Lee ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda otofaji mekanizmalarının hücre ölümü için kesinlikle gerekli olduğu birçok örnekle kanıtlanmıştır. Örneğin, *Drosophila* metamorfozu sırasında midgut ve tükrük bezleri gibi eski dokuları, steroid hormonu ekzoninin tetiklediği bir süreç olan büyük bir otofajik hücre ölümüyle gerilemektedir. Bu özel durumda, otofajik sinyal yolunun genlerdeki bir eksiklik hücre ölüm programını değiştirir (Berry ve Baehrecke 2007; Denton ve ark., 2009). Ayrıca düzensiz H-Ras aktivitesine cevap olarak otofajik hücre ölümü de rapor edilmiştir ve bu nedenle onkojenik transformasyonuna karşı korunma mekanizmasını temsil edebilmektedir (Elgandy ve ark., 2011). Otofajinin uyarılması, özellikle apoptotik işlevleri hasara uğramış malign tümörlerin alternatif hücre ölüm mekanizması olarak ya da normal hücrelerde kanser oluşumunu engellemede yararlı olabilirler. Ayrıca otofajik yolağın inhibe edilmesiyle anti-tümör tedavi rejimlerinin etkinliği artırılabilirliği varsayılmaktadır.

2.4.2. Nekrozis

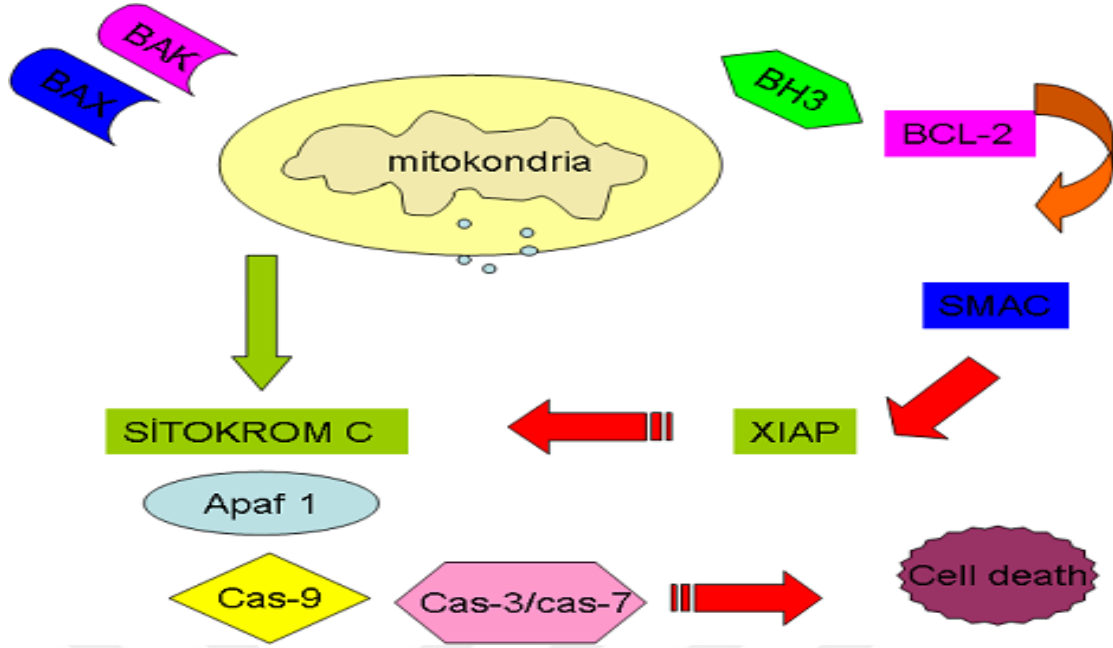
Nekrozis, programlanmamış bir hücre ölüm şekli olup aşırı dışsal strese bağlı olarak (yanıklar, soğuk ısırması, hipoksi ve gcl mekanik stres) meydana gelen etkiler sonucunda hücre zarının hemen yırtılmasıyla hücre içi moleküllerin serbest kalmasıyla ilişkilidir. Nekroziste hücreler sıvı alır, organeller şişer ve plazma zar bütünlüğünün bozulması sonucunda hücre patlar. Hücrelerin lm enflamasyona sebep olur. Enflamasyon, immün sistemde görevli nötrofilleri ve makrofajları nekrotik yapıya

yöneltir ve bu dokuların fagosite edilmesini sağlar (Golstein ve Kroemer, 2007; Nicotema ve ark., 2004). Solid tümörlerin iç bölgelerinde yetersiz kan miktarı sonucunda oluşan iskemik (hipoksi) koşullar sonucunda nekrotik hücre ölümleri meydana gelebilmektedir (Kang ve ark., 2013; Chen ve ark., 2016). Ancak bazı zamanlarda kanser vakalarında nekrotik bir çekirdeğin gelişimi kemodirenc ve metastazların ortaya çıkmasıyla tümör büyüklüğünün artması ve tümörün ilerlemesi gibi kötü prognoz ile ilişkilendirilebilir (Tomes ve ark., 2003; Gatenby ve Gillies, 2004).

2.4.3. Apoptozis

Apoptozis biyolojik görevlerini tamamlamış ya da DNA 'sı hasar görmüş hücrelerin, ilişkili olduğu doku ve hücrelere zarar vermeyecek şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan, çok hücreli canlılarda görülen ve genlerle kontrol altında tutulan programlı bir hücre ölümüdür. Apoptozis embriyonik dönemden başlayarak yaşam süresince deri, gastrointestinal ve immün sistem gibi pek çok sisteme ait dokuların devamlılığı; mitoz, hücre ölümü ve apoptozis arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Apoptozis; homeostatik mekanizmalar, bağışıklık sisteminin kontrolünde, tümörün bastırılmasında ve enfeksiyon direncinde gereklilik teşkil etmektedir (Khalila, 2015). Hücre ölümü bağışıklık sisteminden uygunsuz hücrelerin çıkarılması, meme bezlerinde bulunan kanalların oluşumu, yaşlanma ile timus dejenerasyonu ve son olarak patojenlerin yayılmasını önlemek için enfekte hücrelerin ortadan kaldırılması dahil birçok uygulanabilir fizyolojik işlemlerden sorumludur (Henhanger ve ark., 1992). Apoptozis, hücre büzülmesi, tomurcuklanması ve kromatinin yoğunlaşması ile karakterizedir (Kerr ve ark., 1972). Ayrıca apoptozis kaspaz proteazlarının aktivasyonu ile birlikte meydana gelen hücre ölümü olarak da tanımlanabilmektedir (Galluzzi ve ark., 2012). Anormal apoptozisin kanser başlangıcında, ilerlemesinde ve tedavi başarısızlığında katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Hücre ölüm kontrol mekanizmalarının genetik odaklı bir süreç olması kanser ve birçok farklı hastalıkların araştırılmasında önemli gelişmelere sebep olmuş ve hücre ölümünü başlatan farmakolojik ajanların geliştirilmesini kolaylaştırmıştır.

Apoptotik hücre ölümü kaspaz ailesinin içsel ve dışsal yolları olarak bilinen iki ayrı ancak birleşik yoldan kronolojik olarak aktifleşmesiyle tetiklenmektedir. İçsel yollar genellikle mitokondrial yol olarak bilinmektedir. Baskın olarak B hücreli lenfoma (Bcl-2) protein ailesi tarafından kontrol edilmektedir. Bcl-2 protein ailesi apoptotik fonksiyonlarına göre: Anti-apoptotik, pro-apoptotik ve BH-3 proteinleri olarak üç gruba ayrılmaktadır (Bose, 2015). BH-3 proteinleri anti-apoptotik proteinlere bağlanarak onların inhibitörü gibi davranan protein ailesidir (Youle ve Strasser, 2008). Pro-apoptotik moleküllerin apoptoziste görev alan en önemli üyeleri BAX, BAK ve BOK iken, anti apoptoziste etkili proteinlerin bazıları ise Bcl-2, BclxL ve Mcl-1'dir. Bcl-2, homoloji domainleri içeren BH3 proteinlerine örnek ise PUMA, NOXA, BIM, BAD'dır. Bcl-2 protein ailesi programlanmış hücre ölümü ve apoptozun kilit düzenleyicisidir. Bu mitokondrial hücre ölümü iki aşamalıdır. İlk olarak çok fazla uyarı apoptotik faktörlerin dış zarıdan salınmasına neden olur böylece iç zarın gradyenini bozarak mitokondrial geçirgenlikte bir artış meydana gelir. Bu tahribatın tamamı iç ve dış mitokondrial membranların birleşme noktasında bulunan mitokondrial geçiş olarak adlandırılan çok proteinli bir kompleks tarafından algılanır. Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenen apoptotik yolun başlatılması ve diğer proteinlerle arasındaki etkileşimler Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilmektedir. BH3 domainleri, Bcl-2 proteinlerine bağlanarak onu inhibe ederek BAX/ BAK 'in aktifleşmesine sebep olabilirler (Wang ve Youle, 2009). Aktifleşen BAX/ BAK apoptotik faktörlerin sitozolik salınmasına izin vererek dış mitokondrial membran geçirgenliğine (MOMP) neden olmaktadır (Chipuk ve Green, 2008). MOMP, sitokrom c ve ikinci mitokondri türevli kaspazlar (SMAC) mitokondrial intermembran aralık proteinlerinin sitozolde salınmasını indüklemektedir. SMAC kaspaz inhibitörü X'e bağlı apoptoz protein inhibitörünü bloke ederek (XIAP) sitokrom c kaspaz kaskadını aktive ederek apoptozise yol açmaktadır. Sitokrom c apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF 1) ile etkileşime girerek kaspaz-9 ve apoptozom düzeneğinin aktivasyonuna yol açmaktadır. Aktive edilmiş kaspaz-9 sırasıyla kaspaz-3 ve kaspaz-7 'yi aktive ederek apoptozu tetiklemektedir (Enari ve ark., 1998).



Şekil 2.2. Mitokondi tarafından indüklenen apoptozis. Mitokondrial yolak da BH3 domainleri, Bcl-2 proteinlerine bağlanarak onu inhibe eder ve BAX/BAK 'in aktifleştirir. Mitokondri dış zar geçirgenliği bozulur ve sitokrom c salgılanır. Sitokrom c APAF1'i etkinleştirerek kaspazların indüklenmesini sağlar

Mitokondrial yolağın aktifleşmesinde görevli bir diğer protein ise; hücrede oluşan oksidatif stres, UV radyasyonu, DNA kırıkları vs. neticesinde aktif olan ve tümörleşmenin önüne geçen p53 proteindir (Jin ve El-Deiry, 2005). p53 proteini aktifleştikten sonra direkt olarak mitokondrial membrana ilerler ve anti-apoptotik proteinler olan BCL-2 ve BCL-xL ile etkileşerek onları inaktif hale getirir. Bu etkileşim pro-apoptotik moleküllerle kompleks oluşturan ve membran geçirgenliğini azaltan BCL-2/BCL-xL proteinlerinin inhibisyonunu sağlamakta ve zarı açılmasını desteklemektedir. Benzer şekilde p53 proteini pro-apoptotik olan BAK proteinine de bağlanabilir ve bu bağlanma BAK'ın işlevini kısıtlayan anti-apoptotik MCL-1 proteinin kompleksten ayrılmasını sağlar. p53 aktivitesinin bir başka örneğinde ise mitokondri ilişkili p53 proteini sağlıklı hücrelerde BCL-xL ile inaktif tutulur. Apoptotik bir uyarı sonucu nükleus ilişkili p53, PUMA adı verilen bir proteini kodlar ve bu protein BCL-xL ile etkileşime girerek mitokondri ilişkili p53'ün serbest hale geçmesine yardımcı olur (Vaseva ve Moll, 2009). Tüm bu olaylar mitokondride bulunan apoptozis indükleyici faktörlerin sitozole geçişi sağlayarak apoptozisi tetikler.

Dış yol (ekstrinsik) olarak bilinen reseptör aracılı apoptoziste başlatıcı olarak bir ölüm ligandı ve bu liganda bağlanan hücre içi sinyal iletimini sağlayacak ölüm reseptörleri gerekmektedir. Ölüm sinyallerini tutan bu reseptörler tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) süper ailesi grubunda yer almaktadır. TNFR üyeleri normal ve malign dokular üzerinde yaygın olarak ifade edilmektedir. Ölüm reseptörleri olarak bilinen TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) ve osteoprotegerin (OPG) ve Fas (CD95/APO-1) TNFR süper ailesinde yer almaktadır (Askkenazi ve Dixit, 1999). TRAIL proteini yalnızca TRAIL-R1 (DR4) ve TRAIL-R2 (DR5) ölüm reseptörlerine bağlanabilir. TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) ve osteoprotegerin (OPG) apoptotik sinyallerin iletilmesinde rol oynamaktadır. Ölüm reseptörleri tarafından iletilen sinyaller çeşitli immün hücrelerde büyüme, farklılaşma ve sitokinlere karşı oluşturduğu tepki sayesinde birçok biyolojik işlemi düzenlemektedir. Bu reseptörlerin neden olduğu apoptozis karaciğer dahil çeşitli dokular için homeostatik dengenin sağlanmasında ve doğal immün hücrelerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Vesely ve ark., 2011). Bu yollar aynı zamanda içsel anti-tümör tepkisinden de sorumludur ve mutasyona uğrayan hücrelerin çoğalmasını engellemektedir. Bu ölüm reseptörleri hem immün yanıtları hem de apoptozisi düzenlemedeki merkezi rolü ile kanser immünoterapisi için çekici terapötik hedefler haline gelmiştir.

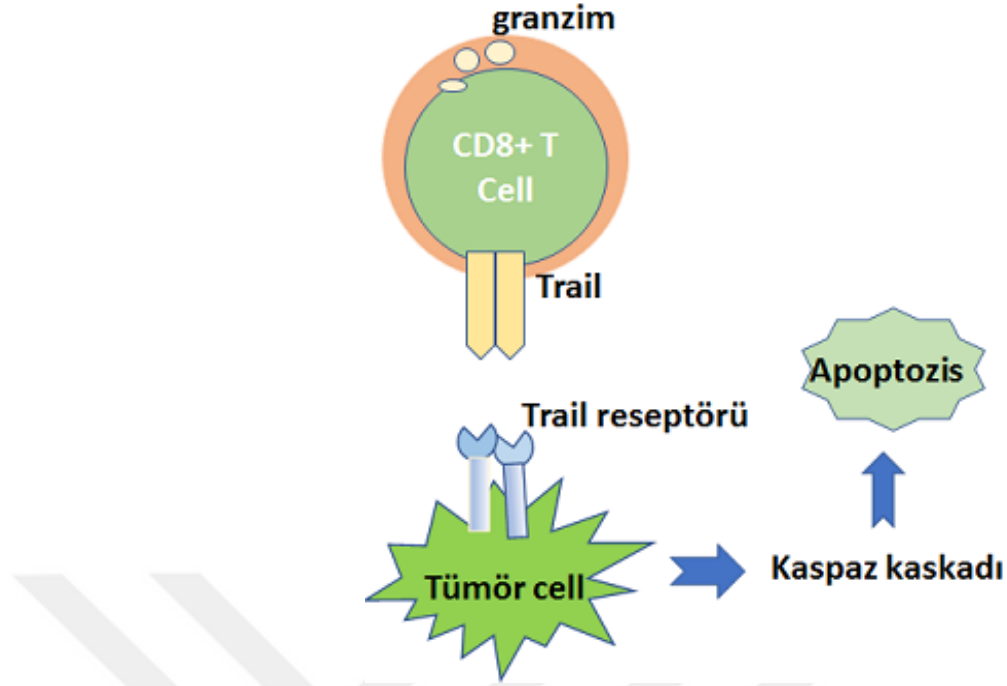
Tümör hücrelerinde apoptozu indükleyen ve immün hücrelerde ifade edilen TRAIL ve Fas-L arasında %28 ve %23 oranında homoloji bulunmaktadır (Fulda ve ark., 2010). TRAIL ve Fas-L trimerik formda optimal biyolojik aktivite gösteren tip II membran proteinleridir. Her ikisi de ligandların çözünür versiyonlarını üreten endopeptidazlar ile ayrılmaktadır. Eliminasyon (bertaraf etme) safhası kötü huylu olarak adlandırılan hücrelerin hem doğal hem de adaptif immün hücreler tarafından perforin/granzim, Fas-L/Fas ve TRAIL/DR aracılı ölüm sinyal yolağına dayanmaktadır (Falschlehner ve ark., 2009). Bu reseptörler hücre dışının yüzeyinde ligandı tanıyan özel bir bölge ve hücre içinde 80 amino asitlik “ölüm bölgeleri” içermektedir. Ligand reseptörle etkileştiğinde sitozolik kısımda bulunan ölüm bölgeleri (DD) adaptör proteinlerin aktivasyonuna yardımcı olur. Ölüm reseptörünün karşılık gelen ligand tarafından uyarılmasıyla aynı reseptör diğer DD içeren proteinlerle homotipik etkileşimleri desteklemek için

sitoplazmik DD 'nü oluşturabilmek için oligomerizasyona ve konformasyonel bir değişikliğe uğrar (Guicciardi ve ark., 2009). Adaptör proteinleri Fas ve TRAIL reseptörlerinin yapısında bulunan ölüm bölgeleri (FADD/TRADD) hücre yüzey reseptörleri ile birleşerek ölümü başlatan sinyal kompleksini (Death-inducing signaling complex-DISC) oluşturur. Bu durum ise pro-kaspaz-8'in aktifleşmesini sağlar ya da pro-apoptotik proteinler üzerinden efektör kaspazları uyarabilir (Boatright ve Salvesen 2003). Aktif kaspaz-8'in kaspaz-3'ü aktive ettiği yol iki şekildedir. İlk olarak pro-kaspaz-3, kaspaz-8 tarafından direkt parçalanarak aktive edilir ya da ikinci bir yol olarak kaspaz-8 sitokrom c 'nin mitokondriden sitoplazmaya geçebilmesi için Bcl-2 proteinini Bid ve onun terminal kısmına ayırır. tBid ve Bid (BH3 etkileşimli ölüm agonisti) mitokondri membranına transloke olduğu görülür. Daha sonra mitokondrial dış membran geçirgenliği azalır ve meydana gelen apoptozom kaspaz-9'u aktifleştirir. Kaspaz-9, pro-kaspaz-3'ü parçalayarak kaspaz-3'ü meydana getirir. Kaspaz-3 ise kaspaz-6 ve kaspaz-7 aktifleştirerek apoptozisi gerçekleştirir (Degterov ve ark., 2003).

2.4.4. İmmünolojik hücre ölümü

Vücudumuzda yeni oluşan neoplastik lezyonların çoğu konakçı savunma sistemi tarafından reddedilmektedir. Neoplastik lezyonların benign veya malign bir tümöre doğru ilerlemeden önce, proaktif bir anti-kansere karşı immün mekanizmasının yer aldığı yaygın bir şekilde kabul edilmektedir (Yaacoub ve ark., 2016). Bununla birlikte, yüksek mutasyonel çeşitliliğe sahip hücrelerden oluşan çok agresif neoplastik lezyonlar durumunda; kontrolsüz çoğalma ve anti-kanser immün gözetimine karşı konakçı savunma sistemlerinden kaçabilen kanser hücresi varyantları oluşabilmektedir. (Whiteside ve ark., 2011; Poggi ve ark., 2014; Topfer ve ark., 2010). Bağışıklık sisteminin kanserdeki rolü, ilk olarak 1909' da Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Ehrlich, bağışıklık sisteminin karsinomların büyümesini baskılayabileceğini düşünüyordu. Daha sonraki yıllarda, Macfarlane Burnet ve Lewis Thomas, bağışıklık sisteminin klinik olarak ifade edilmeden önce gelişmekte olan kanseri ortadan kaldıran tümör hücrelerine özgü neo-antijenlere karşı etkili bir immünolojik reaksiyonu teşvik etme kapasitesi olarak immün-gözetim konseptini geliştirdiler. Hanahan, 2000 yılında bir tümörün gelişimi için gerekli olan altı kriteri belirlediğinde, immüniteden bahsetmemiştir. İnsanlarda bağışıklık kontrolünün rolü, bağışıklık yetersizliği olan

hastalarda kanser oluşumunun arttığı gözlemlendiğinde fark edilmiştir. Bununla birlikte, melanoma, renal, akciğer, pankreatik ve kolon kanseri gibi kanserlerin immün yetmezliği olan hastalarda görülme sıklığı artmaktadır (Engels ve ark., 2011; Collett ve ark., 2010). Sonrasında Anti-tümör immün gözetim kavramı Shankaran ve arkadaşları tarafından hayvan modellerinde gösterilmiştir (Shankaran ve ark., 2001). İmmüngözetim kavramı daha sonra bağışıklık sistemiyle tümör arasındaki etkileşimleri tanımlayan immün sistem düzenleyici (Dunn ve ark., 2002) çalışmalarla tamamlandı ve sonuç olarak kanser hücrelerinin bağışıklık gözetiminden kaçtığı belirlenmiştir. Bağışıklık düzenleme (immünoediting) teorisine göre, bağışıklık kaçıışı üç aşamada gerçekleşir; bağışıklık sistemi tarafından tümör hücrelerinin yok edilmesi ile immün gözetim periyodu, tümörün ilerlemesi (bertaraf etme) ve klinik ifadeye izin veren, denge durumuna karşılık gelen latent periyodu ve kaçış aşamasıdır. Anti-kanser immün gözetiminde önemli rolü bulunan immün hücreler, transforme olmuş hücrelerin büyümesini engeller ve bunların çoğalarak zararlı bir hal oluşturmadan yok edilmesini sağlayabilmektedir (Aslan, 2010). Bağışıklık sistemi lenfosit T hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve makrofajlardan oluşmaktadır. Bağışıklık sistemi T alt hücresi olan Th1 ve Th2 hücreleri tarafından kontrol edilmektedir (Zhu ve ark., 2010). Th1 hücreleri adaptif immün yanıtların koordine edilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu gibi işlemleri temel olarak sitokin ve kemokinler salgılayarak hedef hücreleri aktive ederler (Mosmann ve Coffman, 1989; Murphy ve Reiner, 2002). Th1 hücreleri doğal immün sistem tarafından salgılanan interferon gama (IFN- γ) ve IL-12 aracılığıyla farklılaşmaktadır. Bu farklılaşmadan sonra Th1 efektör hücreler IFN- γ , TNF- α gibi sitokinler makrofaj, NK hücreleri ve CD8+T hücrelerini uyaran proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterizedir (Williams ve Bevan, 2007). Th2 hücreleri humoral bağışıklığı artıran interlökin IL-4 ve IL-10 gibi tip II sitokinleri salgılayarak (antikor bazlı anti-tümör yanıt) bağışıklık sisteminde rol oynamaktadır (Steinman ve ark., 1991).



Şekil 2.3. CD8+T hücrelerinin TRAIL/TRAIL Reseptör aracılığı ile gerçekleştirilen tümör hücrelerinin apoptozis yolağı

Virüslere, hücre içi bakterilere ve tümörlere karşı immün korumada CD8⁺ T hücreleri immünopatoloji veya tümörlere immün aracılı hasar oluşturabilen, immün tepkilerde görev yapmaktadır. CD8⁺ T, CD4⁺ T hücreleri gibi timusta üretilir ve T hücre reseptörünü (TCR) eksprese eder. CD4⁺ T ve CD8⁺ T hücreleri fonksiyonel olgunluğa ulaşmak için benzer farklılaşma sürecine uğrar fakat enfeksiyona karşı edinsel immün cevapta farklı görevler üstlenirler. CD8⁺ T hücreleri sitotoksik T hücreler (CTL) olarak adlandırılmaktadır. CD8⁺ T hücresi antijeni tanıdığında ve aktif hale geldiğinde enfekte hücreleri ya da malign hücreleri öldürmek için üç ana mekanizmaya sahiptir. Birincisi anti-tümör ve anti-viral mikrobiyal etkileri olan sitokinlerin özellikle TNF-a ve IFN- γ 'nın salgılamasıdır. İkinci ana fonksiyon sitotoksik granüllerin üretilmesi ve salınmasıdır. Bu granüller perforin ve granzim içermektedir. Granzimler hücre içindeki proteinleri parçalayan, viral proteinlerin üretimini durduran ve sonuçta hedef hücrenin apoptozisi ile sonuçlanan serin proteazlarıdır (Williams ve Bevan, 2007). Enfekte hücrelerin CD8⁺ T hücresi yıkımının üçüncü ana işlevi Fas/FasL, TRAIL /TRAIL-R etkileşimleridir. Aktive edilmiş CD8⁺ T hücreleri hedef hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanan (TRAIL-R) hücre yüzeyindeki TRAIL'ı eksprese eder (Gimme ve ark.,

2010). Bu bağlanma sonucunda oluşan sinyal molekülleri kaspaz kaskadı aktivasyonu ile sonuçlanır ve hücrenin apoptozuna yol açar.

Bağışıklık sisteminde diğer bir sitotoksik etki doğal öldürücü (Natural Killer-NK) hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalarda NK hücrelerinin, kolon ve meme kanseri gibi birçok insan kanser türünde tümör hücrelerinin büyümesinin inhibe edilmesi ve öldürülmesinde önemli bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (Vivier ve ark., 2008). NK hücreleri bağışıklık sisteminin sitotoksik hücreleri olup aynı zamanda doğal ve adaptif bağışıklığa önemli ölçüde katkı sağlamaktadır. NK hücreleri hücre zarının yüzeyinde bulunan inhibe ve aktive edici reseptörleri sayesinde immün sürveyansıyla alakalı birçok görev üstlenmektedir. Normal koşullar altında NK hücreleri inaktif durumdadır. Ancak reseptörler aracılığıyla aktive edildiğinde sitotoksik etkiler gösterir ve tümör hücrelerini bu şekilde öldürebilir. Yapılan birçok hayvan deneylerinde, NK hücreleri az gelişmiş farelerde kanser oranlarının diğerlerine göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Peng ve Tian, 2016). NK hücreleri immünomodülatör etkilerini iki kritik fonksiyon aracılığıyla göstermektedir. Birincisi NK hücreleri malign bir dönüşüm geçirmiş veya enfekte olmuş hücreleri doğrudan tanıyıp parçalayabilen lenfositlerdir (Zhang ve Huang, 2017). NK hücrelerinin sitolitik işlevi degranülasyon ve ölüm reseptörü ligasyonu dahil olmak üzere çeşitli işlemler aracılığıyla başlatılabilir ve hastalıklı ya da normal işlevini kaybetmiş hücrelerin yok edilmesini sağlayabilir (Stabile ve ark., 2017). İkinci yol ise NK hücreleri aktivasyon sinyallerine cevap olarak çeşitli enflamatuvar sitokinler üretebilir (Freeman ve ark., 2015).

2.4.4.1. NK hücreleri, NKG2D reseptörü ve NKG2D ligandı

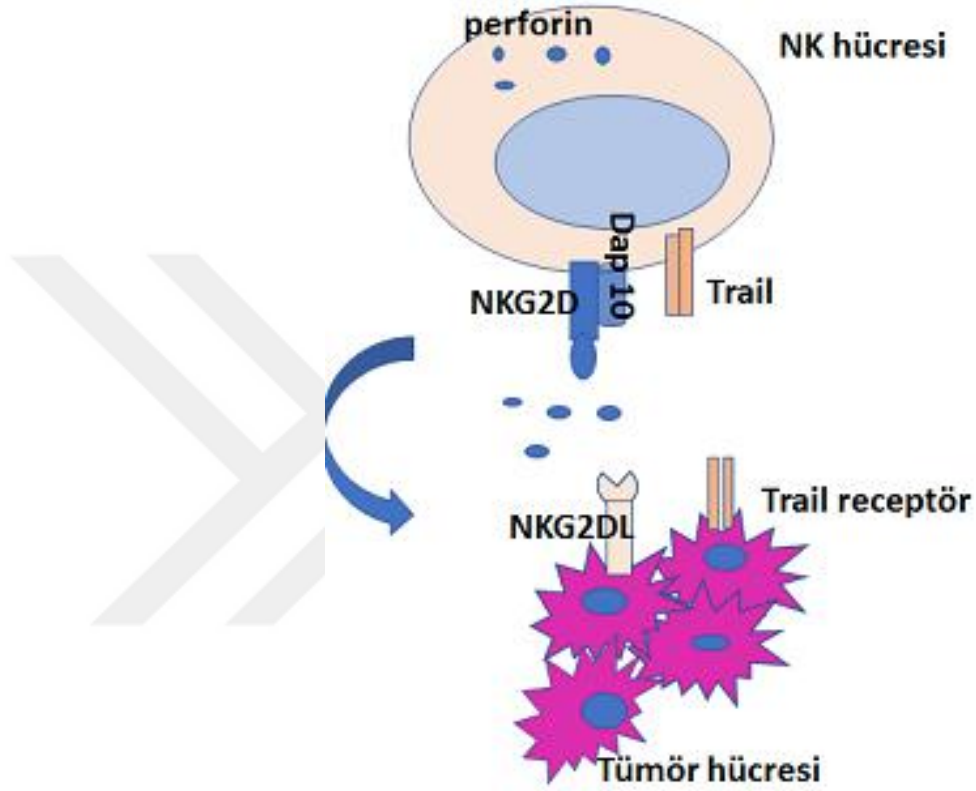
Son 20 yıldır NK hücrelerinin malign hücreleri nasıl tanıdığı ve ortadan kaldırmasını sağlayan mekanizmaların anlaşılmasında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda NK hücre yüzeyinde immün sistemi aktifleştiren veya inhibe edebilen reseptörlerin bulunduğu saptanmıştır. NK hücrelerini inhibe eden reseptör ailesi, öldürücü immünooglobulin benzeri reseptörler (Killer-cell immunoglobulin-like receptors - KIR) veya Ig benzeri reseptörlerini (CD158), C tipi- lektin reseptörlerini (CD94-NKG2A) ve lökosit inhibitör reseptörlerini (LIR1, LAIR1) içermektedir.

Aktive edici reseptörler ise doğal sitotoksikite reseptörleri (Nkp46, Nkp44), C tipi-
lektin (NKG2D, CD94-NKG2C) ve Ig benzeri reseptörlerdir. Bunlardan en önemlisi
ise NK aktivasyonuna katılan hücre yüzey reseptörü doğal öldürücü grup 2D
reseptörüdür (Naturel Killer Group 2- NKG2D). NKG2D reseptörü hücre zarı dışında
C-tipi lektin benzeri tip II transmembran glikoproteindir ve homodimer yapıya sahiptir.
İnsan *NKG2D* geni kromozomun 12p13.2 'nin *NKG2* gen kompleksinde bulunur. Bu
ailenin üyeleri; NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2D, NKG2E ve NKG2F'dir.
NKG2A, B, C ve E %94-95 düzeyinde aminoasit homolojisi gösterirken NKG2D
sadece %21 oranında homoloji göstermektedir. NKG2C, NKG2D ve NKG2E aktive
edici özelliğe sahiptir. NKG2D, doğal katil T hücreleri (NKT), CD8+T hücreleri, y8T
hücreleri gibi birçok hücrede eksprese edilmektedir. İnsan CD8+T hücreleri *NKG2D*'yi
eksprese edebilirken, farelerde ise *NKG2D* ekspresyonunu sadece herhangi bir
patolojik aktivasyondan sonra düzenlemektedir. Farelerde NKG2D sinyalleşme
kompleksinin iki adet izoformu bulunmaktadır. Kısa kol (NKG2D-S) izoformu 2
adaptör proteinine (DAP 10 /DAP 12) bağlanabilirken, uzun kol (NKG2D-L) izoformu
DAP 10 ile etkileşime girebilmektedir. İnsanlarda ise sadece NKG2D-L izoformu
bulunur ve sadece DAP 10 ile birleşmektedir. DAP 10 ve DAP 12 farklı sinyalleşme
basamakları oluşturmaktadır. DAP 10 disülfid bağı ile bir homodimer oluşturur ve
sitoplazmik alanı fosforilasyondan sonra p85 alt ünitesini fosfotidilinisitol-3 kinazına
(PI3K) bağlayan bir YINM motifine sahiptir. YINM motifi CD28' in sitoplazmik
alanında mevcuttur ve PI3K yolu T hücrelerinin de kostimülatör fonksiyonu için
kritiktir. Daha sonra DAP 10 VAV1 ile ilişkilendirilen büyüme faktörü reseptörüne bağlı
2 proteinine (Grb2) bağlanır. Böylece NKG2D reseptörleri NK hücrelerini ve CD8+ T
hücrelerini güçlü bir şekilde aktive edebilir ve tümör hücrelerine karşı immün yanıt
oluşturabilir (Jamieson ve ark., 2002). DAP 10 adaptör proteini ile etkileşimler
sonucunda oluşan NKG2D sinyalleri sitokin üretimini sağlamaktadır (TNF-a, IFN-y
gibi). NKG2D potansiyel olarak tehlikeli hücrelerin tanınmasında ve ortadan
kaldırılmasında önemli rol oynamaktadır. NKG2D reseptörü tümörlere, viral olarak
enfekte olmuş hücrelere ve organ nakillerine karşı immün tepkilere aracılık ettiği
gösterilmiştir. Bununla birlikte çoğu durumda NKG2D yalnızca enflamatuvar bir
bağlam meydana gelirse immün hücre aktivasyonunu gerçekleştirebilir. Hem NK hem
de T hücreleri için genellikle NKG2D 'nin etkinlik kazanabilmesi için ikincil bir sinyal
gerekmektedir (Spits ve ark., 2013).

NKG2D reseptörünün tümöre karşı immün yanıtta ana görevi kanser hücrelerinde meydana gelen immün kaçış mekanizmasını kontrol etmektir. Kanser hücreleri immün yanıtta kaçarken *NKG2D* ligandlarının (NKG2DL) ekspresyonunu baskılayarak işlevini engellemektedir. NKG2D ve NKG2DL etkileşimleri tümörlerin immün sistemden kaçış mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır. NKG2DL'ler yapısal olarak polimorfik olan MHC sınıf I protein (MIC) ailesine benzerler. İnsanlarda, NKG2D ligandları MICA, MICB ve glikozilfosfatidilinozitol (GPI) bağlayıcı yüzey molekülü UL-16 bağlayıcı protein olarak adlandırılan ULBP'dir. Yapılan çalışmalarda yedi adet MIC geni tanımlanmıştır ve bunlardan MICA ve MICB işlevsel olarak eksprese edilen genlerdir (Bahram ve ark., 1994). MICA ve MICB insanlarda en kapsamlı çalışılan NKG2DL'dir. NKG2D ligandı sağlıklı hücrelerde çok nadir eksprese edilirler (Diefenbach ve Rautel., 2001). Virüsler aracılığıyla enfekte edilmiş hücreler ya da malign transformasyona uğramış hücreler *NKG2D* ligandını eksprese edebilirler. Bu ligandları eksprese eden hücreler NK hücrelerine immün sistemi gözetleme konusunda etkin bir mekanizma sağlamaktadır. *NKG2D* ligandlarının ekspresyonun fazla olması tümör hücrelerinin tanınmasını kolaylaştırır ya da *NKG2DL*'nin ekspresyonunun baskılanması tümörlerin immün eliminasyon (bertaraf) fazından kaçmasına ve böylece metastaza sebep olurlar (Salih ve ark., 2002). Kanser immünoterapisinde NKG2D / NKG2DL'larını hedef alan çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak NKG2D ligandları kanser hücrelerinde direkt olarak düzenlenmesi basit bir stratejidir. NKG2DL'ları ile yapılan *in vivo* deneylerde tümör oluşumunu baskılayan birçok tümör hücre hattında NKG2DL'er ektopik olarak eksprese edilmiştir (Cerwenka ve Lanier, 2001). Örneğin, All-Trans Retinoik Asit (ATRA), D vitamini ve bazı histon deasetilaz inhibitörlerinin *NKG2DL* ekspresyonunu arttırdığı ve kanser hastalığı için yeni potansiyel tedavilerin ortaya çıkabileceğini bildirmiştir (Korrer ve Routes, 2015). Bazı kemoterapötik ilaçlar veya radyoterapiler bir yan etki olarak DNA hasarına sebep olurlar dolayısıyla *NKG2DL* ekspresyonunu arttırlar (Gasser ve ark., 2005).

İmmün sistem organizmalardaki tehlikeyi algılamak için birçok sinyal molekülleriyle iş birliği içerisindedir. NKG2D ve NKG2DL'in bu sinyal moleküllerinin tanınmasını sağlamak için önemli bir katkısı bulunmaktadır. Malign tümörler ya da virüsle enfekte

olan hücrelerde MIC proteinlerinin up-regulasyonu NKG2D reseptörü aracılığıyla bir yanıt oluşturmaktadır. NKG2D ile yapılan araştırmalar sonucunda, NK hücrelerinin direkt olarak stres sinyallerine yanıt verdiği ve *NKG2D* ligandlarının ekspresyon farklılıklarına göre immün yanıtta önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Boissel ve ark.,2006).



Şekil 2.4. NKG2D reseptörü tümör hücresinde bulunan NKG2DL ile bağlanarak NK hücreleri perforinler aracılığıyla tümör hücresinin yok edilmesini sağlar

2.4.4.2. NK hücre sitotoksitesini kolaylaştıran mekanizmalar

İnsanlarda, T ve B hücrelerinden sonra lenfosit popülasyonunun 3. alt grubunu NK hücreleri oluşturmaktadır. NK hücreleri hem hücrel sitotoksite göstererek hem de sitokin ve kemokin salgılayarak doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi arasında köprü görevi yapmaktadır. NK hücreleri granüllerinde perforin, granzim A ve granzim B molekülleri bulunmaktadır. Bu moleküller patojenlerin osmotik ve apoptotik olarak öldürülmesinde katkı sağlamaktadır. NK hücrelerinin sitolitik işlevinin sitoplazmik

kinazların kaskadları gibi nükleustan bağımsız olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla NK hücre sitotoksitesini düzenleyen moleküler mekanizmalar iyi tanımlanmış ve üç ana işleme ayrılmaktadır: Hedef hücre tanıma, hedef hücre teması ve immünolojik sinaps oluşumu ve NK hücre kaynaklı hedef hücrenin ölümüdür. Hedef hücrelerin NK hücreleri tarafından tanındığı ve yıkım için uygun hastalıklı hücreleri nasıl belirlediği konusunda farklı mekanizmalar tanımlanmıştır. NK hücreleri hedef hücreleri tanıdıklarında onlarla litik immünolojik sinaps oluşumu ile direkt olarak etkileşime girerken iki temel mekanizma ile NK hücre aracılı hedef hücre ölümünü başlatırlar. İlk mekanizma ekstrinsik (dış yol) apoptotik yolağı başlatan hedef hücrenin yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu kapsar (Khosravi ve Esposti, 2004). Bu reseptörler NK hücrelerinde bulunan konjuge ligandlar Fas ligandı (FASL, CD95L) ve TRAIL tarafından aktive edilen TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptörü (TRAILR) ve Fas (CD95) içermektedir. Ölüm reseptörlerinin yüzey ekspresyonu NK hücresi kaynaklı IFN- γ tarafından hedef hücrelerde ve aktivasyonları birçok pro-apoptotik sinyalizasyon programını indükleyebilir (Nagata ve Golstein, 1995). Ölüm reseptörü üst ailesi bu reseptörler ile kaspaz-8 ve kaspaz-10 dahil olmak üzere apoptotik mekanizmayı aktive etmesini sağlayan bir sitoplazmik ölüm alanının (DD) kullanılması ile karakterize edilmektedir (Guicciardi ve Gores, 2009). Başlatıcı kaspazlar, kaspaz-3 dahil olmak üzere bir IL1 dönüştürücü enzim (ICE) süper ailesi proteazlarının kaskadını teşvik eder ve apoptozom oluşumuyla sonuçlanan mitokondrial hasar ve sitokrom c salımını indüklemektedir. NK hücre aracılı sitotoksitenin ana mekanizması litik moleküllerin hedef hücre ligandlarına (NKG2DL) bağlanmasıyla oluşmaktadır. NK hücreleri bu molekülleri immünojenik sinaps zar füzyonu ile hedef hücreye iletilen sitolitik granüllerde depolamaktadır. Litik granüller içerisinde yer alan moleküller arasında 60-70 kDa gözenek oluşturucu glikoprotein, perforin, granzim, Fas-L, TRAIL ve granulosin olarak bilinen serin proteaz sınıfı bulunmaktadır. Granzim B ve perforin NK hücreli litik granüllerin kritik bir bileşenidir ve aspartik asit kalıntılarından sonra peptidleri parçalayanlar olarak sınıflandırılmaktadır (Giurisato ve ark., 2007). Hedef hücre içine girdikten sonra granzim B, kaspaz bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla apoptozu tetikleyebilmektedir. Granzim B apoptotik başlatıcı kaspaz-8'in yanı sıra kaspaz-3 doğrudan parçalayarak apoptotik yoldaki çoklu noktalarda kaspaz bağımlı apoptozu aktive etmektedir (Crowder ve El-Deiry, 2012). Ayrıca granzim B kaspazdan bağımsız

olarak apoptozu indükleyebilir ve pro-apoptotik proteinin Bid'in proteolitik bölünmesi yoluyla mitokondriden sitokrom c salımını indükleyebilmektedir (Pinkoski ve ark., 2001).

2.5. Tümör Tedavisine Yaklaşım

Kanser biyolojisini anlamada yeni tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde dikkat çeken gelişmeler olmasına rağmen kanser hala ölüm nedenlerinin ana sebebi olmaya devam etmektedir. Kanser tedavisinde uygulanan çoğu terapötiklerin amacı tümörün metastazını engellemek ve apoptozu uyarmak için uygulanmaktadır. Uzun yıllardan beri kanser tedavisinde yaygın olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi olmak üzere üç büyük yöntem kullanılmaktadır (Miller ve ark., 2016). Radyoterapi veya kemoterapötik birçok ajan kanser hücrelerini öldürme kabiliyetlerinden dolayı bu hastalığın tedavisinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntemler hızla bölünen hücrelerin öldürülmesinde etkilidir ve artan dozun miktarına göre bu etkinlikleri artmaktadır. Ancak çoğu zaman kullanılan bu yöntemler kanserli hücreler ile normal hücreler arasındaki farkı ayırt edemediğinden kanserli hücrelerle birlikte normal sağlıklı hücrelerinde büyük hasara uğrama ihtimalleri bulunabilmektedir. Dolayısıyla tedavi sırasında veya sonrasında birtakım ağır yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca birçok kanser bu tedavi yöntemlerine karşı direnç oluşturur ve tedaviye yanıtı etkisiz hale getirmektedir. Dolayısıyla, kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni terapötik çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

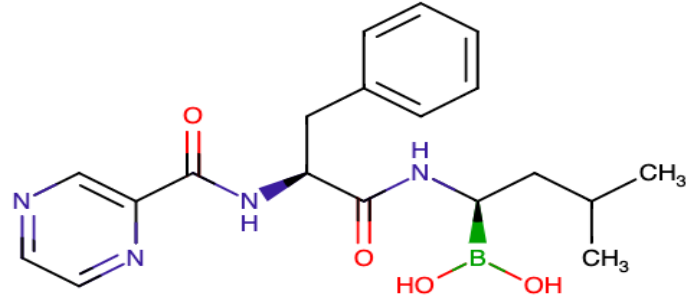
Tümör biyolojisinin ve tümör immünolojisinin tümör mikro-ortamı ile nasıl etkileşime girdiğinin daha iyi anlaşılmasıyla hedeflenen kanser terapötiklerinin yanı sıra immün terapötiklerinin de gelişimini arttırmıştır (Kaufmann ve Simon, 2015). APO2 Ligand (APO2L) olarak adlandırılan tümör nekroz faktörü (TNF) ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) insan hayatı için önemli olan sağlıklı hücreleri korurken, kanser hücrelerini öldürme kapasitesinin keşfedilmesi anti-tümör tedavilerinin geliştirilmesinde ümit verici olmuştur. TRAIL sitokinlerin TNF süper ailesine aittir ve iki eşlenik ölüm reseptöründen (DR), TRAIL-R1/ DR4 ve TRAIL-R2/ DR5 birbirine bağlanarak hücrelerde apoptozu indükleyebilmektedir. TRAIL keşfinden bu yana çok sayıda raporlar bu reseptörlerin tümör baskılayıcı etkilerinin olduğunu ortaya

çıkarmıştır. İlk olarak çeşitli tümör hücreleri birincil hücrelerle karşılaştırıldığında TRAIL' e karşı hassasiyetlilik gösterir (Wiley ve ark., 1995; Griffith ve Lynch, 1998). İkicisi, rekombinant TRAIL proteinin (bir adenovirüs kullanarak TRAIL c DNA uygulanması) *in vivo* ve *in vitro* deneylerde tümör hücrelerinin elimine edilmesinde oldukça etkili olduğu gözlemlenmiştir (Cacan ve ark., 2015). Üçüncüsü T hücreleri, NK hücreleri, B hücreleri ve monositleri içeren çeşitli hematopoetik hücrelerin tip I ve tip II interferon (IFN) ile uyarılması TRAIL ekspresyonunu indükler ve anti-tümör aktivitesini başlatır (Kemp ve ark., 2004). Tüm bu etki mekanizmalara ek olarak TRAIL ifadesi çeşitli kanserlerde down-regüle edilir ancak TRAIL proteinin restorasyonu yapıldığında kemoterapötik ilaçlara karşı *in vitro* ortamda duyarlılığı arttırdığı saptanmıştır (Cacan, 2017).

Primer tümörlerin TRAIL ile etkili bir şekilde tedavi edilmesinde önemli bir engel bulunmaktadır. TRAIL aracılı tedavide genellikle tümör hücreleri TRAIL'e karşı direnç mekanizmaları kazanmaktadır. Bazı çalışmalarda kemoterapötik ilaçların birlikte uygulanmasının kanser hücrelerini TRAIL'in indüklediği apoptoza karşı duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Cacan, 2017; Lim ve ark., 2011). Bununla birlikte kemoterapötikler, kanser hücresi seçiciliğinden yoksundur ve hedef olarak normal hücreleri de öldürerek insan vücuduna ciddi hasar veren etkilere sebep olmaktadır. Dolayısıyla kemoterapötiklerle veya diğer hassaslaştırıcı bileşiklerle kombinasyon halinde kullanıldığında TRAIL 'in tümör hücreleri için spesifikliğini geliştirerek bu olumsuz sonuçların ortadan kaldırılması düşünülmektedir. Esas olarak TRAIL ile tedavi yaklaşımlarında 2 hedefleme yöntemleri kullanılmaktadır. İlk yöntem geçirgenlik-tutma (EPR) etkisine dayalı pasif hedefleme, ikincisi ise TRAIL 'i hedefleyen antikör fragmanları veya peptidleri kullanarak aktif hedeflemeyi kapsamaktadır.

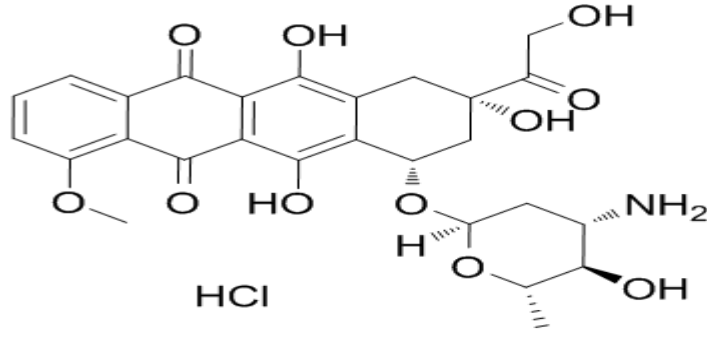
2.6. Bortezomib ve Epirubisin

Bortezomib, ubiquitin-proteozom mekanizmasını etkileyerek kanserli hücrelerin ölmesini tetiklemektedir (Adams 2003). Ubiquitin-proteozom yolu hücre içindeki hasarlı, yanlış katlanmış ve kısa ömürlü proteinlerin yıkımında önemli roller oynayan bir proteolitik yoldur. 26S proteozom, ökaryotik hücrelerin çekirdeği ve sitoplazmasında bulunan 19S düzenleyici ve 20S ana alt bileşenler tarafından oluşturulan geniş bir protein kompleksidir. 26S proteozomu, lizozomal olmayan temel protein bozunum mekanizmasıdır. Dolayısıyla 26S proteozomun inhibisyonu, protein döngüsünü değiştirerek hücrel homeostatik ilişkileri etkiler. 26S'nin engellenmesi ayrıca transkripsiyonel düzeyde çok sayıda hedef genin ekspresyonunu, transkripsiyonun stabilitesini arttırarak değiştirir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada hücre içerisindeki yanlış protein katlanmaları ve kısa ömürlü proteinlerin hücre içerisinde birikmesi sonucu endoplazmik stres oluşturduğu bununda immünojenik hücre ölümünü tetiklediği ortaya konulmuştur (Rufo ve ark., 2017). Bir ölüm reseptörünün bir başka tümöre karşı apoptotik sinyale katkısı her tümör hücresinde farklılık göstermektedir. Bazı kanser hücrelerinde ise DR5 / DR4'ün indüklenmesi TRAIL kaynaklı apoptozun bortezomib ile arttırıldığı gösterilmiştir (Cacan ve ark., 2015; Voortman ve ark., 2007). Bortezomib, TRAIL indüklenmesinde kaspaz-3 aracılıklı apoptozu aktive eder, hücre döngüsünün engellenmesi ve adhezyon moleküllerinde değişiklikler ve TRAIL direncinde üstesinden gelemektedir (Chen ve ark., 2009). Cacan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda ise proteozom inhibitörleri, tümör hücrelerini sitotoksik T lenfositlerine karşı duyarlılaştırarak FAS ve TRAIL aracılı immünojenik apoptozu tetiklediği gözlemlenmiştir (Cacan ve ark., 2015).



Şekil 2.5. Bortezomib'in kimyasal birleşimi

Son yıllarda anti-kanser ilaçları ile diğer deoksiriboz nükleik asit (DNA) hedefli moleküller ve DNA arasındaki etkileşimlerin özelliklerine karşı ilgi artmaktadır. Bazı anti-kanser ilaçlarının DNA ile etkileşimleri çeşitli tekniklerle incelenmiştir. DNA bölgelerinin tanınmasını belirleyen bu faktörlerin, nicel bir anlayışı kemoterapide uygulama için yeni DNA hedefli moleküllerin rasyonel tasarımında ve DNA hibridizasyonuna dayalı biyoteknoloji araçlarının geliştirilmesinde önemli yer tutmaktadır. Bir anti kanser ilacı olan epirubisin'in DNA'nın baz çiftleri arasına bağlanarak DNA ve RNA sentezini engelleyen kompleks oluşturmaktadır (Zhang ve ark., 2014). Bu kemoterapötik ilaç, aynı zamanda topoizomeraz II ile DNA'nın kesilmesini tetikleyerek hücre ölümüne yol açan mekanizmaları aktifleştirmektedir. Epirubisin ayrıca polimeraz aktivitesinde inhibe ederek gen ekspresyonunun düzenlenmesini de etkiler ve DNA da serbest radikal hasarı oluşturma kabiliyetine sahiptir (Moretti ve ark., 2013). Epirubisin, ameliyat sonrası meme kanseri tedavisinde diğer kemoterapötik ilaçlarla da kullanılabilen bir antrasiklin ajan olarak bilinmektedir. Epirubisin, geniş spektrumlu tümör hücrelerine karşı anti-tümör etki gösterebilir. Ancak spesifik olmayan bir kemoterapötik ajan olduğundan uygun dozlarda kullanılmadığı takdirde yüksek toksisiteye sebep olabilir. Yapılan çalışmalarda, epirubisin'in tümör hücrelerinde immünojenik bir markır olan kalretikulin salınımını başlattığı gözlemlenmiştir (Obeid ve ark., 2007). Epirubisin, diğer kemoterapötik ajanlarla kullanıldığında meme kanserindeki anti-tümör etkisinin daha da arttığı gözlemlenmiştir (Wu ve ark., 2016; Nasr ve ark., 2014). Dolayısıyla epirubisin'in yine immünojenik başka bir ajanla kullanılması, tümör immünojenitesini indükleyeceğini ve immünolojik hücre ölümünü arttıracığı düşünülmektedir.



Şekil 2.6. Epirubisin'in kimyasal birleşimi

Anti-kanser ajanların kombinasyon uygulamaları karsinoma hücrelerinin FAS ve TRAIL reseptörleri aracılığıyla apoptoza olan duyarlılığı daha fazla arttırmaktadır (Zhang ve ark., 2004). Ayrıca kombinasyon tedavisi tümöre özgü CD8⁺ T hücreleri aracılıklı tümör hücrelerinin öldürülmesini önemli derecede arttırmaktadır. Sitotoksik T hücreleri veya NK hücreleri tarafından öldürülmesini geliştirmenin bir yolu da tümör hücrelerinde ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu arttırmaktır. TRAIL, NK hücreleri ve CD8⁺ T hücrelerinde eksprese edilmektedir ve tümör hücrelerini immün sistem tarafından öldürmek ve kanserli olmayan hücrelere karşı daha az sitotoksiteye sahiptir. Aynı zamanda kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen doğal bir mekanizmanın parçasıdır. Bortezomib ve epirubisin 'in düşük dozlarda ayrı ayrı ya da kombinasyon şeklinde kullanılması kolorektal kanser hücreleri *in vitro* koşullarda NK ve $\gamma\delta$ T tarafından parçalanmaya duyarlı hale getirip getiremediği ve bu kombinasyonun klinik konsantrasyonunun NK hücrelerinin işlevini doğrudan etkisi bilinmemektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında kullanılan HTC116 ve SW620 kolorektal kanser hücre hatları Dr. Charlie Garnett-Benson (Georgia State University, Atlanta, GA, USA) tarafından sağlanmıştır. Normal kolorektal CCD18-Co hücre hattı American Type Culture Collection dan satın alınmıştır. Bu hücreler – 86 °C’den çıkarılarak T75 flasklarda kültüre edilerek 37°C inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra tripsin ile muamele edilerek 96 kuyucuklu pleytlere aktarılmıştır. Daha sonra Bortezomib ve Epirubisin ayrı ayrı ya da kombinasyon şeklinde farklı dozlarda uygulanarak inkübasyona bırakılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda kullanılan bu ilaçların sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için Hücre Canlılık Testi olan MTT uygulanmıştır. Ayrıca mRNA izolasyonu yapılmıştır. Total mRNA izolatları cDNA ya çevrilerek bazı genlerin ekspresyonların seviyelerine bakmak için Real-Time PCR deneylerinde kullanılmıştır. Tüm bu deneyler en az üçer defa tekrarlanıp bir Graphpad programı kullanılarak analiz edildi.

3.1 Hücre Kültürü

Normal kolorektal CCD18-Co hücre hattı ile metastatik özelliğe sahip kolorektal kanseri HCT116 ve SW620 hücre hatları -86 °C ya da azot tankında saklanmıştır. Tüm hücre hazırlama işlemleri laminar kabinde (Esco class II type A2), steril ortamda gerçekleştirildi. -86 °C’ dan çıkarılan hücreler oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra her hücre hattına uygun media kullanarak flasklara ekim yapıldı. CCD18-Co ve SW620 hücre hatları için %10 (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS), %2 (v/v) Penisilin-Streptomisin (Biological Industries) ve %0,22 (wt/v) NaHCO₃ (Serva, Almanya) ilave edilen katkılı EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Biological Industries) kullanıldı. HCT116 hücre hattı için McCoy's 5A (Sigma) medium hazırlandı. Konfluent hücreler belirli yoğunluğa ulaştıktan sonra pasajlandı. İlk olarak T75 flasklarda bulunan hücrelerin medium uzaklaştırıldı, PBS ile yıkandı daha sonra 37 °C'ye ısıtılan 3 mL tripsin (Biological Industries) flaska ilave edildi. T75'lik flasklar yaklaşık 2-3 dakika süreyle 37 °C inkübasyona bırakıldı. Hücreler flasklardan ayrıldıktan sonra 10 mL önceden oda sıcaklığına getirilmiş medium eklendi. Serolojik steril pipetlerle yapılan pipetajdan sonra, flasklardaki hücreler 50 mL

falkon tüplere aktarıldı ve 2000 rpm'de 4 dakika santrifüjlendi. Tripsin uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler tekrar 10 mL medium içerisinde çözündürüldü ve hücre yoğunluğu göz önünde bulundurularak, istenen dilüsyonlarda flasklara ekim yapıldı. Bir T75 flaskındaki toplam hacim 20 mL'ye tamamlandı. Hücreler arası yoğunluğu ayarlamak amacıyla hücreler sürekli kontrol edildi ve ölü hücreleri uzaklaştırmak için aralıklı olarak mediumları değiştirildi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında ise sayım yapılarak ilgili deneylerde kullanılmıştır.

3.2. Hücre canlılığı ölçümü ve IC₅₀ değerinin belirlenmesi

Bortezomib (Woburn, MA, USA) ve epirubisin'in (Toronto Research Chemicals, Kanada) ayrı olarak ya da kombinasyon şeklinde kültüre edilen normal ve kanserli kolorektal hücre proliferasyonuna olan etkilerini ve IC₅₀ değerlerini ölçmek amacıyla MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid] testi uygulandı. Hücreler farklı dozlarda bortezomib ve epirubisin'in ile ayrı olarak ya da kombinasyon şeklinde 48 saat inkübe edildikten sonra MTT (Serva, Almanya) test protokolü uygulandı. Bu test MTT'yi mavi, çözünmeyen formazan bileşiğine dönüştürebilen dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçmektedir. Uygulanan materyalin sitotoksik etkisi nedeniyle hücrede dehidrogenaz aktivitesinin etkilendiği durumlarda mavi renkli formazan oluşmamakta, formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu çalışmada spektrofotometre ile optik yoğunluğun ölçülmesiyle belirlenmiştir. Hücreler her kuyucuk için 7.500 olacak şekilde 96 kuyucuklu pleytte 200 µL olacak şekilde ekildi. Önceden hazırlanan 12 mM MMT stok solüsyonundan 10 µL alınıp her kuyucuğa ilave edildi. Negatif kontrol olarak, yine MMT stok solüsyonundan 10 µL alınıp içerisinde sadece 100 µL media bulunan kuyucuğa ilave edildi. Hücreler daha sonra 37°C'de 3.5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra daha önceden hazırlanan 0.01 M SDS (sodium dodecyl sulphate)-HCl çözeltisinden 100 µL alınıp her kuyucuğa ilave edildi ve tekrar 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra örnekler bir pipet yardımıyla karıştırıldıktan sonra 570 nm'de absorbansları okundu.

Sonuçlar % hücre inhibisyonu olarak rapor edildi, çözücü ile muamele edilmiş hücrelerin optik densitesi %100 olarak kabul edildi. Tüm maddeler hem normal hem de kanser hücre hatları kullanılarak 3 kez test edildi. Test maddelerinin IC₅₀

konsantrasyonlarının (%50'sinin proliferasyonunun inhibe ettiği konsantrasyon) belirlenmesi için her bir test maddesinin belirli bir aralıkta logaritmik olarak artan konsantrasyonlarının hücreler üzerinde MTT yöntemleriyle test edilmesi sonrasında elde edilerek absorbans değerlerinden hazırlanan standart eğri üzerinden belirlendi. MTT testi sonucunda aşağıda planlanan deneylerde kullanılacak optimum doz bu şekilde hesaplandı.

3.3. Total mRNA İzolasyonu ve Quantitatif Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Bu çalışmada, kombinasyon muamelesinin immünojenik hücre ölümünde görev alan bazı genlerin ifadeleri üzerindeki etkileri quantitatif gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile belirlendi. DR4 (TRAIL-R1), DR5 (TRAIL-R2), NKG2D/NKG2DL immünojenik hücre ölümünde görev alan önemli genlerdir. Bu genlerin tümör hücrelerine uygulanacak kombinasyon muamelesi sonucu transkripti nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla spesifik primerler kullanılarak qRT-PCR yöntemi uygulandı. Bu amaçla öncelikle hücreler yukarıda belirtildiği gibi bortezomib, epirubisin ya da her ikisinin kombinasyonu ile 24 saat muamele edildikten sonra hücreler alınarak mRNA izolasyonu yapılmıştır. Kullanılan uygun bortezomib, epirubisin dozları yukarıda bahsedilen MTT deneyinin sonucuna göre belirlenmiştir.

RNA izolasyonu için, T25 flasklara 750.000 hücre ekildi ve hücrelerin flaska tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda bortezomib ve epirubisin ayrı ayrı ya da kombinasyon şeklinde flasklara eklendi. Daha sonra 37°C 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu sonrası medium hücrelerden uzaklaştırıldı ve pleytler soğuk Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sartorius, Almanya) ile yıkandı. Bu işlem sırasında hücrelerin zarar görmemesine dikkat edildi. Hücreler daha sonra tripsin yardımıyla flaskların yüzeyinden kaldırıldı ve media eklenerek falkon tüplerine aktarıldı ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası biriken pelletin üzerine 1 mL QIAZOL lizis reaktifi (Qiagen-Almanya) ilave edili ve oda sıcaklığında 5 dk alt-üst edildi. Sonrasında 1.5 mL lik steril ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 200 µL kloroform (Amresco, ABD) eklenerek hafifçe alt üst edildi. 12.000 rpm 4 °C, 15 dk santrifüjlendi. Üst faz diğer kısımlara karıştırılmadan mikropipetle dikkatli bir şekilde

alınarak yeni steril eppendorflara aktarıldı. Üzerine 500 uL izopropanol (Amresco, ABD) eklendi. Hafifçe alt-üst edilerek oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi ve sonrasında 12.000 rpm, 4 °C de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant döküldü (dipte kalan RNA) ve her eppendorfa 1 mL %75'lik ethanol (Isolab) ilave edildi. 3000 rpm'de 4 °C 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant dökülerek pelletler kısa süreli kurumaya bırakıldı. Son olarak RNA peletleri RNAaz-içermeyen saf steril su içerisinde çözdürüldü ve konsantrasyonları Multiskan Go cihazı kullanılarak ölçüldü. İzole edilmiş RNA örnekleri RT-PCR deneylerinde kullanılana kadar -86 °C muhafaza edildi. RNA kalitesini düşürmemek için yoğun donma-çözülme döngüleri önlendi.

RNA izolasyonundan sonra qRT-PCR yardımıyla gen ifadeleri belirlendi. *DR4*, *DR5* ve *NKG2DL* ekspresyonları kontrol geni olan GAPDH oranına normalize edildi. RT-PCR deneylerinde, WizPure qRT-PCR Master (Super Green) One-Strep Real Time PCR kiti (Wizbiosolutions, Seongnam, Kore) kullanıldı.

qRT-PCR reaksiyon koşulları şu şekilde gerçekleştirildi:

- qRT-PCR Master (Super Green) (10 ul, 1x),
- 10 uM forward primer (1 ul),
- 10 uM revers primer (1 ul),
- RNA (<500 ng / reaksiyon),
- RNaz bulunmayan su (20 ul'ye kadar).

Bir adımlı Real Time RT-PCR koşulları yapıldıktan sonra:

- Ters transkripsiyon için (42- 55 C, 10-30 dakika, 1 döngü)
- Başlangıç denatürasyonu (95 C, 5 dakika, 1 döngü), daha sonra (95 C, 10- 30 saniye, 30- 45 döngü)
- Annealing (yapışma) (algılama, 55-68 C, 10-60 saniye, 30-45 döngü),
- Uzama (65- 95 C, 2-5 sn / 1 döngü).

LightCycler kapiller (20 ul, Roche), Roche LightCycler 1.5 Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ile birlikte kullanılmıştır. Verileri elde etmek için Instrument yazılımı kullanıldı.

Tablo 1: qRT-PCR da gen ifadesini belirlemek amacıyla kullanılan primerler.

DR4	Forward: 5'- CTG AGC AAC GCA GAC TCG CTG TCC AC -3' Reverse: 5'- TCA AAG GAC ACG GCA GAG CCT GTG CCA -3' NBCI Accession: NM-003844.4
DR5	Forward: 5'- GGG AGC CGC TCA TGA GGA AGT T -3' Reverse: 5'- GGC AAG TCT CTC TCC CAG CGT CTC -3' NBCI Accession: AB014718.2
NKG2D	Forward: 5'- TCT CGA CAC AGC TGG GAG ATG -3' Reverse: 5'- GAC ATC TTT GCT TTT GCC ATC GTG -3' NBCI Accession: AJ0016887-1
NKG2DL	Forward: 5'- ATG GAA CACA GCG GGA ATC A-3' Reverse: 5'- GCA CTT TCC CAG AGG GCA C -3' NBCI Accession: NM0036104
GAPDH	Forward: 5'- AAG GTG AAG GTC GGA GTC AA -3' Reverse: 5'- AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG -3' NBCI Accession: MKHE01000022.1

3.4. İstatistiksel Analizler

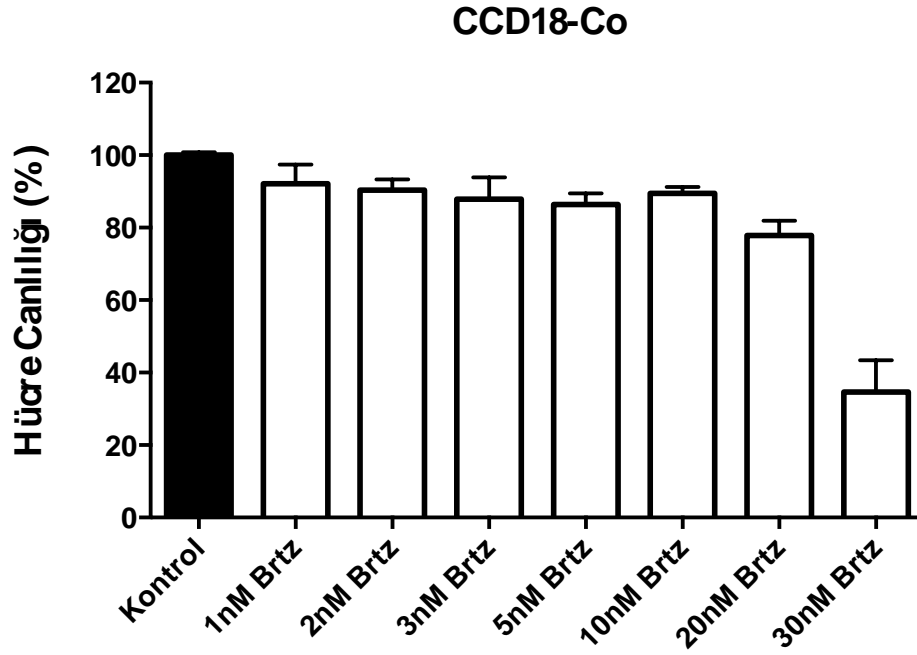
İstatistiksel analiz için GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılmıştır. Kontrol ve ilaç uygulanan hücrelerde gen ifadesinde meydana gelen değişimler, *two-tailed t* testi (parametrik olmayan) kullanılarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılığın tanımı $p < 0.05$ olarak seçilmiştir. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

4. BULGULAR

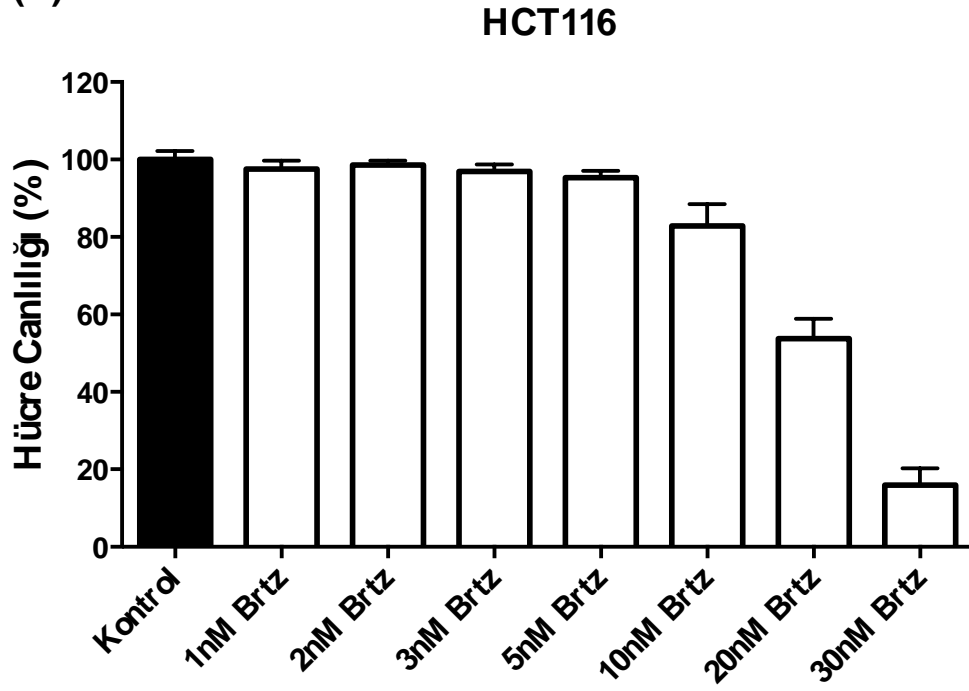
4.1. Bortezomib'in normal ve tümör kolorektal hücre hatları üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Bortezomib'in kullandığımız hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisini gözlemek için artan konsantrasyonlardaki bortezomib (nanomolar aralıkta), kolorektal kanseri (HCT116 ve SW620) ve normal (CCD18-Co) kolon hücre hatlarına uygulandı. Bortezomib'in etki aralığı her hücre hattı için ayrı olarak belirlendi. Bortezomib muamelesi kullanılan bütün hücre hatlarında 5 nM lık konsantrasyona kadar minimum bir sitotoksik etki oluşturdu ancak 10 nM konsantrasyonda tümör hücreleri üzerinde etkili olmaya başlarken, normal hücre hatlarında hala minimum bir sitotoksik etki oluşturmuştur (Şekil 4.1). Bortezomib 30 nM konsantrasyonda uygulandığında, tümör hücrelerin yaklaşık %90 nı ölürken, bu oran normal hücre hattında %50 olarak gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar neticesinde, normal kolorektal hücre hatları üzerinde minimum sitotoksik etki gösteren bortezomib'in 5 nM ve 10 nM lık konsantrasyonlarının kombinasyon uygulamalarında kullanılmasına karar verildi.

(A)

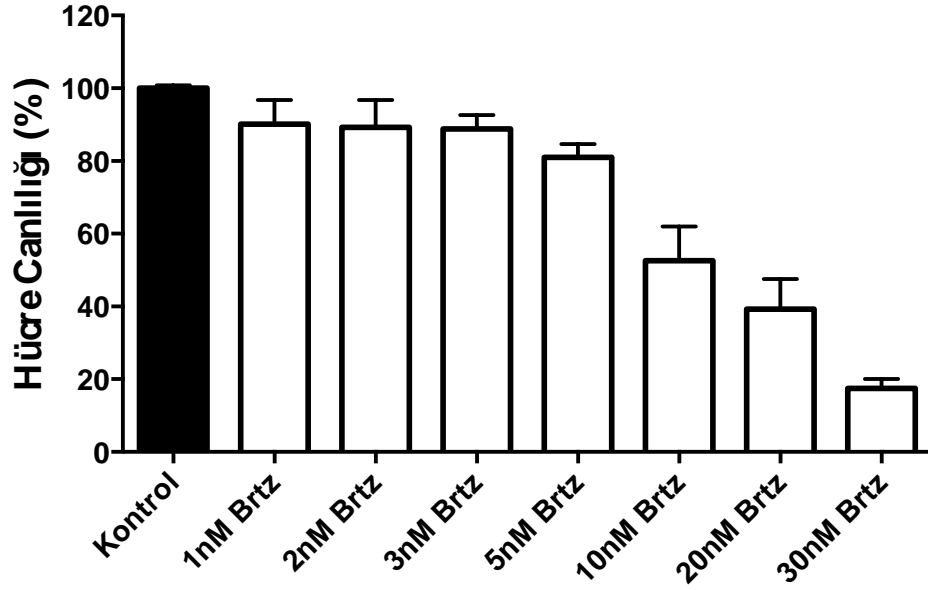


(B)



(C)

SW620

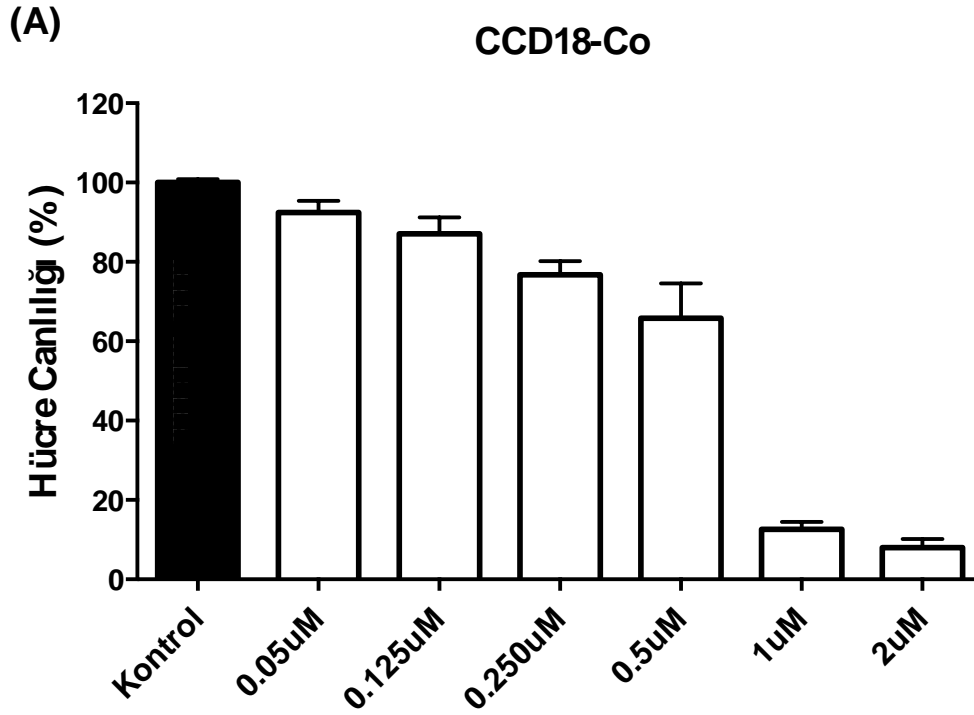


Şekil 4.1. Artan bortezomib konsantrasyonlarının normal ve tümör kolorektal hücre hatları üzerindeki etkisi. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, normal (CCD18-Co) ve tümör (HCT116 ve SW620) kolorektal hücre hatları 0 ile 30 nM konsantrasyon aralığında bortezomib ile muamele edildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Spektrofotometrede ölçümler 570 nM’de alınmış olup arkaplan ve tris-base okuma değerleri çıkarıldıktan sonraki değerler hesaba katılmıştır. Bortezomib uygulamasının (A) CCD18-Co, (B) HCT116 ve (C) SW620 hücre hatları üzerindeki etkileri.

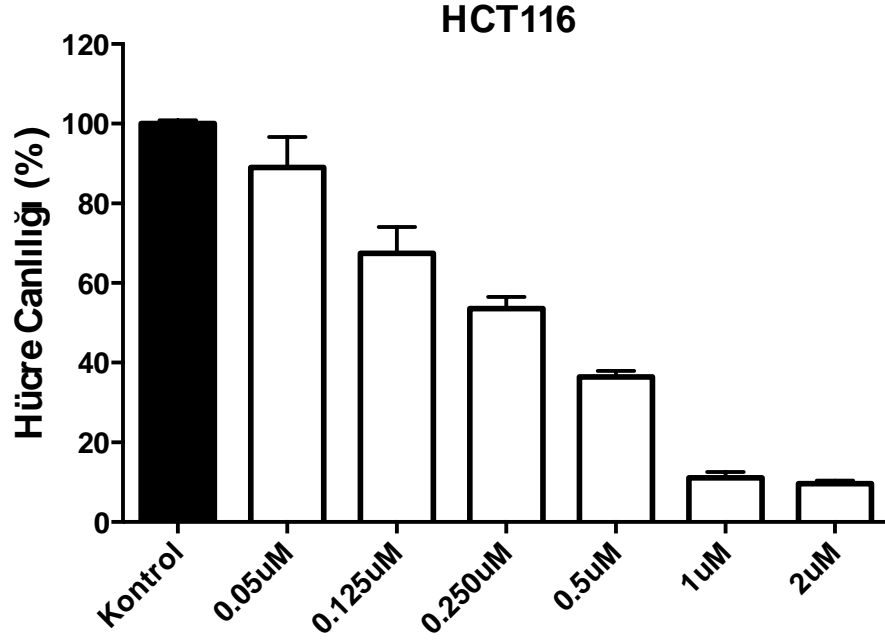
4.2. Epirubisin’in normal ve tümör kolorektal hücre hatları üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Bortezomib için uygulanan sitotoksosite testleri (MTT testi), aynı şekilde epirubisin için de uygulandı. Artan konsantrasyonlarda epirubisin uygulanan hücreler üzerinde, bu ilacın sitotoksik etkisi belirlendi (Şekil 4.2). Epirubisin muamelesi kullanılan normal hücre hattında minimum sitotoksositeyi 125 nM konsantrasyonda gösterirken, bu konsantrasyon HCT116 ve SW620 hücre hatlarında yaklaşık %30 luk bir sitotoksik

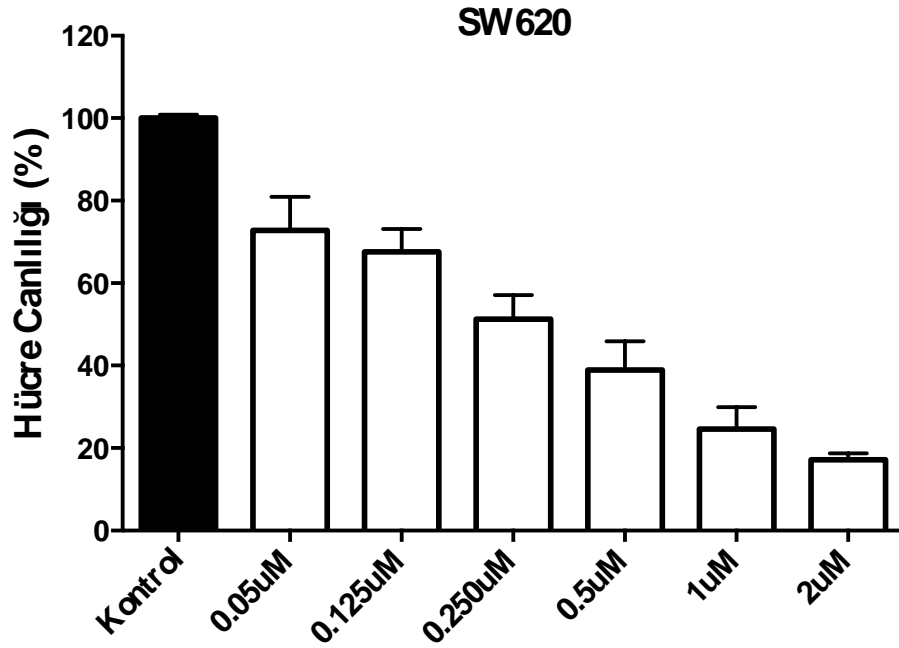
etki oluşturmuştur. Elde edilen verilerden 2000 nM lık konsatrasyonda hem normal hücreler hem de tümör hücrelerinin büyük bir kısmının ölmüş olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla, normal hücreler için minimum sitotoksik etkinin görüldüğu 125 nM ve 250 nM lik epirubisin konsantrasyonlarının kombinasyon uygulamalarında kullanılması uygun görülmüştür.



(B)



(C)



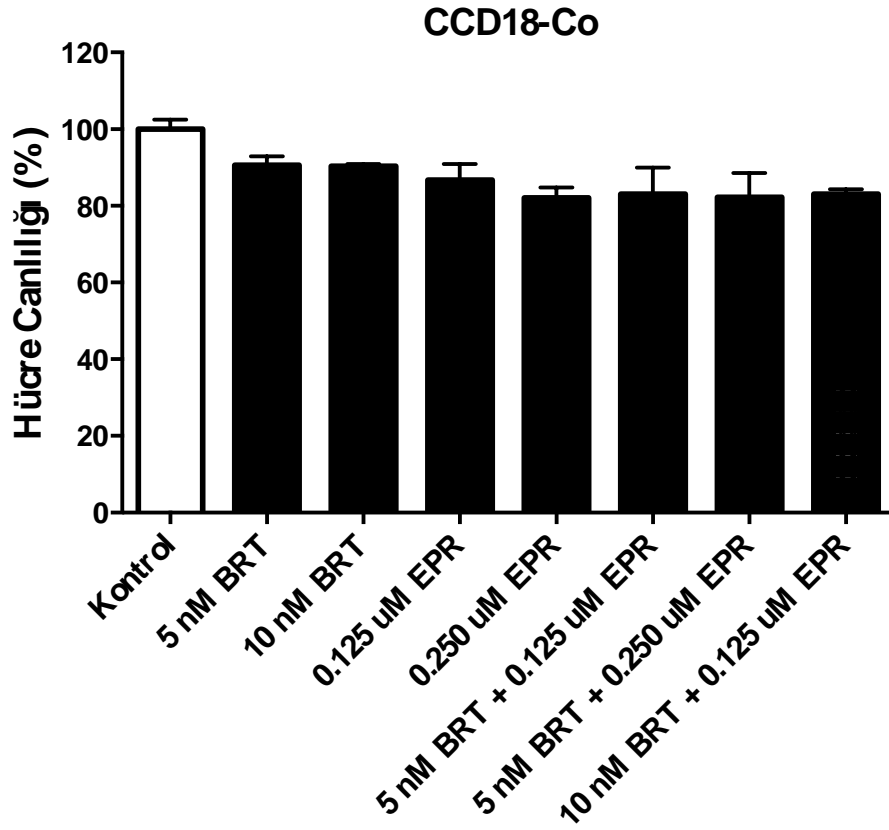
Şekil 4.2. Artan epirubisin konsantrasyonlarının normal ve tümör kolorektal hücre hatları üzerindeki etkisi. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, normal (CCD18-Co) ve tümör (HCT116 ve SW620) kolorektal hücre hatları 0 ile 2000 nM konsantrasyon aralığında epirubisin ile muamele edildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları hesaplandı. Epirubisin

uygulamasının (A) CCD18-Co, (B) HCT116 ve (C) SW620 hücre hatları üzerindeki etkileri

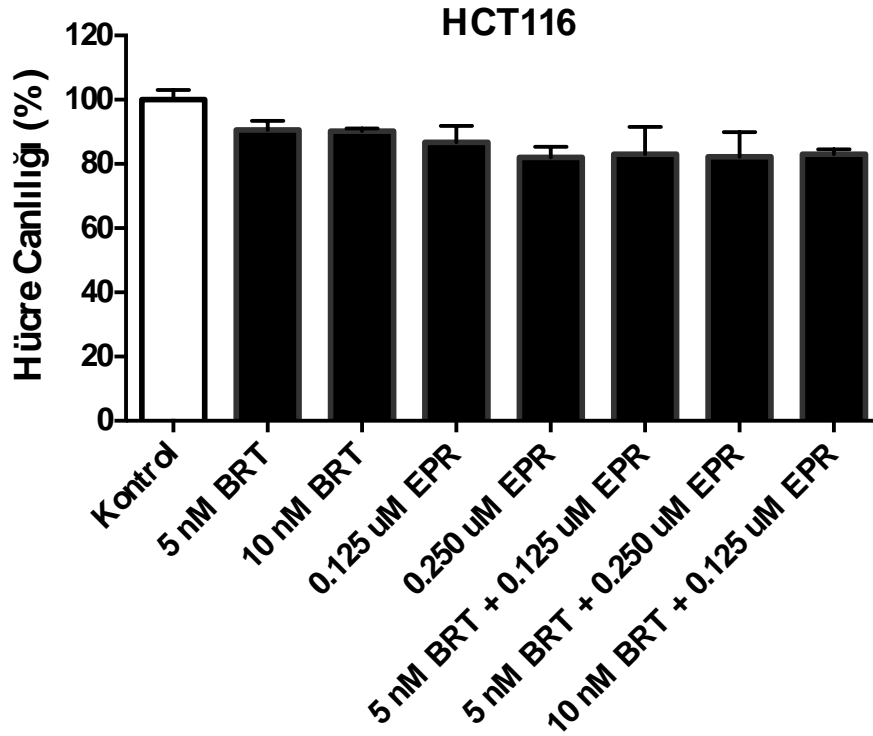
4.3. Düşük dozlardaki bortezomib ve epirubisin kombinasyon uygulamasının normal ve kolorektal tümör hücre hatları üzerindeki etkisinin belirlenmesi

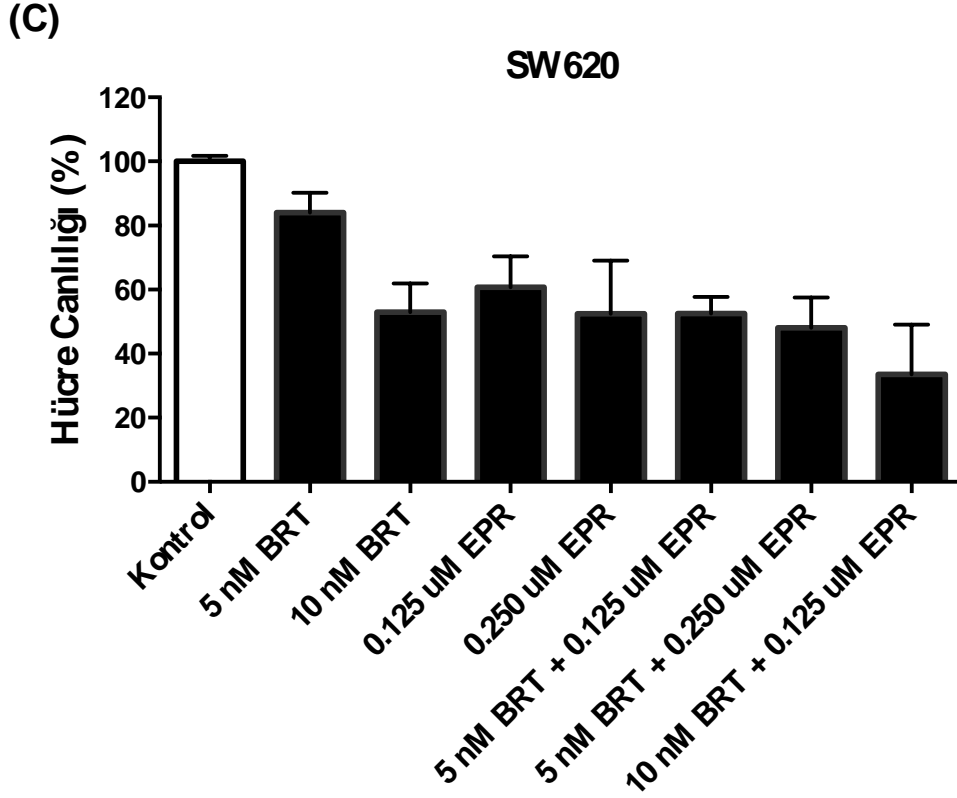
Minimum sitotoksik etkilerinden dolayı yukarıda seçilen konsantrasyonlarda bortezomib (5 nM ve 10 nM) ve epirubisin (125 nM ve 250 nM) kombinasyon halinde hücrelere uygulandı. Kombinasyon uygulamalarındaki sitotoksik etki, ilaçların kombinasyonda kullanıldıkları konsantrasyonlarda ve tek başlarına uygulandıkları durumdaki sitotoksik etkiyle karşılaştırıldı. Kontrol amaçlı olarak kullanılan normal CCD18-Co hücrelerinde kombinasyon uygulaması, bortezomib ve epirubisin tek başına uygulandığı durumlara göre kayda değer bir sitotoksikite oluşturmadı (Şekil 4.3). Ancak tümör hücrelerinde 10 nM bortezomib ve 250 nM epirubisin kombinasyon halinde uygulandığında, bu tümör hücrelerindeki sitotoksik etkinin arttığı gözlemlendi. Bu çalışmadaki amaç kemoterapötik ilaçların yüksek konsantrasyonlarda uygulanıp tümör hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki oluşturmalarından ziyade immünojenik bir hücre ölümünün başlatılması olduğundan, 10 nM bortezomib ve 250 nM epirubisin kombinasyon uygulamasının sonraki çalışmalarda kullanılmamasına karar verilmiştir.

(A)



(B)





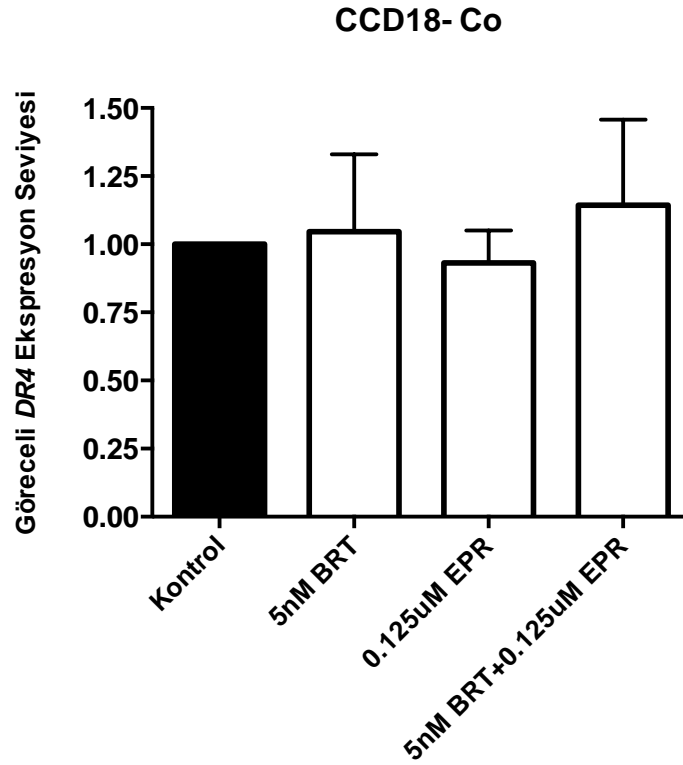
Şekil 4.3. Bortezomib ve epirubisin kombinasyon uygulamasının kolorektal hücre hatları üzerindeki etkisi. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, normal ve tümör hücre hatları bortezomib, epirubisin ya da her ikisinin kombinasyonu ile muamele edildi. 48 saat inkübasyondan sonra, MTT testi uygulanarak yüzde inhibisyon oranları bir spektrofotometre yardımıyla 570 nM da ölçüm alınarak hesaplandı. Kombinasyon uygulamasının (A) CCD18-Co, (B) HCT116 ve (C) SW620 hücre hatları üzerindeki etkileri.

4.4. Bortezomib, Epirubisin ve Kombinasyon Muamelesinin Bazı İmmünojenik Genler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Kolorektal tümör hücreleri ve normal kolon hücreleri 5nM Bortezomib ve 125nM Epirubisin ya da kombinasyonları ile muamele edilerek *DR4*, *DR5*, *NKG2D* ve *NKG2DL* transkript ekspresyonları belirlendi. Malign olmayan ve malign insan hücreleri arasındaki ölüm reseptörlerinin ekspresyonundaki değişiklikleri

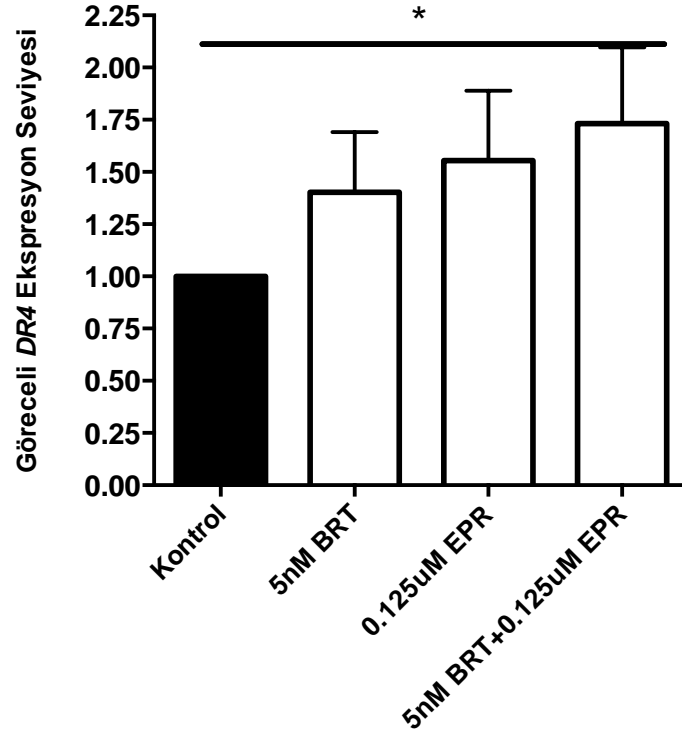
karşılaştırmak için normal olarak kabul edilen CCD18-Co hücre hattı kullanıldı. Söz konusu genlerin transkript ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile ölçüldü. Öncelikli olarak *DR4* transkripsiyon seviyesine bakıldı. Yapılan ilaç uygulamasından sonra normal kolon CCD18-Co hücre hattında (şekil 4.4) *DR4* transkripsiyon ekspresyonunda herhangi bir değişiklik gözlemlenmezken, malign olan HCT116 ve SW620 hücre hatlarında hem bortezomib ve epirubisin'in ayrı olarak hem de kombinasyon şeklinde uygulanması sonucu *DR4* ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Kombinasyon uygulamasını bireysel uygulamalarla kıyasladığımızda *DR4* ekspresyon seviyesinde bariz bir artış olduğunu söyleyebiliriz.

(A)



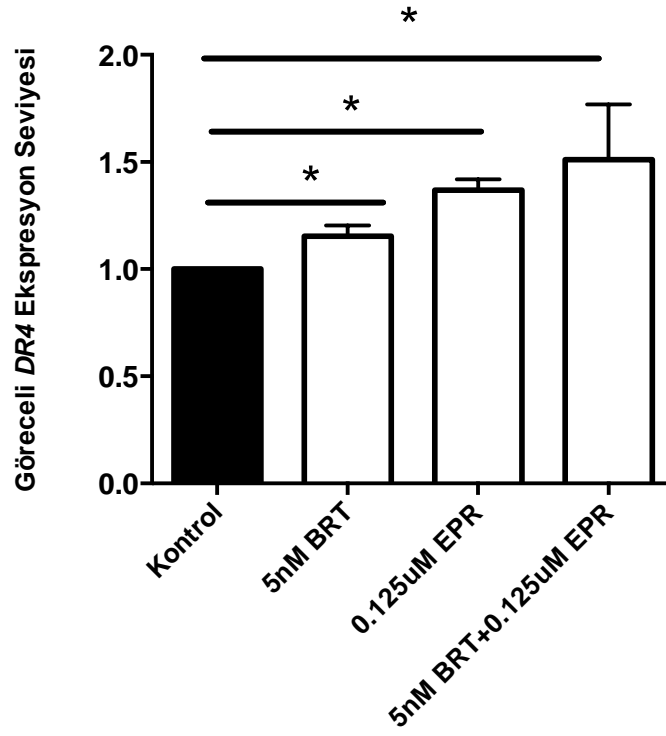
(B)

HCT116



(C)

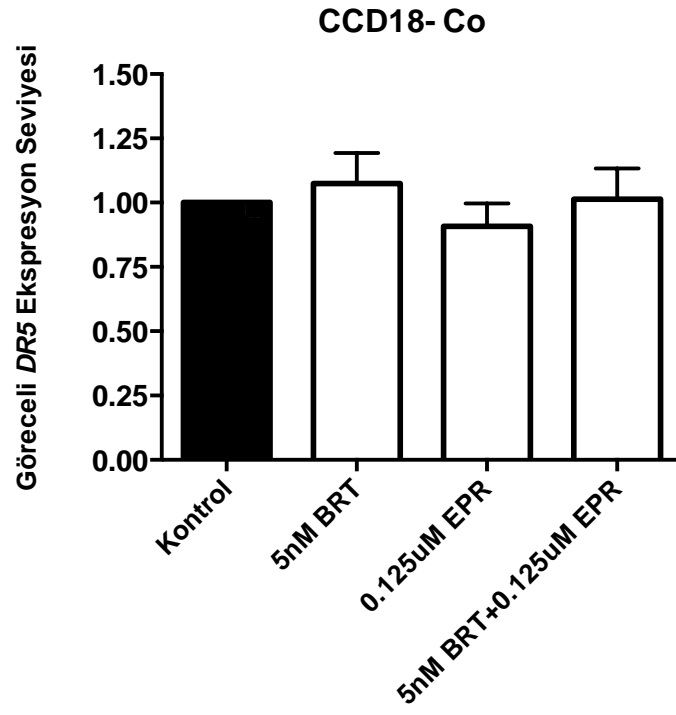
SW 620



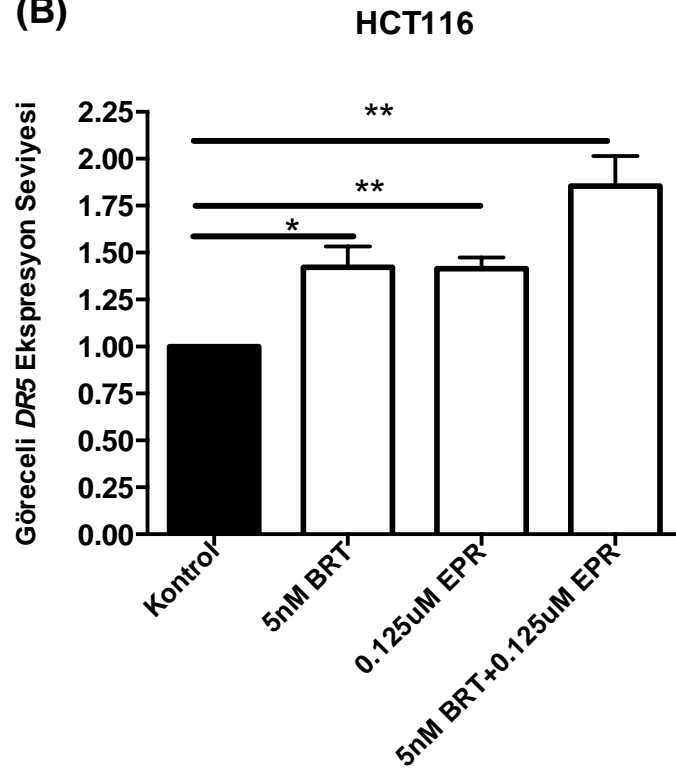
Şekil 4.4. Bortezomib ve Epirubisin uygulamasından sonra DR4 transkripsiyon ekspresyonu. İlaç uygulamaları sonrası, hücreler toplandı, RNA izole edildi ve cDNA ya dönüştürüldü. DR4 transkriptini hedef alan spesifik primerler kullanarak qRT-PCR ile veriler elde edildi. Elde edilen veriler housekeeping gen olan GAPDH seviyesine normalize edildi. Grafiklerdeki veriler birbirinden bağımsız üç deneyin ortalamasını göstermektedir. İstatistik olarak student t test uygulandı, SEM *p<0.05. DR4 transkripsiyon seviyeleri (A) CCD18-Co, (B) HCT116 ve (C) SW620 hücre hatları.

Yine benzer bir çalışmayla normal ve tümörlü hücrelerdeki DR5 transkript seviyelerine bakıldı. DR4 ekspresyon seviyesinde gözlemlediğimiz gibi normal CCD18-Co hücrelerde DR5 transkript seviyesinde de anlamlı bir değişim gözlenmedi ancak HCT116 hücrelerine baktığımızda bortezomib ve epirubisin'in ayrı olarak hem de kombinasyon şeklinde uygulanması sonucu DR5 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik (Şekil 4.5). Yine HCT116 hücre hattındaki kombinasyon uygulamasını bireysel uygulamalara kıyasladığımızda DR5 ekspresyon seviyesinin bariz ve anlamlı bir şekilde arttığını gözlemledik. SW620 hücre hattında ilginç olarak sadece kombinasyon uygulaması DR5 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış meydana getirdi. Bu hücrelerde her ne kadar bortezomib ve epirubisin DR5 ekspresyon seviyesini arttırmış olsada bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemledik.

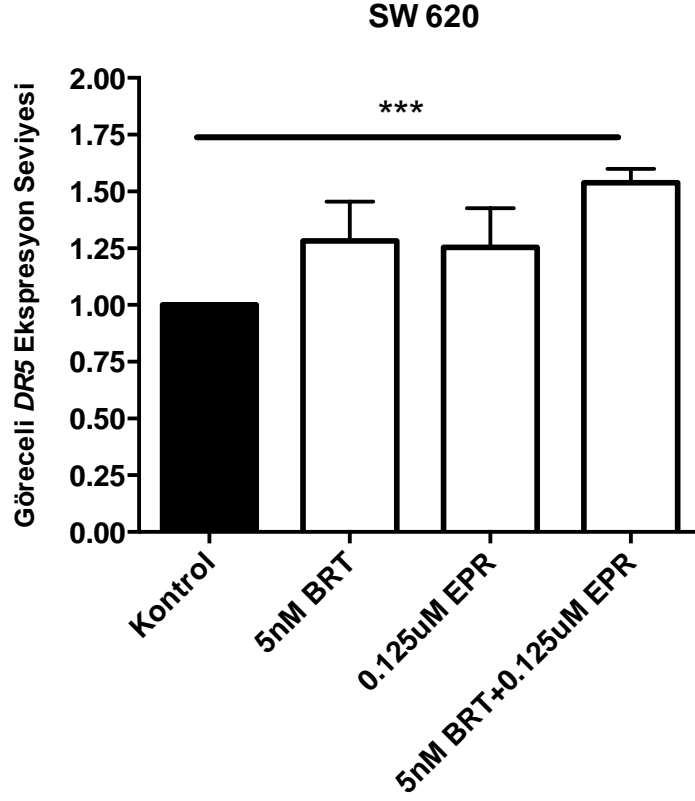
(A)



(B)



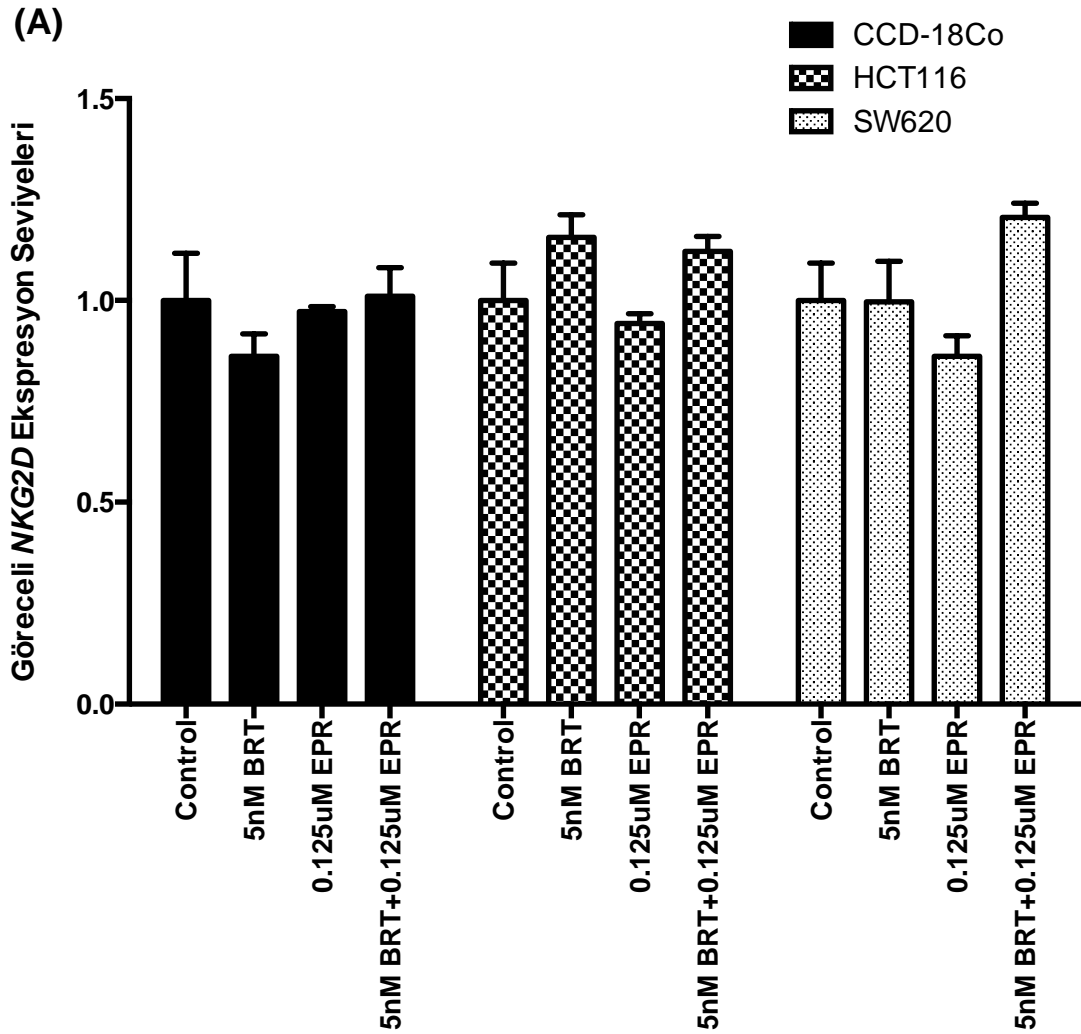
(c)

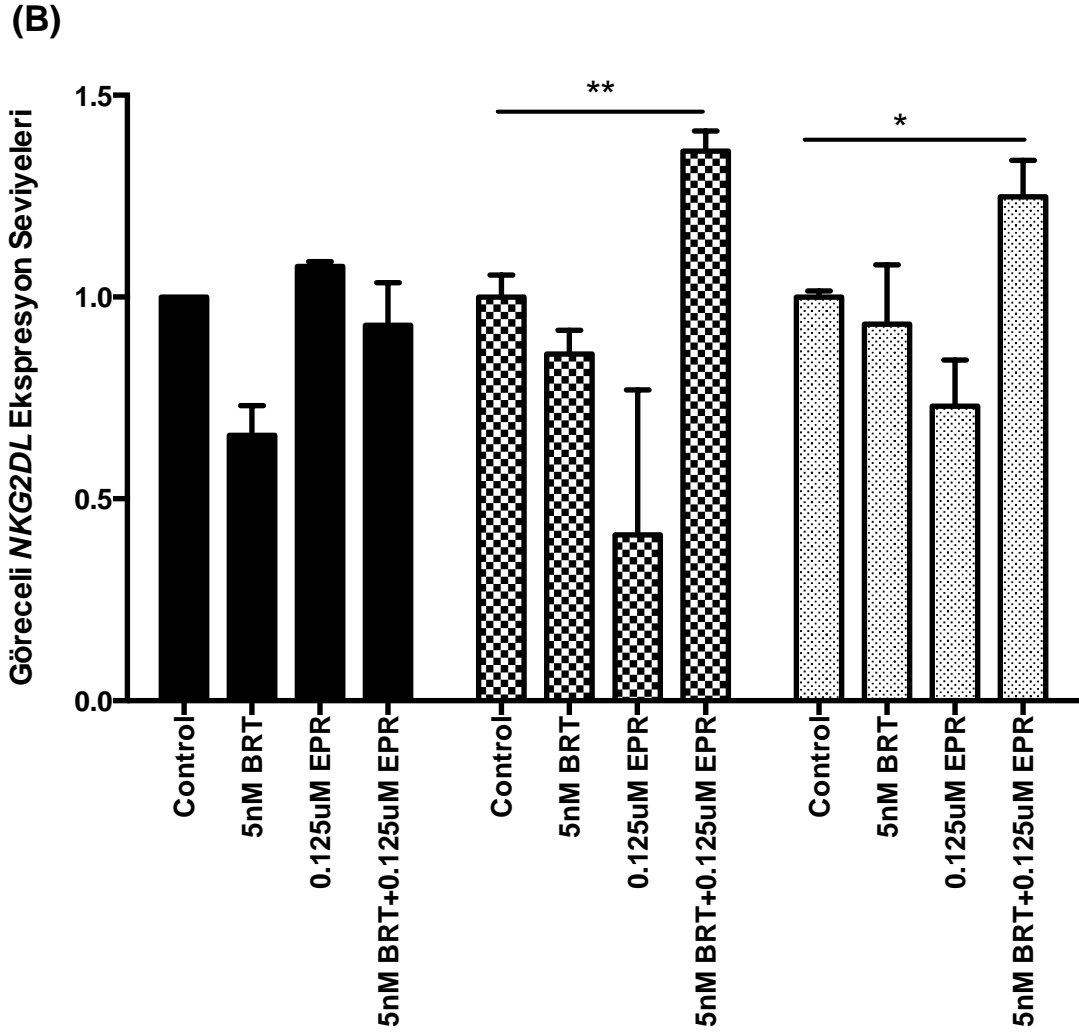


Şekil 4.5. Bortezomib ve Epirubisin uygulamasından sonra *DR5* transkripsiyon ekspresyonu. 5nM Bortezomib ve 125nM Epirubisin uygulamasından sonra normal ve tümör hücrelerindeki *DR5* transkripsiyon seviyeleri. İlaç uygulamaları sonrası, hücreler toplandı, RNA izole edildi ve cDNaya dönüştürüldü. *DR5* transkriptini hedef alan spesifik primerler kullanarak qRT-PCR ile veriler elde edildi. Elde edilen veriler housekeeping gen olan GAPDH seviyesine normalize edildi. Grafiklerdeki veriler birbirinden bağımsız üç deneyin ortalamasını göstermektedir. İstatistik olarak student t test uygulandı, SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ ve *** $p < 0.0005$

Son olarak normal ve malign kolorektal hücre hatlarındaki *NKG2D* ve *NKG2DL* transkripsiyon seviyelerine bakıldı. Elde edilen sonuçlara göre; normal ve kolorektal tümör hücrelerde *NKG2D* transkripsiyon ekspresyon seviyelerinde kayda değer bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.6A). *NKG2D* normal koşullarda immün hücreleri üzerinde ifade edildiğinden elde edilen sonuçlarda bir anormallik olmadığı sonucuna

varılmıştır. *NKG2DL* ekspresyon seviyelerine bakıldığında, normal CCD18-Co hücre hattında yapılan ilaç uygulamalarının *NKG2DL* transkripsiyon seviyesinde herhangi bir anlamlı değişiklik oluşturmadığını ancak HCT116 ve SW620 tümör hücre hatlarında bortezomib ve epirubisin kombinasyon şeklinde kullanılması *NKG2DL* transkripsiyon seviyesinde anlamlı bir artış meydana getirdiğini gözlemledik (Şekil 4.6B). İlginç olarak 5nM bortezomib ya da 125nM epirubisin tek başlarına uygulandıklarında herhangi anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. Hatta epirubisin tek başına uygulandığında *NKG2DL* transkripsiyon seviyesinde bir azalışın meydana geldiği ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ortaya konulmuştur.





Şekil 4.6. Normal (CCD18-Co) ve tümör (HCT116 ve SW620) hücrelerindeki (A) *NKG2D* ve (B) *NKG2DL* transkripsiyon seviyeleri. 5nM Bortezomib ve 125nM Epirubisin uygulaması sonrası, hücreler toplandı, RNA izole edildi ve cDNAya dönüştürüldü. *NKG2D* ve *NKG2DL* transkriptini hedef alan spesifik primerler kullanarak qRT-PCR ile veriler elde edildi. Elde edilen veriler housekeeping gen olan GAPDH seviyesine normalize edildi. Grafiklerdeki veriler birbirinden bağımsız üç deneyin ortalamasını göstermektedir. İstatistik olarak student t test uygulandı, SEM * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.005$.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İmmünoterapötik yaklaşımlar metastatik kanser tedavisi için ümit verici bir yöntemdir. Tümöre özgü sitotoksik T lenfositleri (CTL) aktive edilmiş NK hücreleri aracılığıyla kanser hücrelerinin öldürülmesinde önemli rol oynar ve birçok immünoterapinin temelini oluştururlar (Cheng ve ark., 2013). Sitotoksik T lenfositleri veya NK hücreleri tarafından tümör hücre ölümünü gerçekleştirmenin bir yolu tümör hücrelerinde ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu arttırmaktır. DR4 ve DR5 tümör nekroz faktörleriyle ilişkili apoptozisi indükleyen ligandın (TRAIL) reseptörleridir ve birçok tümör hücresinde apoptozun başlatılması için gereklidir. TRAIL, NK hücrelerinde ve CD8+T hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir. Ayrıca tümör hücrelerinin immün sistem tarafından öldürülmesi, sağlıklı hücrelere karşı daha az sitotoksite oluşturması ve kanser hücrelerinde apoptozisi başlatması açısından önemli bir mekanizmadır (Allen ve El- Deiry, 2012). Bununla birlikte tümör hücrelerinin immün sistem tarafından elimine edilmesi sıklıkla ölüm reseptörlerinin hücre yüzeyindeki ekspresyonunu azaltabilir (Kyhalos ve ark., 2012). Bu nedenle ölüm reseptörlerinin kanser hücreleri üzerindeki ekspresyonunun artırılması CTL ve NK hücreleri aracılığıyla tümörün yok edilmesine karşı duyarlılığı arttırabilir.

Proteozom inhibitörü olan bortezomib, TRAIL aracılı apoptozise karşı melanom tümörlerini duyarlı hale getirdiği ortaya konulmuştur (Shanker ve ark., 2008). Bortezomib'in diğer ajanlarla kombinasyon uygulaması geniş çapta çalışılmıştır. Ancak bu çalışmaların çoğu, doğrudan apoptozu indüklemek amacıyla kombinasyon tedavisinin sinerjik etkisine dayanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar da anti-kanser ilaçları DNA hedefli moleküller ve DNA ile ilaç arasındaki etkileşimlerin elektrokimyasal özelliklerine karşı ilgi artmaktadır. Bir anti-kanser ilacı olan Epirubisin DNA'nın baz çiftleri arasına bağlanarak DNA ve RNA sentezini engellemektedir. Epirubisin diğer kemoterapik ajanlarla kullanıldığında anti-tümör etkiyi artırdığı bilinmektedir. Yaptığımız bu tez çalışmasında bortezomib'in tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkisini gözlemlemek amacıyla MTT test protokolü uygulandı. Elde ettiğimiz bulgulara göre, bortezomib 5 nM lık konsantrasyona kadar minimum bir sitotoksik etki oluşturmuştur ancak 10 nM konsantrasyonda tümör hücreleri üzerinde etkili olmaya başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Bortezomib 30 nM

konsantrasyonda uygulandığında, tümör hücrelerin yaklaşık %90 nı ölürken, bu oran normal hücre hattında sadece %50 olarak gözlemlendi. Epirubisin normal hücre hattında minimum sitotoksisteyi 125 nM konsantrasyonda gösterirken, bu konsantrasyon HCT116 ve SW620 hücre hatlarında yaklaşık %30 luk bir orana ulaşmıştır. Elde edilen verilerden 2000 nM lık konsantrasyonda hem normal hücreler hem de tümör hücrelerinin büyük bir kısmının ölmüş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2). Bu uygulamalara ek olarak kombinasyon konsantrasyonlarında normal CCD18-Co hücrelerinde kombinasyon uygulaması, bortezomib ve epirubisinin tek başına uygulandığı durumlara göre kayda değer bir sitotoksiste oluşturmadı (Şekil 4.3). Ancak tümör hücrelerinde 10 nM bortezomib ve 250 nM epirubisin kombinasyon halinde uygulandığında, bu tümör hücrelerindeki sitotoksik etkinin arttığı gözlemlendi.

Yapılan çalışmalarda ölüm reseptörleri (DR4, DR5) aracılığıyla ve TRAIL' in kemoterapötik ajanlarla sinerjistik sitotoksiste de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Neoplastik bir ajan olan doksorubisin (antrasiklin) akut lösemide DR5' in ifadesini arttırdığı ancak meme kanserinde DR4 ve DR5 ekspresyonunu değiştirmedeği belirlenmiştir. Ayrıca bir antrasiklin türevi olan epirubisin'in mesane ve prostat kanserinde TRAIL aracılı apoptozu arttırdığı gözlemlenmiştir (Wen ve ark., 2000). Yapılan klinik çalışmalar bortezomib'in diğer anti kanser ilaçlarıyla kombinasyon halinde kullanılması kolon ve mide kanserinde tümörlerin üzerinde inhibe edici etkisinin olduğunu ortaya çıkarmıştır (Fujita ve ark., 2007; Kozuch ve ark., 2008). Bizim yaptığımız çalışmada ise kolorektal kanser hücrelerinde (SW620 ve HCT116) epirubisin ve bortezomib'in ayrı olarak ya da kombinasyon uygulamalarında DR4 ve DR5 ölüm reseptörlerinin transkript ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığını belirledik (Şekil 4.4 ve 4.5).

Bu tez çalışmasında düşük ilaç konsantrasyonlarını ayrı olarak ya da kombinasyon şeklinde uygulayarak tedavinin immün aracılı apoptozise aracılık eden gen ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. Bortezomib ve epirubisinin düşük dozlarda ayrı olarak ya da kombinasyon şeklindeki uygulamasının ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu arttırdığını ve tümör hücrelerinde bulunan *NKG2D* ligandlarının transkript ifadesinin arttığını ortaya koyduk. Çalışmamızda ilk olarak bortezomib ve epirubisinin normal ve tümör kolorektal hücre hatları üzerindeki minimum sitotoksiste

etkili ilaç konsantrasyonlarını ve elde edilen sonuçlar neticesinde kombinasyon tedavisinde kullanılacak olan uygun dozu belirledik (Şekil 4.1. ve 4.2.). Normal ve tümör kolorektal hücrelerine belirlediğimiz düşük konsantrasyonlarda, bortezomib ve epirubisini ayrı olarak ya da kombinasyon şeklinde uyguladık ve ilaçların tümör hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki oluşturmalarından ziyade immünojenik bir hücre ölümünün başlatılmasını hedefledik (Şekil 4.3). Total mRNA verileriyle tutarlı olarak bireysel tedaviler ya da kombinasyon tedavisi her iki kolorektal kanser hücre hattında (SW620 ve HCT116) DR4 ve DR5 ölüm reseptörlerinin transkript ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığını belirledik. Ancak normal kolon CCD18-Co hücre hattında ölüm reseptörlerinin transkripsiyon ifadesinde herhangi bir değişiklik görmedik (Şekil 4.4 ve 4.5).

Tümör hücrelerinde ölüm reseptörleri ekspresyonunun artması immünolojik hücre ölümünü başlatabileceğini düşündük. Bunu belirlemek amacıyla bortezomib ve epirubisin düşük konsantrasyonlarda malign olmayan ve malign hücre hatlarına ayrı olarak veya kombinasyon şeklinde uygulandı. Malign olmayan CCD18-Co hücre hattında *NKG2DL* transkript ifadesinde anlamlı bir artış görülmedi. HCT116 ve SW620 hücrelerde ise kombinasyon uygulamasının *NKG2DL* transkripsiyon seviyesinde anlamlı bir artış meydana getirdiğini gözlemlendi (Şekil 4.6).

Bulgularımız yaptığımız çalışmalara uyumlu olarak bortezomib ve epirubisin tedavisi normal kolon hücrelerinde ölüm reseptörleri ve *NKG2DL* transkript ekspresyonunu değiştirmedik. Ancak metastatik kolorektal kanser hücre hatlarında ölüm reseptörlerinin ve *NKG2DL* transkripsiyon ifadesinin önemli ölçüde arttırdığı gösterildi. Proteozom inhibitörü ve epirubisin kombinasyonu kolorektal tümörlere karşı T hücresi reaktivitesini arttırmak amacıyla immünoterapi ile kombinasyon halinde kullanılmanın kanser immünoterapi yaklaşımlarına katkı sağlayacağı fikri hasıl olmuştur. Dolayısıyla bu çalışma kolorektal kanser hastalarına yönelik yapılacak olan immünoterapi odaklı tedavi stratejilerinin geliştirilmesine öncülük etmiştir.

6. KAYNAKÇA

- Adams, J., 2003. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev*; 29 Suppl 1: 3-9.
- Allen, J.E. ve El-deiry W.S., 2012. Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer Biol Ther*; 13 (12): 1143-51.
- American Society of Clinical Oncology Position Statement on Addressing the Affordability of Cancer Drugs., (2018). *J Oncol Pract*; 14 (3): 187-192.
- Bahram, S., Bresnahan, M., Geraghty, D.E. ve Spies T., (1994). A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91 (14): 6259-63.
- Ashkenazi, A. ve Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*; 281 (5381): 1305-8.
- Berry, D.L. ve Baehrecke, E.H., 2008. Autophagy functions in programmed cell death. *Autophagy*; 4 (3): 359-60.
- Boatright, K.M. ve Salvesen, GS., 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*; 15 (6): 725-31.
- Boissel, N., Rea, D., Tieng, V. ve et al., 2006. BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. *J Immunol*; 176 (8): 5108-16.
- Bose, K., 2015. "Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances". Springer; 2.
- Cacan, E., Greer, SF. ve Garnett-benson, C., 2015. Radiation-induced modulation of immunogenic genes in tumor cells is regulated by both histone deacetylases and DNA methyltransferases. *Int J Oncol*; 47 (6): 2264-75.
- Cacan, E., Spring, A.M., Kumari, A., Greer, S.F. ve Garnett-benson, C., 2015. Combination Treatment with Sublethal Ionizing Radiation and the Proteasome Inhibitor, Bortezomib, Enhances Death-Receptor Mediated Apoptosis and Anti-Tumor Immune Attack. *Int J Mol Sci*; 16 (12): 30405-21.
- Cacan, E., 2017. Epigenetic-mediated immune suppression of positive co-stimulatory molecules in chemoresistant ovarian cancer cells. *Cell Biol Int*; 41 (3): 328-339.
- Cerwenka, A. ve Lanier, LL., 2001. Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev*; 181: 158-69.
- Chen, D., Yu, J. ve Zhang, L., 2016. Necroptosis, an alternative cell death program defending against cancer. *Biochim Biophys Acta*; 1865 (2): 228-36.
- Chen, B., Liu, S., Wang, XL. ve et al., 2009. TRAIL-R1 polymorphisms and cancer susceptibility: an evidence-based meta-analysis. *Eur J Cancer*; 45 (14): 2598-605.
- Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R. ve Tian, Z., 2013. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol*; 10 (3): 230-52.
- Chipuk, J.E. ve Green DR. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*; 18 (4): 157-64.
- Collett, D., Mumford L, Banner N.R, Neuberger, J. ve Watson C., 2010. Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: a UK Registry audit. *Am J Transplant*; 10 (8): 1889-96.
- Crowder, R.N. ve El-deiry W.S., 2012. Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Exp Oncol*; 34 (3): 160-4.

- Degterev, A., Boyce, M. ve Yuan, J., 2003. A decade of caspases. *Oncogene.*; 22 (53): 8543-67.
- Denton, D., Shrivage, B., Simin, R. ve et al., 2009. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr Biol*; 19 (20): 1741-6.
- Diefenbach, A. ve Raulet, D.H., 2001. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev*; 181: 170-84.
- Dunn, G.P, Bruce, A.T, Ikeda, H., Old, L.J. ve Schreiber, R.D., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*; 3 (11): 991-8.
- Draft, C. ve et.al., (2013, 2015). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study and *Lancet*; 385 (9963): 117-71.
- Dranoff, G., 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 4 (1): 11-22.
- Elgendy, M., Sheridan, C., Brumatti, G. ve Martin, S.J. 2011. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell*; 42 (1): 23-35.
- Engels, E.A., Pfeiffer, R.M., Fraumeni, J.F. ve et al. 2011. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA*; 306 (17): 1891-901.
- Falschlehner, C., Ganten, T.M., Koschny, R., Schaefer, U.ve Walczak, H. 2009. TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. *Adv Exp Med Biol*; 647: 195-206.
- Folde, R., 2002. "Kolorektal Kanserde APC Geni." *Eur J Cancer*; 38(7): 867-71.
- Fulda, S., Gorman, A.M, Hori, O. ve Samali, A., 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*. 214074.
- Fujita, T. ve et al., 2007. Antitumor effects and drug interactions of the proteasome inhibitor bortezomib (PS341) in gastric cancer cells. *Anti-cancer drugs*.18: 677-686.
- Fransén, K., Klintenäs, M., Osterström, A., Dimberg, J., Monstein, H.J. ve Söderkvist, P., 2004. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*; 25 (4): 527-33.
- Freeman, B.E., Raué, H.P., Hill, A.B. ve Slifka, M.K., 2015. Cytokine-Mediated Activation of NK Cells during Viral Infection. *J Virol*; 89 (15): 7922-31.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Senovilla, L. ve et al. 2012. Independent transcriptional reprogramming and apoptosis induction by cisplatin. *Cell Cycle*; 11 (18): 3472-80.
- Galluzzi, L., Zamzami, N., De la motte rouge, T., Lemaire, C., Brenner, C. ve Kroemer, G., 2007. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis.*; 12 (5): 803-13.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J. ve Raulet, D.H., 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*; 436 (7054): 1186-90
- Gatenby, R.A. ve Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*; 4 (11): 891-9.
- Gavathiotis, E., Reyna, D.E., Bellairs, J.A., Leshchiner, E.S. ve Walensky, L.D., 2012. Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nat Chem Biol*. 8 (7): 639-45.
- Golstein, P. ve Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*; 32 (1): 37-43.

- Guicciardi, M.E. ve Gores, G.J., 2009. Life and death by death receptors. *FASEB J*; 23 (6): 1625-37.
- Giurisato, E., Cella, M., Takai, T. ve et al., 2007. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required to form the NKG2D immunological synapse. *Mol Cell Biol*; 27 (24): 8583-99
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*; 144 (5): 646-74.
- Harvey, B.J., Alzamora, R., Stubbs, A.K., Irnaten, M. ve Mceneaney, V., Thomas, W., 2008. Rapid responses to aldosterone in the kidney and colon. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 108 (3-5): 310-7.
- Hoogwater, F.J., Nijkamp, M.W., Smakman, N. ve et al., 2010. Oncogenic K-Ras turns death receptors into metastasis-promoting receptors in human and mouse colorectal cancer cells. *Gastroenterology*; 138 (7): 2357-67.
- Howlader, N., Noone, A.M., Yu, M. ve Cronin, K.A., 2012. Use of imputed population-based cancer registry data as a method of accounting for missing information: application to estrogen receptor status for breast cancer. *Am J Epidemiol*; 176 (4): 347-56.
- Huang, Z., Peng, S., Knoff, J. ve et al., 2015. Combination of proteasome and HDAC inhibitor enhances HPV16 E7-specific CD8+ T cell immune response and antitumor effects in a preclinical cervical cancer model. *J Biomed Sci*; 22: 7.
- Huncharek, M., Muscat, J. ve Geschwind, J.F., 1999. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis*; 20 (8): 1507-10.
- Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahan, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R. ve Raulet, D.H., 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*; 17 (1): 19-29.
- Jin, Z. ve El-deiry W.S., 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 4 (2): 139-63.
- Kalluri, R. ve Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*; 119 (6): 1420-8.
- Kang, T.B., Yang SH, Toth B, Kovalenko A. ve Wallach D., 2013. Caspase-8 blocks kinase RIPK3-mediated activation of the NLRP3 inflammasome. *Immunity*; 38 (1): 27-40.
- Kaufmann, T., Strasser, A. ve Jost, P.J., 2012. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ*; 19 (1): 42-50.
- Kelley, R.F., Totpal, K., Lindstrom, S.H. ve et al., 2005. Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem*; 280 (3): 2205-12.
- Kemp, T.J., Moore, J.M. ve Griffith, T.S., 2004. Human B cells express functional TRAIL/Apo-2 ligand after CpG-containing oligodeoxynucleotide stimulation. *J Immunol*; 173 (2): 892-9.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., 1972. "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". *Br J Cancer*; 26 (4), 239-57.
- Korrer, M.J. ve Routes, J.M., 2015. Adenovirus serotype 5 E1A expressing tumor cells elicit a tumor-specific CD8+ T cell response independent of NKG2D. *Results Immunol*; 5: 1-5.

- Kozuch, P.S. ve et al., 2008. Bortezomib with or without irinotecan in relapsed or refractory colorectal cancer: results from a randomized phase II study. *J Clin Oncol*. 26: 2320–2326.
- Kinzler, K.W. ve Vogelstein, B., 1996. "Lessons from hereditary colorectal cancer." *Cell* 87(2): 159–170.
- Koshkina, N.V., Khanna, C., Mendoza, A., Guan, H., Delauter, L. ve Kleinerman, E.S., 2007. Fas-negative osteosarcoma tumor cells are selected during metastasis to the lungs: the role of the Fas pathway in the metastatic process of osteosarcoma. *Mol Cancer Res*; 5 (10): 991-9.
- Khalilia, W., 2015. "Hücre Kültüründe Apoptozun Moleküler Mekanizmaları Üzerine Gama Radyasyonunun Etkileri," Doktora Tezi, Biyoloji Radyobiyojisi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Khosravi-far, R. ve Espoti, M.D., 2004. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*; 3 (11): 1051-7.
- Kuipers, E.J., Grady, W.M., Lieberman, D. ve et al., 2015. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*; 1:15065.
- Kykalos, S., Mathaiou, S., Karayiannakis, A.J., Patsouras, D., Lambropoulou, M. ve Simopoulos, C., 2012. Tissue expression of the proteins fas and fas ligand in colorectal cancer and liver metastases. *J Gastrointest Cancer*; 43 (2): 224-8.
- Labbe, K. ve Saleh, M., 2008. "Cell death in the host response to infection". *Cell Death Differ.*; 15, 1339–1349.
- Lee, Y., Kim, J.H., Hong, Y., Lee, S.R., Chang, K.T. ve Hong, Y., 2012. Prophylactic effects of swimming exercise on autophagy-induced muscle atrophy in diabetic rats. *Lab Anim Res.*; 28 (3): 171-9.
- Levine, A.J. ve Oren, M., 2009. "The first 30 years of p53: growing ever more complex." *Nature Rev*; 9: 749–758.
- Leystra, A.A., Deming, D.A., Zahm, C.D. ve et al., 2012. Mice expressing activated PI3K rapidly develop advanced colon cancer. *Cancer Res*; 72 (12): 2931-6.
- Li, W.Q., Kawakami, K., Ruzskiewicz, A., Bennett, G., Moore, J. ve Iacopetta B., 2006. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer*. 5:2.
- Markowitz, S.D. ve Bertagnolli, M.M., 2009. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*; 361 (25): 2449-60.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A. ve et al., 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*; 11 (3): 577-90.
- Miller, K.D., Siegel, R.L., Lin, C.C. ve et al., 2016. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*; 66 (4): 271-89.
- Miliani de marval, P.L. ve Zhang, Y., 2011. The RP-Mdm2-p53 pathway and tumorigenesis. *Oncotarget*; 2 (3): 234-8.
- Monstein, H.J., Fransén, K., Dimberg, J. ve Söderkvist, P., 2004. K-ras and B-raf gene mutations are not associated with gastrin- and CCK2-receptor mRNA expression in human colorectal tumour tissues. *Eur J Clin Invest*; 34 (2): 100-6.
- Moretti, E., Desmedt, C., Biagioni, C., Regan, M. M., Oakman, C., Larsimont, D. ve Di Leo, A., 2013. TOP2A protein by quantitative immunofluorescence as a predictor of response to epirubicin in the neoadjuvant treatment of breast cancer. *Future Oncol*, 9(10), 1477-1487.

- Morin, P.J., Vogelstein, B. ve Kinzler K.W., 1996. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93 (15): 7950-4.
- Morris, M., Platell, C. ve Iacopetta, B., 2007. A population-based study of age-related variation in clinicopathological features, molecular. Markers and outcome from colorectal cancer. *Anticancer Res*; 27 (4C): 2833-8.
- Mosmann, T.R. ve Coffman, R.L., 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol*; 46: 111-47.
- Murphy, K.M. ve Reiner, S.I., 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*; 2 (12): 933-44.
- McLean, L., Yewchuk, L., Israel, D.M. ve Prendiville, J.S., 2011. Acute onset of generalized pruritic rash in a toddler. Diagnosis: systemic allergic (contact) dermatitis to nickel from ingestion of metal coins. *Pediatr Dermatol*; 28 (1): 53-4.
- Nagata, S.ve Golstein, P., 1995. The Fas death factor. *Science*; 267 (5203): 1449-56.
- Nasr, M., Nafee, N., Saad, H. ve Kazem, A., 2014. Improved antitumor activity and reduced cardiotoxicity of epirubicin using hepatocyte-targeted nanoparticles combined with tocotrienols against hepatocellular carcinoma in mice. *Eur J Pharm Biopharm*; 88 (1), 216-225.
- Nicotera, P. ve Melino, G., 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*; 23 (16): 2757-65.
- Poggi, A., Musso, A., Dapino, I. ve Zocchi, M.R., 2014. Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. *Immunol Lett*; 159 (1-2): 55-72.
- Polakis, P., 1997. "The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor." *Biochim Biophys Acta* 1332 (3): F127-147.
- Plass, C., Pfister, S.M., Lindroth, A.M., Bogatyrova, O., Claus, R. ve Lichter, P., 2013. Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat Rev Genet*; 14 (11): 765-80.
- Rufo, N., Garg, A.D. ve Agostinis, P., 2017. The Unfolded Protein Response in Immunogenic Cell Death and Cancer Immunotherapy. *Trends Cancer*; 3 (9): 643-658.
- Salih, H.R., Starling, G.C., Brandl, S.F. ve et al., 2002. Differentiation of promyelocytic leukaemia: alterations in Fas (CD95/Apo-1) and Fas ligand (CD178) expression. *Br J Haematol*; 117 (1): 76-85.
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. ve Jemal, A., 2014. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*; 64 (1): 9-29.
- Schwitalla, S., Ziegler, P.K., Horst, D. ve et al 2013. Loss of p53 in enterocytes generates an inflammatory microenvironment enabling invasion and lymph node metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors. *Cancer Cell*. 23(1):93-106.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T. ve et al., 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*; 410 (6832): 1107-11.
- Shanker, S., Hu, Z. ve Wilkinson, M.F., 2008. Epigenetic regulation and downstream targets of the RhoX5 homeobox gene. *Int J Androl*; 31 (5): 462-70.
- Spilianakis, C.G., Lalioti, M.D., Town, T., Lee, G.R. ve Flavell, R.A., 2015. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*; 435 (7042): 637-45.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M. ve et al., 2013. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*; 13 (2): 145-9.

- Stabile, H., Fionda, C., Gismondi, A. ve Santoni, A., 2017. Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response. *Front Immunol*; 8: 293.
- Strofilas, A., Lagoudianakis, E.E., Seretis, C. ve et al. 2012. Association of helicobacter pylori infection and colon cancer. *J Clin Med Res*; 4 (3): 172-6.
- Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L.D. ve et al., 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*; 314 (5797): 268-74.
- Steinman, R.M., 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*; 9: 271-96.
- Tan, C. ve Du, X., 2012. " KRAS Mutation Testing in Metastatic Colorectal Cancer." *World J Gastroenterol*; 18 (37): 5171-5182.
- Topfer, K., Kempe, S., Muller, N., Schmitz, M., Bachmann, M., Cartellieri, M. ve Temme, A., 2011. Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol*; 918471.
- Tomes, L., Emberley, E., Niu, Y. ve et al., 2003. Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 81 (1):61-9.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L. ve Kroemer, G., 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*; 13 (1), 54-61.
- Van, houdt W.J., Hoogwater, F.J., De bruijn, M.T. ve et al., 2010. Oncogenic KRAS desensitizes colorectal tumor cells to epidermal growth factor receptor inhibition and activation. *Neoplasia*; 12 (6): 443-52.
- Vaseva, A.V. ve Moll, U.M., 2009. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*;1787 (5): 414-20.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D. ve Smyth, M.J., 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*; 29: 235-71.
- Virgin, H.W. ve Levine, B., 2009. Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol*; 10 (5): 461-70.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. ve Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*; 9 (5): 503-10.
- Vleminckx, K., Wong, E., Guger, K., Rubinfeld, B., Polakis, P. ve Gumbiner, B.M., 1997. Adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein has signaling activity in *Xenopus laevis* embryos resulting in the induction of an ectopic dorsoanterior axis. *J Cell Biol*; 136 (2): 411-20.
- Voortman, J., Checińska, A. ve Giaccone, G., 2007. The proteasomal and apoptotic phenotype determine bortezomib sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer*; 6: 73.
- Wang, C. ve Youle, R. J., 2009. "The Role of Mitochondria in Apoptosis". *Annu Rev Genet.*; 43: 95–118.
- Wang, S., ve El-Deiry, W. S., 2003. "TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors". *Oncogene*; 22, 8628–8633.
- Wen, J., Ramadevi N., Nguyen, D. ve et al. 2000. Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood.* 3900– 6.
- Whiteside, T.L., Mandapathil, M., Szczepanski, M. ve Szajnik, M., 2011. Mechanisms of tumor escape from the immune system: adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs. *Bull Cancer*; 98 (2), E25-31
- Williams, M.A. ve Bevan, M.J., 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol*; 25: 171-92.
- Wu, W.J., Hu, K.S., Chen, D.L. ve et al., 2013. Prognostic relevance of BRD7 expression in colorectal carcinoma. *Eur J Clin Invest*; 43 (2):131-40.

- Wu, W.J., Xue, X., Zhang, B. ve et al., 2016. Enhanced antitumor activity and attenuated cardiotoxicity of Epirubicin combined with Paeonol against breast cancer. *Tumour Biol*; 37 (9): 12301-12313.
- Yaacoub, K., Pedoux, R., Tarte, K. ve Guillaudeux, T., 2016. Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer Lett*; 378 (2):150-9.
- Youle, R.J. ve Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(1): 47-59.
- Zauber, A.G., Winawer, S.J., O'brien, M.J. ve et al., 2012. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med*; 366 (8): 687-96.
- Zhang, Y. ve Huang, B., 2017. The development and diversity of ILCs, NK cells and their relevance in health and diseases. *Adv Exp Med Biol*. 1024: 225–4.
- Zhang, H.G., Wang, J., Yang, X., Hsu, H.C. ve Mountz, J.D., 2004. Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene*; 23 (11): 2009-15.
- Zhu, J. ve Paul, W.E., 2010. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*; 238 (1):
- Xie, Z. ve Klionsky, D.J., 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*; 9 (10): 1102-9.

7. ÖZGEÇMİŞ

Tokat'ın Pazar ilçesinde 1984 yılında doğdu. İlkokulu 100. Yıl İlköğretim Okul'unda, ortaokulu Şeker Ortaokul'unda, liseyi Turhal Sağlık Meslek Lise'sinde (2002) tamamladı. 2004 yılında sağlık bakanlığına Acil Tıp Teknisyen'i olarak atandı ve İstanbul ilinde göreve başladı. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyoloji Bölüm'ünden 2017 yılında mezun oldu. 2017 yılında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyoloji ABD'da Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm'ünde yüksek lisans yaptı. Tokat ilinde ATT olarak görev yapmaktadır. Evli ve 2 çocukludur.