

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kör Farelerde Hipoksi ve Normoksinin TRAIL Aracılı Hücre
Ölümünde Rol Oynayan Ligand, Reseptör ve Anti-Apoptotik
Yapılar Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması ve DR4, DR5, DcR1,
DcR2, OPG, cIAP-1, cIAP-2, XIAP ve FLIP Genlerinin Moleküler
Karakterizasyonu**

DOKTORA TEZİ

Barış YILDIZ

**Danışman
Prof.Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU**

**2. Danışman
Yrd.Doç.Dr. Cem ÖZİÇ**

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARS 2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kör Farelerde Hipoksi ve Normoksinin TRAIL Aracılı Hücre
Ölümünde Rol Oynayan Ligand, Reseptör ve Anti-Apoptotik
Yapılar Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması ve DR4, DR5, DcR1,
DcR2, OPG, cIAP-1, cIAP-2, XIAP ve FLIP Genlerinin Moleküler
Karakterizasyonu**

DOKTORA TEZİ

Barış YILDIZ

Danışman

Prof.Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU

2. Danışman

Yrd.Doç.Dr. Cem ÖZİÇ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARS 2017

Bu tez KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2016/TS-57 proje numarası ile desteklenmiştir.

TC
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde **Barış YILDIZ** tarafından hazırlanmış olan “**Kör Farelerde Hipoksi ve Normoksinin TRAIL Aracılı Hücre Ölümünde Rol Oynayan Ligand, Reseptör ve Anti-Apoptotik Yapılar Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması ve DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, cIAP-1, cIAP-2, XIAP ve FLIP Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ...*birliği*..... ile ...*kabul*.. edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/12/2017

Adı Soyadı

İmza

Başkan: Prof.Dr. Erdal MATUR

Üye : Prof.Dr. Nadide NABİL KAMILOĞLU

Üye : Prof.Dr. Yüksel COŞKUN

Üye : Yrd.Doç.Dr. Özkan ÖZDEN

Üye : Yrd.Doç.Dr. Oğuz MERHAN

.....
.....
.....
.....
.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../ .../... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

*“Tabiat, sırlarını bakmasını bilene açıklamış.
Yorulmadan, bıkmadan,
görünüşe kapılmadan bakmalıyım ben de.”
<Oğuz Atay, Tutunamayanlar>*

Evrende var olan her cismin, tüm uzamsal sınırlara karşı, birbirleri ile bir şekilde kaotik ve indeterminist ilişkiler yumağı içerisinde olması, çoğunun dile getirmekten korktuğu fakat geriye kalanların ise sıkı sıkıya sarıldığı bir teselli kaynağıdır. Kelimelerin yazılması, sonuçların ve bulguların değerlendirilmesi elbette ki binlerce saat harcanan bir çabanın ürünüdür. Fakat kesinlikle, tezin yazımından ziyade, tezin nasıl yazıldığı daha önemlidir. En ufak detayların, en önemsiz görülen nesnelerin, bütün adına ne derece önemli olduğu, bütün bunların yaşamlarımızı nasıl şekillendirdiği belki de tüm tezlerin farkına varılmayan alt metnidir ancak bir tez, tez gibi yazılmalıdır. Bu nedenle kendimi Antoine de Saint-Exupéry’den küçük alıntı ile teselli etmek istiyorum; “Hiç kimsenin kitabımı özensizce okumasını istemem doğrusu”.

Kanserli hücre/hücre toplulukları, aralarında sır gibi sakladıkları bir amaç uğruna var olmaya çalışan, ‘sağlıklı’ hücre normlarına uymayarak son anlarına dek kararlı bir biçimde yaşama tutunan, gizli bir topluluğun üyesi gibidirler. Eğer fizyolojik faaliyetler, organizmaların hayatta kalabilmek için yürüttükleri eylemler bütünü ise, olaya kanser açısından baktığımızda mutant hücrelerin hayatta kalabilmek için bir takım modifiye fizyolojik yöntemler kullanmaları gerektiğini düşünebiliriz. Bu yönüyle mutant hücreler, resme uzaktan bakıldığında, sahip oldukları tüm direnç mekanizmaları ile bir erek uğruna fiiliyat gösterdikleri hissiyatı uyandırırılar. Eğer resme biraz yakınlaşırsak, mekanizmaların sınırlarının keskin bir biçimde ayrıldığını görürüz. Fakat resmin içerisine tam olarak girersek, bir resmin var olduğu gerçeğinden sıyrılıp, resmin tüm büyüsunü bozan şu fizyolojik ilke ile kalakalırız; “Tüm fizyolojik olaylar, kimya ve fizik yasaları tarafından dayatılır”. Mutant hücreler de bu evrensel yasadın bağımsız olmadığından, bozulmuş bir takım sinyalizasyon sistemlerine sahip hücreler olarak tanımlanabilir. Elbette vücudun her yanına dağılmış söz dinlemez hücrelere ulaşabilmek, onların sahip olduğu tüm farklı mutasyonlara cevap vererek tamamını ölüme sürükleyebilmek ve tüm bunları

yaparken de sağlıklı hücrelere zarar vermemek, kesinlikle kanser tedavileri için ‘her şeyin teorisi’ olurdu, ancak günümüz itibariyle henüz bu bilgiye varamadık. Her yıl milyonlarca insanın ölüm sebebi olan kanser, tüm bu yönleri göz önüne alındığında ne kadar korkutucu olsa da, “güçleri ve hızları, hala kurallar üzerine kurulu bir dünyaya bağlı”dır. Kör fareler ise bu kural tanımaz dünyayı anlamak için kullanabileceğimiz benzersiz organizmalardır.

İnsanlık tarihi boyunca en büyük keşifler ve en cesur adımlar her zaman iki akılcı dinamo sayesinde atılmıştır; merak ve kuşku. Sokrates’ten Giordano Bruno’ya, Uluğ Bey’den Ali Kuşçu’ya, Hypatia’dan Charles Darwin’e, Michael Faraday’dan Carl Sagan’a kadar sayısız düşünür, filozof ve bilim insanı, sonu belirsiz engin bilinmezlik okyanusunda, adına bilim dediğimiz o ufak adanın kumsalına birer çakıl taşı koyarak aramızdan ayrıldılar. Her birinin bilgisi bir diğerini daha da yukarıya taşıdı ve nihayetinde Isaac Newton, matematikçi John Wallis’i ima ederek bu durumu şöyle dile getirdi; ‘Eğer ileriye görebildiysem, bunu sizin gibi devlerin omuzlarında yükselerek başardım’. Fakat yaşam iç içe geçmiş, kompanse edilebilen farklı değişkenlerin oluşturduğu koca bir fonksiyondur. Toplum da bu fonksiyonun bir türevidir. Her olgunun kör bir biçimde farklı olgu ve davranışları etkilediği de göz önüne alınacak olursa, hayat düşündüğümüz kadar karmaşık ve bir o kadar da basittir. Bu sebeple Isaac Newton’dan özür dileyerek hayatımıza yön veren, işin geriye kalan kısmını yüklenerek ileriye görmemi büyük ölçüde kolaylaştıran diğer insanları da dahil etmek istiyorum; bilgisayarımı tasarlayan mühendisler, evimi yapan işçiler, bilgi kaynağımız olan kitapları basan matbaacılar, pirincimi üreten köylüler, hastalığımı gideren hekimler ve toplumun bu iç içe geçmiş karmaşık yapısının farkında olmadan devamlılığını sağlayan, buraya sığdıramadığım diğerleri. Eğer ileriye görebildiysem, bunu tüm bu devlerin omuzlarında yükselerek başardım.

Elbette insan hayatında çok daha belirleyici, yol gösterici ve ilham verici özneler de var. Her özne kaotik olarak bir diğerini etkilediğinden, tarihsel bir süreç içerisinde sıralamam gerekirse; biyolojiyi bana sevdiren, içimdeki biyoloji merakını alevlendiren ve eğer istersem daha fazlası olabileceğimi bana öğreten biyoloji öğretmenim Aysun ŞENER’e, hiçbir şekilde beni sınırlamayan ve aksine her fırsatta yapmak istediklerim için bana destek olan, her daim güler yüzlü danışmanım Prof.

Dr. Nadide Nabil KAMILOĞLU'na, lisansımdan doktora kadar benden ısrarla sıkılmayan ve her zaman alternatiflerle dolu ikinci danışmanım Yrd. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ'e, çalışkanlığı ve farklılıklarıyla bana ilham vererek kör farelerle tanışmamı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Osman İBİŞ'e, kapısını her çaldığımda, hatta çoğu zaman bunu yapmamı bile beklemeden bana her türlü konuda destek olan Doç. Dr. Metin ÖĞÜN'e, bana kör fareler hakkında kitaplarda bulunmayanları öğreten Prof. Dr. Yüksel COŞKUN'a, yaşantımın neredeyse her alanında tüm sıkıntılarımı benimle paylaşan ve her zaman bir işin üstesinden gelmenin en kolay yolunu bularak beni her seferinde şaşırtan Dr. Öğ. Tarık MECİT ve Dr. Öğ. Serdar BAY'a, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğ. Pelin ŞAHİN'e, arazi çalışmalarında ellerinden geldiği ölçüde bana yardımcı olan Berktuğ ŞERMET, Esat YILMAZ, Mehmet TOKALI, Mesut YİĞİT ve Mustafa FİLİZ'e, sabrı, anlayışı ve sevgisi ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Sevim YILDIZ ve yine aynı sabrı ve sevgiyi göstererek ihtiyacım olan her anda yardımlarını sunan ÖZDEMİR ailesine, doğduğum andan itibaren inatla benden vazgeçmeyen, bana her zaman destek ve motivasyon kaynağı olan sevgili annem Kader YILDIZ, babam Esat YILDIZ, kardeşim Ezgi YILDIZ ve uzun süre kanserle savaşmış nihayetinde o hüzünlü geceye usulca teslim olan, yerini asla dolduramayacağımız büyük annem Hazal MORKOÇ'a sahip olduğum tek şey olan sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Barış Yıldız

2017 Kars

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ONAY SAYFASI	I
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	XVII
RESİMLER LİSTESİ	XIX
TABLolar LİSTESİ	XX
ÖZET	XXI
SUMMARY	XXIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kör Farelerin Genel Özellikleri	4
2.1.1. Kör Farelerin Morfolojik Özellikleri	4
2.1.2. Kör Farelerin Fizyolojik Özellikleri	5
2.1.3. Kör Farelerin Sahip Olduğu Anti-Kanser Özellikleri	9
2.2. Hipoksi Nedir?	13
2.3. Kanser ve Küresel Kanser Tehdidi	15
2.4. Kanser Oluşum Mekanizmaları	19
2.4.1. Kanser Oluşumunda Proto-onkogenler ve Onkogenlerin Rolü	22
2.4.2. Tümör Supressör Genler	23
2.5. Anormal Hücre Çoğalmasının Önlenmesi: Apoptozis ve Oluşum Mekanizmaları	24
2.5.1. Apoptozisin Organizma İçin Önemi	24
2.5.2. Apoptozisin Oluşumu	26
2.5.2.1 Mitokondrinin Apoptozisdeki Yeri	28

2.5.2.2.	Endoplazmik Retikulum ve Apoptozis	30
2.5.2.3.	p53 ve DNA Hasarına Bağlı Apoptozis	31
2.5.2.4.	TNF Üstfamilyası ve Ligand-Reseptör Etkileşimli Apoptozis	33
2.5.2.4.1.	Neden TRAIL? TRAIL ve Apoptozisdeki Önemi	37
2.5.2.4.2.	TRAIL ve Reseptörleri	38
2.5.2.4.3.	TRAIL Aracılı Hücre Ölümü Mekanizması	39
2.5.2.4.4.	TRAIL Aracılı Hücre Ölümüne Karşı Direnç Oluşturan Yollar	41
3.	MATERYAL ve METOT	44
3.1.	Materyal	44
3.1.1.	Çalışmada Kullanılan Cihazlar	44
3.1.2.	Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler	44
3.1.3.	Çalışmada Kullanılan Primerler	45
3.2.	Metot	46
3.2.1.	Kör Farelerin Yakalanması	46
3.2.2.	Yakalanan Kör Farelerin Bakımı ve Beslenmesi	48
3.2.3.	Deney Düzenineğinin Tasarlanması	49
3.2.4.	Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	50
3.2.5.	TRI Reagent ile Total RNA İzolasyonu	51
3.2.6.	RNA Örneklerinin Nano Drop ile Spektrofotometrik Olarak Miktar ve Kalite Tayini	52
3.2.7.	Total RNA Örneklerinden Geri Transkripsiyon (RT) yöntemi ile cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması	52
3.2.8.	TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, XIAP, cIAP-1 ve cIAP-2 Primerleri Kullanılarak PCR Reaksiyonlarının Gerçekleştirilmesi	53
3.2.9.	PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	54
3.2.10.	Agaroz Jel Elektroforez Bant Görüntülerinin Dansitometrik Analizlerinin Yapılması ve İstatistiksel Değerlendirmeler	54

3.2.11.	Biyoinformatik Analizler	55
4.	BULGULAR	56
4.1.	Deney Süresince Glove Box Kabin İçi O ₂ Basıncı ve Kör Fare Davranışları	56
4.2.	Hedef Genlerin mRNA Ekspresyonları ve Biyoinformatik Analizi	57
4.2.1.	TNFRSF10A Geni (DR4) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	57
4.2.2.	TNFRSF10B Geni (DR5) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	58
4.2.3.	TNFRSF10B Geni (DR5) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	60
4.2.4.	TNFRSF10D Geni (DcR2) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	62
4.2.5.	TNFRSF11B Geni (OPG) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	63
4.2.6.	CFLAR Geni (FLIP) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	65
4.2.7.	XIAP Geni mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	67
4.2.8.	BIRC2 Geni (cIAP-1) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	68
4.2.9.	BIRC3 Geni (cIAP-2) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	70
4.2.10.	TNFSF10 Geni (TRAIL) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi	72
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	74
6.	KAYNAKLAR	85
7.	EKLER	99
8.	ÖZGEÇMİŞ	110

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

°C : Santigrat Derece

µl : Mikrolitre

A1 : Bcl-2-related protein A1

A549 : İnsan Akciğer Karsinoma Hücre Hattı

AIF : Apoptosis-inducing Factor

Apaf-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1

ARE : Antioxidant Response Element

ATF4 : Activating Transcription Factor 4

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adenosine Triphosphate

ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein

Bad : Bcl-2-associated death promoter

Bak : BCL2-antagonist/killer

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large

BH3 : Bcl-2 Homology 3

BIP : Immunoglobulin Heavy-Chain Binding Protein

BIRC2 : Baculoviral IAP Repeat Containing 2

BIRC3 : Baculoviral IAP Repeat Containing 3

Bid : BH3 interacting-domain death agonist

Bik : BCL2 interacting killer

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

Bmf : Bcl2 modifying factor

Bok : BCL2-related ovarian killer

bp : Baz Çifti

BPG : Bifosfoliserat

Ca : Kalsiyum

CAD : Caspase-activated Deoxyribonuclese

CAT : Catalase

CCD : Concerted Cell Death

CD95 : Cluster of Differentiation 95

CDK2 : Cyclin Dependent Kinase-2

CDK4 : Cyclin Dependent Kinases

cDNA : Komplementer DND

CFLAR : CASP8 and FADD Like Apoptosis Regulator

c-FLIP : Cellular FLICE-like Inhibitory Protein

Chk2 : Checkpoint kiase-2

CHOP : C/EBP Homologous Protein

cIAP-1 : Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1

cIAP-2 : Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2

cm : Santimetre

Cygb : Cytoglobin

DcR1 : Decoy Receptor 1

DcR2 : Decoy Receptor 2

DD : Death Domain

dH₂O : Distile Su

DISC : Death-inducing Signaling Complex

DNA : Deoxyribonucleic Acid

DNase : Deoksiribonükleaz

DR3 : Death Receptor 3

DR4 : Death Receptor 4

DR5 : Death Receptor 5

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

ECI : Early Contact Inhibition

EDAR : Ectodysplasin A receptor

eIF2 α : Eukaryotic Translation-Initiation Factor α

Epo : Eritropoietin

ER : Endoplasmic Reticulum

- ETS** : Elektron Taşıma Sistemi
- FADD** : Fass-associated Death Domain
- FIH** : Factor-Inhibiting HIF-1
- FLIP** : FLICE-Like Inhibitory Protein
- GLUT1** : Glucose Transporter 1
- GPX** : Glutathione Peroxidase
- GSR** : Glutathione-disulfide Reductase
- Gstp1** : Glutathione-S-transferase pi 1
- Hb** : Hemoglobin
- HCT** : Hematocrit
- HCT116** : İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
- HeL** : İnsan Eritrosit Hücre Hattı
- HeLa** : Henrietta Lacks Hücre Hattı
- HIF-1** : Hypoxia Inducible Factor 1
- HIF-1 α** : Hypoxia Inducible Factor 1 alpha
- HIF-1 β** : Hypoxia Inducible Factor 1 beta
- HIF-2 α** : Hypoxia Inducible Factor 1 alpha
- HL-7702** : İnsan Karaciğer Hücre HATTI
- HMOX1** : Heme Oxygenase 1
- hPa** : Hectopascal

HREs : Hypoxia Response Elements

Hrk : Harakiri

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein

ICAD : Inhibitor of Caspase-activated Deoxyribonuclease

IFN- β : Interferon- β

IRE1 : Inositol-requiring Enzyme 1

JNK : Jun N-terminal Kinase

Kaspaz : Cysteine Aparty1-spesific Proteases

LDL : Low Density Lipoprotein

LT : Lenfotoksin

LT : Lenfotoksin

m² : Metre Kare

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

Mb : Myoglobin

mbar : Millibar

MCH : Mean corpuscular hemoglobin

MCHC : Mean corpuscular hemoglobin concentration

Mcl-1 : Myeloid Cell Leukemia 1

MCV : Mean corpuscular volume

MDM 2 : Murine/Human Double Minute-2

Mdm2/Hdm2 : Murine/Human Double Minute-2

mL : Mililitre

mRNA : Mitokondrial RNA

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NF- κ B : Nuclear Factor kappa-B

Ngb : Neuroglobin

NGFR : Nerve Growth Factor Receptor

nm : Nanometre

Nrf2 : Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2

O₂ : Oksijen

OMI/HtrA2 : High-temperature Requirement A2

OPG : Osteoprotegerin

OSCC : İnsan Oral Yassı Karsinoma Hücre Hattı

p53AIP1 : p53-regulated Apoptosis Inducing Protein 1

PCR : Polymerase Chain Reaction

PERK : Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PHD : Prolyl Hydroxylase Domain

Pidd : p53-induced Protein with Death Domain

PKC ϵ : Protein Kinase C Epsilon

PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog

Puma : p53 upregulated modulator of apoptosis

RANK : Receptor Activator of NF- κ B

RB : Retinoblastoma

RBC : Red Blood Cells

rhTRAIL : Rekombinant Human TRAIL

RIP : Receptor-interacting Protein

RNA : Ribonucleic Acid

RNase : Ribonükleaz

ROS : Reactive Oxygen Species

Rpm : Revolutions Per Minute

SERCA : Sarco/endoplasmic Reticulum Calcium ATPase

shRNA : Short Hairpin RNA

Sig1R : Sigma 1 Receptor

siRNA : Small Interfering RNA

Smac/DIABLO : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis-binding Protein with Low pI

SNU-638 : Seoul National University Cell Lines-638, Gastrik Karsinom

SOD1 : Superoxide Dismutase

SPSS : Statistical Package for the Social Sciences

SPT : Serine-palmitoyl Transferase

TAE : Tris-acetate-EDTA Tampon

tBid : truncated Bid

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR1 : TNF Receptor 1

TNFR2 : TNF Receptor 2

TNFRSF : TNF Receptor Superfamily

TNFRSF10A : TNF Receptor Superfamily Member 10A

TNFRSF10B : TNF Receptor Superfamily Member 10B

TNFRSF10C : TNF Receptor Superfamily Member 10C

TNFRSF10D : TNF Receptor Superfamily Member 10D

TNFRSF11B : TNF Receptor Superfamily Member 11B

TNFSF : TNF Superfamily

TNFSF10 : TNF Superfamily Member 10

TRADD : TNFR-associated Death Domain

TRAF : TNFR-associated Factor

TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

U2OS : İnsan Kemik Osteosarkoma Hücre Hattı

UPR : Unfolded Protein Response

UV : Ultraviolet

V : Volt

VDAC : Voltage-dependent Anion Channel

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

WHO : World Health Organisation

WiFi : Wireless Fidelity

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein

Zn : Çinko

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. İsrail'in farklı toprak özelliklerine sahip bölgelerinde yaşayan <i>Spalax ehrenbergi</i> 'nin dört farklı kromozomal türüne ait (2n=52, 54, 58 ve 60) hemoglobin ve hematokrit değerleri	6
Şekil 2. <i>Spalax galili</i> (S52), <i>Spalax judaei</i> (S60) ve <i>Rattus norvegicus</i> 'un (rat) normoksik karaciğer, kalp ve beyin dokularına ait ROS savunma genlerinin mRNA ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması	11
Şekil 3. <i>Spalax</i> p53'ü (sp53), Fare p53'ü (mp53) ve İnsan p53'ü (hp53) aminoasit dizi kıyaslaması	12
Şekil 4. WHO, International Agency for Cancer Research on Cancer, GLOBOCAN verilerine göre hazırlanmış, çok gelişmiş ülkeler ile az gelişmiş ülkelerdeki kanser insidansları ve kaba ölüm oranları	16
Şekil 5. WHO, International Agency for Cancer Research on Cancer, Global Cancer Observatory verilerine göre hazırlanmış, bazı gelişmiş devletlerin 1950-2013 yılları arasında kadın ve erkek cinsiyetlerine göre kanser kaynaklı kaba ölüm oranları	16
Şekil 6. WHO, International Agency for Cancer Research on Cancer, GLOBOCAN verilerine göre hazırlanmış, Türkiye ile Dünya geneli kanser insidansları ve kaba ölüm oranları	17
Şekil 7. Kocaeli Dilovası bölgesinde tespit edilen ölüm nedenleri ve kanserlerin bu ölüm nedenleri içerisindeki yüzdeler	18
Şekil 8. WHO, International Agency for Cancer Research on Cancer, GLOBOCAN verilerine göre hazırlanmış, 2035 yılına kadar Türkiye ve Dünya'da beklenen kanser insidansları ve ölüm oranları	19
Şekil 9. Kanserli bir hücre hattında zamanla farklı mutasyonların birikmesi	21
Şekil 10. TNF-related Apoptosis Inducing Ligand'ın bağlandığı reseptörler	39

Şekil 11.	TRAIL aracılı hücre ölümü mekanizması	40
Şekil 12.	Deney süresince takip edilen O ₂ miktarı	56
Şekil 13.	TNFRSF10A genine (DR4) ait aminoasit dizi hizalaması	58
Şekil 14.	TNFRSF10B genine (DR5) ait aminoasit dizi hizalaması	60
Şekil 15.	TNFRSF10C genine (DcR1) ait aminoasit dizi hizalaması	62
Şekil 16.	TNFRSF10D genine (DcR2) ait aminoasit dizi hizalaması	63
Şekil 17.	TNFRSF11B genine (OPG) ait aminoasit dizi hizalaması	65
Şekil 18.	CFLAR genine (FLIP) ait aminoasit dizi hizalaması	66
Şekil 19.	XIAP genine ait aminoasit dizi hizalaması	68
Şekil 20.	BIRC2 genine (cIAP-1) ait aminoasit dizi hizalaması	70
Şekil 21.	BIRC3 genine (cIAP-2) ait aminoasit dizi hizalaması	71
Şekil 22.	TNFSF10 genine (TRAIL) ait aminoasit dizi hizalaması	73

RESİMLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. Kör farenin görünümü (<i>Nannospalax nehringi</i>)	4
Resim 2. Kör farelerin toplandığı arazilerin uydu görüntüsü	47
Resim 3. Kör fareleri yakalamak için kullanılan çapa ve demir çubuk	48
Resim 4. Deney düzeneğinin tasarımı	50
Resim 5. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF10A geni (DR4) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	57
Resim 6. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF10B geni (DR5) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	59
Resim 7. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF10C geni (DcR1) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	61
Resim 8. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF10D geni (DcR2) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	62
Resim 9. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF11B geni (OPG) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	64
Resim 10. Normoksi ve %7 hipoksi altında CFLAR geni (FLIP) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	66
Resim 11. Normoksi ve %7 hipoksi altında XIAP geni akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	67
Resim 12. Normoksi ve %7 hipoksi altında BIRC2 geni (cIAP-1) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	69
Resim 13. Normoksi ve %7 hipoksi altında BIRC3 geni (cIAP-2) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	71
Resim 14. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFSF10 geni (TRAIL) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri	72

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Nannospalax nehgringi</i> türünün cinsiyetlere göre ağırlık ve vücut ölçüleri	5
Tablo 2. Normoksik koşullarda kör farelerin RBC, HCT, Hb, MCV, MCH ve MCHC değerleri ile Wistar ratlara kıyasla, kalp ile çizgili kas örneklerinin içerdiği miyogloblin miktarları	8
Tablo 3. Normoksi ve hipokside <i>Spalax ehrenbergi</i> ile Wistar ratların kan BPG ve Hb miktarları	8
Tablo 4. Bazı proto-onkogenler ve fizyolojik sınırlar içerisindeki görevleri	23
Tablo 5. Bazı tümör supressör genler ve fizyolojik sınırlar içerisindeki görevleri	24
Tablo 6. TNF Receptor Superfamily (TNFRSF)	34
Tablo 7. TNF Superfamily (TNFSF)	35
Tablo 8. TNF ligand ve reseptör etkileşimleri ile proliferasyon ve apoptozis etkileşimleri	36
Tablo 9. Çalışmada kullanılan primerler	45
Tablo 10. Kör farelerin yakalandığı arazilerin koordinatları ve arazi çalışmasının yapıldığı alanların yaklaşık metre kare değerleri	47

ÖZET

Yeraltı yaşamının yüksek derecede hipoksik olan koşullarına uyum sağlamış rodentler olan kör fareler, hipoksinin apoptotik süreçler üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi için kullanılacak benzersiz organizmalardır. Kör farelerin birçok anti-kanser özelliklerinin ortaya çıkarılmış olmasına karşı, p53 denetiminden ayrı olarak seçici bir şekilde kanser hücrelerini hedef alabilen TRAIL aracılı hücre ölümü doğaları ise henüz ortaya çıkartılmamıştır. Buna yönelik olarak, sunulan çalışmada, *Nannospalax nehringi*'de TRAIL aracılı hücre ölümünde rol alan ligand (TRAIL), reseptör (DR4, DR5, DcR1, DcR2 ve OPG) ve bazı anti-apoptotik proteinlerin (FLIP, cIAP-1, cIAP-2 ve XIAP) hipoksi altında mRNA seviyelerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ve biyoinformatik yöntemler yardımıyla bu proteinlere ait aminoasit dizilerinin ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, Kars'ın farklı popülasyonlarından toplanan erkek kör fareler Hipoksi Grubu (n=5) ve Normoksi Grubu (n=4) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Hipoksi Grubu'ndaki kör fareler, 52 saat boyunca tam karanlık koşullarda (24K:0A) %7 oksijen + %93 azot gaz karışımına maruz bırakılmıştır. Normoksi Grubu'ndaki kör fareler, tam karanlık koşullarda (24K:0A) normokside tutulmuştur. Deney sonunda kör farelerin beyin ve akciğer dokularından TRIzol yöntemiyle RNA izolasyonu yapılarak RT-PCR yöntemi ile TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, cIAP-1, cIAP-2 ve XIAP mRNA ekspresyonlarına bakıldı ve elde edilen PCR ürünlerinden sekans analizleri yapılmıştır. Agaroz jel elektroforez görüntülerinden elde edilen bant yoğunluklarının istatistiksel analizi sonucunda, gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Fakat bant görüntüleri gözlemsel olarak karşılaştırıldığında hipoksinin beyin dokusu DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, XIAP, cIAP-1 ve cIAP-2 mRNA ekspresyonlarında belirgin bir artışa neden olduğu görülmüştür. Yapılan biyoinformatik analizlerde ise *Nannospalax nehringi*'ye ait TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, cIAP-1, cIAP-2 ve XIAP proteinlerini kodlayan aminoasit bilgilerinde insan ve diğer türlerden farklı aminoasit dizilerinin yer aldığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ortaya çıkardığımız bu proteinlere özgü farklılıkların, kör farelerin hipoksik koşullarda yaşamak için evrimleşmiş bir takım adaptasyonlar

olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, *Nannospalax nehringi*'de bu proteinlerin aminoasit dizilerindeki farklılıkların biyolojik önemine yönelik olarak yapılacak çalışmaların, tümör kitleleri üzerindeki hipoksi stresi sonucunda TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı oluşan direncin aşılabilmesi açısından yeni bir adım olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, FLIP, IAP, *Nannospalax nehringi*, TRAIL.



SUMMARY

Blind mole rats, the rodents that adapt to the highly hypoxic conditions of underground life, are unique organisms that can be used to understand the effects of hypoxia on apoptotic processes. Although many anti-cancer properties of blind mole rats are discovered, TRAIL-mediated cell death, which is able to selectively target cancer cells separately from p53 control, is inherently unexplored. In the present study, it was aimed to determine the changes in the mRNA levels of ligand (TRAIL), receptor (DR4, DR5, DcR1, DcR2 and OPG) and some anti-apoptotic proteins (FLIP, cIAP-1, cIAP-2 and XIAP) involved in TRAIL-mediated cell death in *Nannospalax nehringi* under hypoxia and to identify amino acid sequences of these proteins employing bioinformatics methods.

For this purpose, the male blind mole rats collected from different populations of Kars were divided into two groups; Hypoxic Group (n=5) and Normoxic Group (n=4). The blind mole rats in the Hypoxic Group were exposed to a mixture of 7% oxygen + 93% nitrogen gas under full dark conditions (24K:0A) for 52 hours. The blind mole rats in the Normoxic Group were kept under normoxia in full darkness (24K:0A). Later on, RNA of the brain and lung tissues of blind mole rats were isolated by TRIzol method and expressions of TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, cIAP-1, cIAP-2 and XIAP mRNA were investigated through RT-PCR and sequence analyzes of the obtained PCR products were performed. No significant difference was found between the groups after statistical analysis of the band densities on the agarose gel electrophoresis images. However, when the band images are compared visually, it was found that hypoxia caused a significant increase in DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, XIAP, cIAP-1 ve cIAP2 mRNA expression levels in brain tissue. In the bioinformatics analysis it was determined that amino acid sequences encoding TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, cIAP-1, cIAP-2 and XIAP proteins of *Nannospalax nehringi* have different amino acid sequences from human and other species.

In conclusion, we think that the differences between these proteins are a number of adaptations that blind mole rats have evolved to live in hypoxic conditions. In addition, we also think that further studies on biological importance of

the differences in the amino acid sequences of these proteins in *Nannospalax nehringi* may be a new step in terms of overcoming resistance to TRAIL mediated cell death as a consequence of hypoxia stress on tumor cell masses.

Keywords: Apoptosis, FLIP, IAP, *Nannospalax nehringi*, TRAIL.



1. GİRİŞ ve AMAC

Tüm canlılar soylarını sürdürmek için ürer ve meydana getirdikleri yeni bireylere kalıtsal miras olarak DNA bırakırlar. DNA, şu ana kadar bilinen bütün canlılar için ortak olan bir kullanma kılavuzu olarak tüm metabolik ve davranışsal soruların cevaplarını barındırır. DNA üzerindeki bazı gen bölgeleri canlıyı oluşturan yapıtaşlarını kodlarken bazı bölgeler canlı tarafından ifade edilmezler. Bu ifade edilmeyen bölgelerin bir kısmı ise ifade edilen bölgelerin denetimini sağlamaktadır. Organizmanın yaşamını sorunsuz bir şekilde tamamlaması, tüm çevresel etmenler bir kenara bırakılırsa, metabolik düzeyde uyum ve sıkı bir denetim gerektirir. Bunun sağlanması içinse, DNA'nın sağlıklı bir şekilde faaliyetlerini sürdürmesi gerekmektedir. Fakat DNA bozulmayacak bir mükemmellikte değildir. Radyasyon, viral ve bakteriyel ajanlar, çeşitli kimyasallar ve UV (Ultraviyole) gibi birçok etmen DNA üzerinde hasarlara sebep olmakta ve sonuçta DNA'nın hücre üzerindeki denetimini ve kodladığı yapıtaşlarının işlevlerini bozmaktadır. Bu tür durumlar sonunda, DNA'da hücrenin kontrollü bölünebilirliği üzerine kodlanmış bölgelerde mutasyonlar meydana gelirse, hücre denetimsiz olarak bölünmeye başlayarak kanser olarak isimlendirilen durum ortaya çıkmaktadır.

TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand), TNF (Tumor Necrosis Factor) ligand ve reseptör ailesine ait bir transmembran proteindir. TRAIL, iki işlevsel ve üç yem reseptör olarak toplamda beş farklı reseptörü etkileyebilmekte ve p53'den bağımsız olarak apoptozisi indükleyebilmektedir. Yapılan çalışmalarla kanserli hücreleri ortadan kaldırırken sağlıklı hücrelere zarar vermemesi ile TRAIL'in kanser tedavisinde umut vadeden yollardan biri olduğu gösterilmiş ve birçok araştırmacı tarafından TRAIL'a karşı dirençli kanser hücre hatlarının dirençlilik mekanizmaları anlaşılmasına ve aşılmasına çalışılmıştır. Hipoksik koşullar da anti-apoptotik faktörlerin aktivasyonlarını arttıran ve bu yolla TRAIL aracılı hücre ölümünü baskılayabilen unsurlardan biridir. Bu yönüyle hipoksinin, dolaylı olarak tümör gelişimine katkı sağladığı düşünülebilir.

Kör fareler, hipoksinin olumsuz etkilerine karşı direnç kazanmış, yaşamlarını yeraltında açtıkları tünellerde geçiren *Spalacidae* familyasına ait kazıcı kemirgenlerdir. Kör farelerin yaşadıkları galerilerin, bölge toprağının sertlik

durumuna ve iklimsel yağış periyoduna göre değişebilen oksijen yoğunluğu, kış dönemlerinde %7 gibi oldukça hipoksik değerlere düşebilmektedir. Yeraltı yaşamının bu derece hipoksik ve karanlık olması, araştırmacıları bu canlıların doğasını keşfetmeye yöneltmiş ve yapılan farklı çalışmalar ile kör farelerin, hipoksinin olumsuz etkilerine karşı koyabilecek birçok evrimsel uyarlanmaya sahip oldukları ortaya çıkartılmıştır.

Kör fareler, oksijeni verimli kullanabilmek başta olmak üzere kendilerine has birçok farklı fizyolojik özelliğe sahiptirler ve bunlar arasından en ilgi çekici olanları sahip oldukları anti-kanser özellikleridir. Bu özelliklerinden dolayı, birçok kanser araştırmasında ve kansere dirençlilik yöntemlerinin anlaşılmasında kullanılan önemli bir organizma olarak yerlerini almışlardır. Bu özelliklerden belki de en eşsizi, birçok ileri evre insan kanserinde mutasyona uğrayan p53 geninin evrimleşmiş bir formuna sahip olmalarıdır. TRAIL aracılı hücre ölümünün p53 denetiminden bağımsız olarak programlı hücre ölümüne yol açtığı bilirse de, TRAIL ligandının bağlanabildiği DR5'in (Death Receptor 5) ekspresyonunun mutasyona uğrayan p53 tarafından baskılanabildiği bilinmektedir.

Günümüze dek, TRAIL aracılı hücre ölümünü tetikleyerek kanser tedavilerine yeni bir soluk kazandırmaya yönelik birçok yöntem denenmiştir. Fakat bu yöntemlerin birçoğu kanser hücrelerinin geliştirdiği birtakım dirençler ile karşılaşmış ve bu alanda çalışan araştırmacıları farklı, girift yöntemlere savurmuştur. Kör farelerde TRAIL aracılı hücre ölümünde rol oynayan ligand, reseptör ve anti-apoptotik yapıların doğası ise henüz ortaya çıkartılmamıştır. Bu yönüyle, benzersiz evrimsel özelliklere sahip kör fareler, TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı oluşan dirençliklerin anlaşılmasında ve de bu apoptotik yolun hipoksi ile ilişkisinin aydınlatılmasında ilgili araştırmacılara yeni bir sayfa açabilecek, elverişli organizmalardır. Kör farelerdeki TRAIL aracılı hücre ölümü doğasının ortaya çıkartılması, bu alanda yeni fikirlerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Yaptığımız bu çalışma ile kör farelerde hipoksinin, TRAIL aracılı hücre ölümünde rol oynayan TRAIL ligandı ve bu ligandın bağlanabildiği DR4 (Death Receptor 4), DR5, DcR1 (Decoy Receptor 1), DcR2 (Decoy Receptor 2) ve OPG

(Osteoprotegerin) reseptörleri, hipoksi ile aktivite göstererek apoptozisi baskıladığı bilinen IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) ailesine üye olan cIAP-1, cIAP-2 ve XIAP ile kaspaz-8'in negatif dominantı anti-apoptotik FLIP (FLICE-Like Inhibitory Protein) mRNA ekspresyonları üzerindeki olası etkilerinin belirlenmesi ve bu genlerin biyoinformatik analizlerinin sunulması hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kör Farelerin Genel Özellikleri

2.1.1. Kör Farelerin Morfolojik Özellikleri

Kör fareler görünüm olarak silindirik bir vücuda sahiptirler ve vücutları koyu gri kıllarla örtülüdür. Burun bölgelerinin yanlarından kulağa doğru uzanan beyaz renkli uzun ve sert kıllar sayesinde dokunma duyusu sağlanır. Ayakları beş parmaklıdır. Kuyrukları ise küçük kısa bir çıkıntı halindedir (Resim 1) (Coşkun ve Ulutürk 2004).



Fotoğraf: Barış Yıldız

Resim 1. Kör farenin görünümü (*Nannospalax nehringi*).

Kör farelerin en dikkat çekici morfolojik özelliği, dışarıdan bakıldığında gözlerinin olmayışdır. Von Baer yasasına uygun olarak, erken embriyonal dönemde optik çukurları ve gözün innerve edilmesi normal olarak devam eder (Sanyal ve ark. 1990). Fakat ergin bireylerin gözleri derilerinin altında kalır ve atrofiktir. Yaşadıkları galerilerin karanlık olmasından dolayı, kör farelerin gözleri üzerinde pozitif seçim baskısı oluşturmamasının bir sonucu olarak, gözlerinin atrofiye uğradığı düşünülebilir. Tunceli, Bingöl ve Elazığ bölgelerinde yakalanan *Nannospalax*

nehringi'nin cinsiyetlere göre boy ölçüleri ve ağırlıkları Coşkun ve Ulutürk (2004) tarafından gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. *Nannospalax nehringi* türünün cinsiyetlere göre ağırlık ve vücut ölçüleri (Coşkun ve Ulutürk 2004).

	Dişi		Erkek	
	Ağırlık	Boy	Ağırlık	Boy
En Büyük	235 g	227 mm	281 g	238 mm
En Küçük	115 g	165 mm	115 g	172 mm
Ortalama	163,42 g	190,57 mm	164,6 g	191 mm

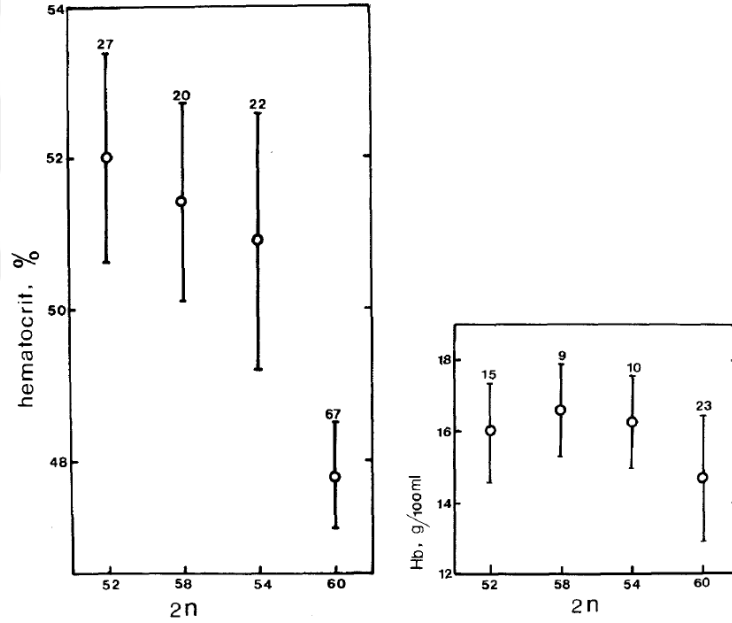
2.1.2. Kör Farelerin Fizyolojik Özellikleri

Kör farelerde gözlerin atrofik olmasına karşı, Rado ve ark. (1992) tarafından *Spalax ehrenbergi* üzerinde yapılan çalışmada karanlık ya da aydınlık seçenekleri olan kör farelerin karanlık bölgede uyumayı tercih ettikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca yine *Spalax ehrenbergi* üzerinde Ben-Shlomo ve ark. (1996) tarafından yapılan çalışmada, kör farelerin lokomotor aktivitelerine ve bir melatonin metaboliti olan 6-Sulphatoxymelatonin'in idrardaki sekresyonuna farklı fotoperiyotların etkileri incelenmiş ve fotoperiyotlara göre 6-Sulphatoxymelatonin'in sekresyonunun farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. İnsanlarda melatonin takviyesi uykusuzluk ve yorgunluğa sebep olurken, kör farelerde melatonin salınımı ile azalan lokomotor aktivite arasında ilişki yoktur. Melatoninin ritmik salınımı memelilerde sirkadiyen organizasyon için gerekli bir unsur olsa da, bu kör farelerin sirkadiyen lokomotor aktiviteleri için geçerli değildir (Ben-Shlomo ve ark. 1996).

Kör farelerin sahip olduğu bir diğer fizyolojik özellikleri ise düşük oksijen basıncına toleranslarıdır. Galerilerinin atmosfer ile direk teması olmadığından gaz difüzyonu toprak yolu ile olmaktadır. Toprağın yapmış olduğu bu bariyer görevi sonucunda galerilerinin parsiyel oksijen basıncı, yağışlı aylarda bölgenin toprak sertliğine göre de değişebilmekle beraber, %6-7 gibi oldukça hipoksik olabilmektedir (Shams ve ark. 2005a). Kör farelerin hipoksiye bu denli dirençli olmalarının sebebi, oksijeni daha verimli kullanabilmelerinden kaynaklıdır. Kör farelerde oksijenin vücuda ilk giriş yeri olan akciğerlerin total hacmi, alveolar yüzey alanı ve kapiller yoğunluk beyaz ratlara nazaran daha yüksektir. Bunun bir sonucu olarak pulmoner difüzyon kapasitesi %44 oranında daha fazladır (Widmer ve ark. 1997). Çizgili

kasların total vücut kütesine oranı kör farelerde beyaz ratlara kıyasla daha az olmasına karşı, çizgili kaslardaki miyoglobin, mitokondri ve kapiller yoğunluk önemli ölçüde yüksektir (Widmer ve ark. 1997).

Bu canlıların sahip oldukları hematolojik değerler de farklı bilim insanları tarafından araştırılmıştır. Arieli ve ark. (1986) tarafından yapılan çalışmada, İsrail'in farklı toprak özelliklerine sahip bölgelerinde yaşayan *Spalax ehrenbergi*'nin dört farklı kromozomal türüne ait ($2n=52, 58, 54$ ve 60) Hb (Hemoglobin) ve HCT (Hematokrit) değerleri Şekil 1'de gösterilmiştir. $52, 58$ ve 54 kromozomal türleri arasında HCT değerleri istatistiksel fark göstermezken, daha kurak ve az yağışlı bölgede yaşayan 60 kromozom türüne ait HCT değeri ise bu gruplara kıyasla istatistiksel olarak daha düşüktür.



Şekil 1. İsrail'in farklı toprak özelliklerine sahip bölgelerinde yaşayan *Spalax ehrenbergi*'nin dört farklı kromozomal türüne ait ($2n=52, 54, 58$ ve 60) hemoglobin ve hematokrit değerleri (Arieli ve ark. 1986).

Globinler prostetik grup içeren ve bu sayede oksijeni geri dönüşümlü bir şekilde bağlayabilen makromoleküllerdir. Kan doku elemanlarından olan eritrositlerin ihtiva ettiği hemoglobin ve çizgili kas dokusunda bulunan miyoglobin başta olmak üzere, Ngb (Nöroglobin) ve Cygb (Sitogloblin) de mevcuttur. Nöroglobinler başta beyin olmak üzere birkaç dokuda bulunur ayrıca retina dokusu

da yoğun olarak nöroglobin içermektedir. Ngb'nin esas görevi nöral oksijen homeostazına katkıda bulunmak ve hipoksiye karşı koruma sağlamaktır. Ngb diğer memeli türlerinden farklı olarak kör farelerin ayrıca glia hücrelerinde de bulunmaktadır (Avivi ve ark. 2010). Cygb ise esas olarak fibroblastlar, fibroblastlarla ilişkili hücreler ve sinir hücreleri popülasyonlarında bulunur (Hankeln ve ark. 2005). Hankeln ve ark. (2005) tarafından, kör farelerin Ngb ve Cygb proteinlerini kodlayan gen bölgelerinin, diğer rodentler ve insanlardan farklılıklarını belirlemek amacıyla *Spalax carmeli*'nin model organizma olarak kullanıldığı bir araştırmada, her ne kadar bu iki proteini kodlayan gen bölgelerinde farklılık bulduysa da bu farklılıkların *Spalax*'lar için adaptif bir evrim değişimi sonucunda oluşmadığı bildirilmiştir. Avivi ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada ise, *Rattus norvegicus* ile kör fare türleri olan *Spalax judaei* ve *Spalax galili*'nin, normoksik ve hipoksik koşullar altında beyin, karaciğer ve kalp dokularındaki Ngb ve Cygb mRNA seviyeleri belirlenmiştir. Araştırmacıların sonuçlarına göre, normoksik koşullar altında *Spalax* türlerinin beyin dokularında Ngb protein miktarı ile ifade edilen Ngb mRNA miktarının ve kalp dokularında Cygb protein miktarı ile ifade edilen Cygb mRNA miktarının *Rattus*'a kıyasla oldukça yüksek olduğu ve bu farkın hayvanlara hipoksi uygulanması ile daha da arttığı ortaya çıkartılmıştır.

Ar ve ark. (1977) tarafından *Spalax ehrenbergi* ve Wistar rat kullanılarak yapılan araştırmada, her iki türe ait canlıların farklı hematolojik parametrelerin yanında, kalp ve çizgili kas örneklerinin içerdiği miyogloblin miktarları belirlenmiştir. Bu sonuçların gösterdiği üzere, kör farelerin sahip oldukları bazı hematolojik parametreler diğer memeli türleri ile normal aralıktayken, HCT, Hb, RBC (Kırmızı Kan Hücreleri) ve MCHC (Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu) değerleri diğer memelilere kıyasla yüksektir (Dunaway ve Lewis 1965, Ar ve ark. 1977). Kör farelerin sahip oldukları MCV (Ortalama Eritrosit Hacmi) değeri ise, 20 gram altı memeliler, lama ve keçi gibi düşük eritrosit hacmine sahip türler dışında diğer memeli türlerinden daha düşüktür (Dunaway ve Lewis 1965, Holland ve Forster 1966, Ar ve ark. 1977).

Araştırmacıların bildirdiği değerlere göre Ar ve ark. (1977), kör fare kalp kasının içerdiği Mb (Miyogloblin) miktarı ratların sahip olduğu değerlerden önemli

bir farklılık göstermemesine karşı, çizgili kaslarının içerdiği Mb miktarı ratlara nazaran üç kat daha yüksektir (Tablo 2).

Tablo 2. Normoksik koşullarda kör farelerin RBC, HCT, Hb, MCV, MCH ve MCHC değerleri ile Wistar ratlara kıyasla, kalp ile çizgili kas örneklerinin içerdiği miyoglobin miktarları (Ar ve ark. 1977).

RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	HCT (%)	Hb (g/100 mL)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (g/100mL)
14.0	45.6	15.0	36.0	11.9	33.1

Kalp Kası				Çizgili Kas (Çene Kası)			
Mb/ıslak doku (mg/g)		Mb/kuru doku (mg/g)		Mb/ıslak doku (mg/g)		Mb/kuru doku (mg/g)	
Kör Fare	Rat	Kör Fare	Rat	Kör Fare	Rat	Kör Fare	Rat
1.44	1.96	5.47	10.94	4.00	1.21	15.81	6.17

BPG (2,3-Bifosfogliserat) ise eritrositlerde bulunan glikoliz ürünlerinden olup, hemoglobine geri dönüşümlü bağlanabilme özelliğine sahiptir. Uzun süreli hipoksi durumlarında BPG miktarı artarak oksijen-hemoglobin saturasyon eğrisinin sağa kaymasına sebep olur (Guyton ve Hall 2017). Ar ve ark. (1977)'a göre *Spalax ehrenbergi* ve Wistar ratların, normoksi ve hipoksi durumlarında kanlarında sahip oldukları BPG ve Hb miktarları Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Normoksi ve hipokside *Spalax ehrenbergi* ile Wistar ratların kan BPG ve Hb miktarları (Ar ve ark. 1977).

Kör fare				Rat			
Normoksi		Hipoksi		Normoksi		Hipoksi	
BPG ($\mu\text{mol/mL}$)	Hb ($\mu\text{mol/mL}$)	BPG ($\mu\text{mol/mL}$)	Hb ($\mu\text{mol/mL}$)	BPG ($\mu\text{mol/mL}$)	Hb ($\mu\text{mol/mL}$)	BPG ($\mu\text{mol/mL}$)	Hb ($\mu\text{mol/mL}$)
2.14	17.3	2.15	22.2	1.57	12.7	2.01	22.7

Araştırmacılar Tablo 3'te gösterilen değerleri analiz ederken, her iki türde hipoksi koşullarında Hb değerlerinin arttığını, ratların Hb değerlerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlıyken kör fare Hb değerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı

olmadığını bildirmişlerdir. BPG değişimleri için araştırmacılar, hem ratların hem de kör farelerin hipoksi altındaki BPG değerlerindeki artışın anlamlı olmadığını, her iki türün hipoksi koşulları altında yakın BPG değerlerine sahip olduklarını bildirmişler ve kör farelerin hipoksiye karşı BPG miktarlarını artırmadıklarının altını çizmişlerdir (Ar ve ark. 1977).

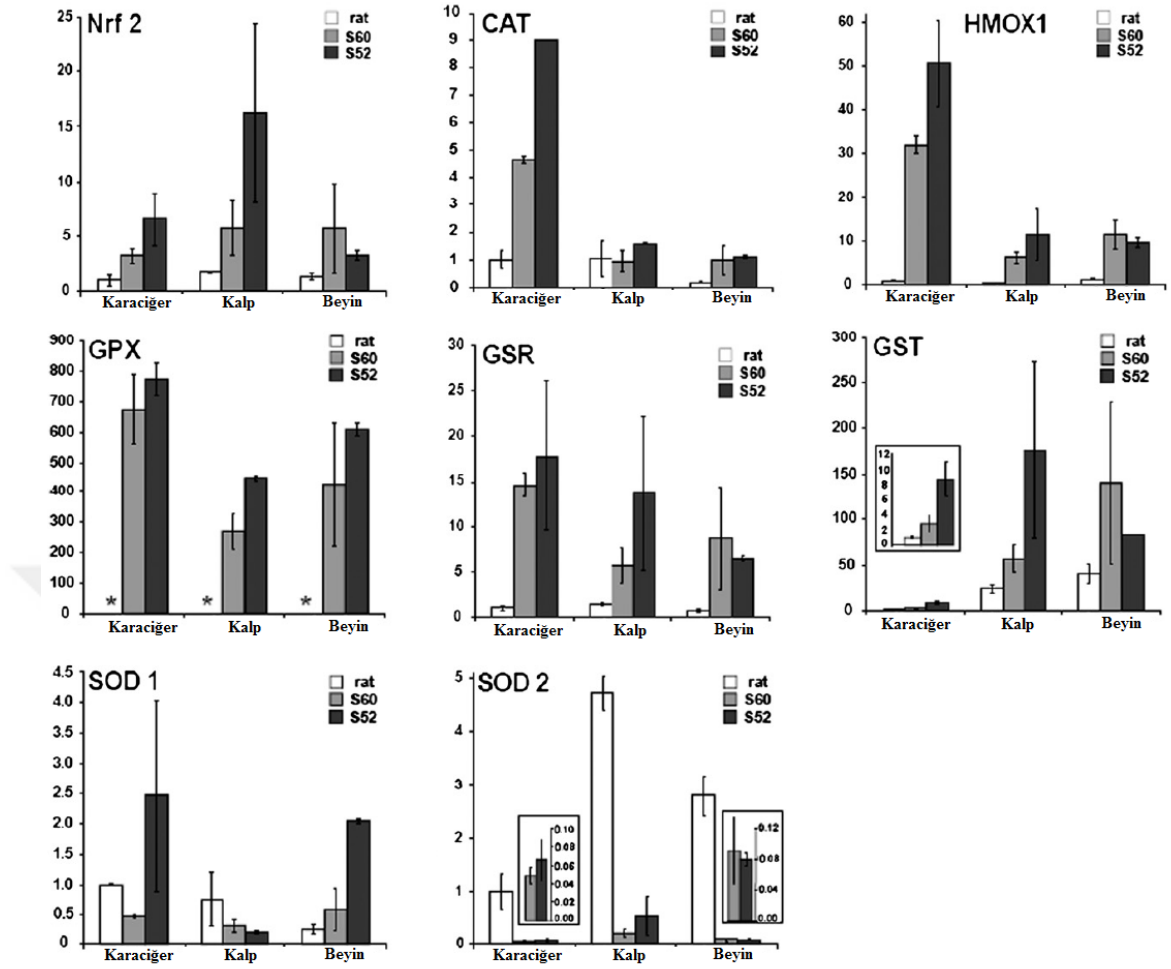
Dokulara yeterli oksijenin ulaştırılması için ayrıca uygun bir damarlanma gereklidir. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), fizyolojik bir süreç olarak yeni kan damarlarının oluşturulmasında kritik önemi olan, anjiyogenetik bir faktördür. Avivi ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada kör fareler ve ratlar hipoksik ve normoksik koşullar altında tutularak, beyin ve çizgili kas dokularında ifade edilen VEGF ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır. Çalışma bulgularına göre hipoksi koşullarında, ratların beyin VEGF mRNA seviyeleri normoksik değerlere göre 1.6 kat artarken, çizgili kas VEGF mRNA seviyeleri ise normoksik değerlere göre 2.2 kat artmıştır. Hipoksi koşullarında kör farelerdeki bu değerlerde ise beyin için 2.3 katlık bir artış gözlemlenirken, çizgili kaslarda VEGF mRNA düzeyinde anlamlı fakat düşük bir azalmanın olduğu bildirilmiştir. Yapılan farklı bir çalışmada ise kör farelerin normoksi altında hem VEGF hem de HIF-1 α mRNA düzeylerinin ratlara kıyasla 1.6 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Avivi ve ark. 2005b).

Kör farelere ait bu hematolojik veriler incelenirken, hipoksiye karşı hematolojik uyumlarının tam olarak anlaşılabilmesi için yukarıda belirtilen tüm fizyolojik veriler bir bütün olarak değerlendirilmelidir.

2.1.3. Kör Farelerin Sahip Olduğu Anti-Kanser Özellikleri

Kör fareler yeraltı yaşamının zorlu koşullarına iyi bir şekilde uyum göstermiş, benzersiz canlılardır. Yeraltı yaşamının kör fareler üzerinde etkili olan en zorlayıcı özelliği ise hipoksik olmasıdır. Oksijen ise birçok ökaryotik canlının hayatına devam edebilmesi için gerekli olan birkaç elzem elementten biridir. Oksijen enerji metabolizmasında işlev görürken, hücre içerisinde yoğunluğunun iyi kontrol edilememesi ROS (Reactive Oxygen Species) artışını sağlar. Hipoksik koşullar kör fareler dışındaki canlılarda ROS üretimini arttırarak, birçok zararlı etkiye neden olur (Lluis ve ark. 2005). Oksidatif strese neden olan ROS artışı, hücrenin temel

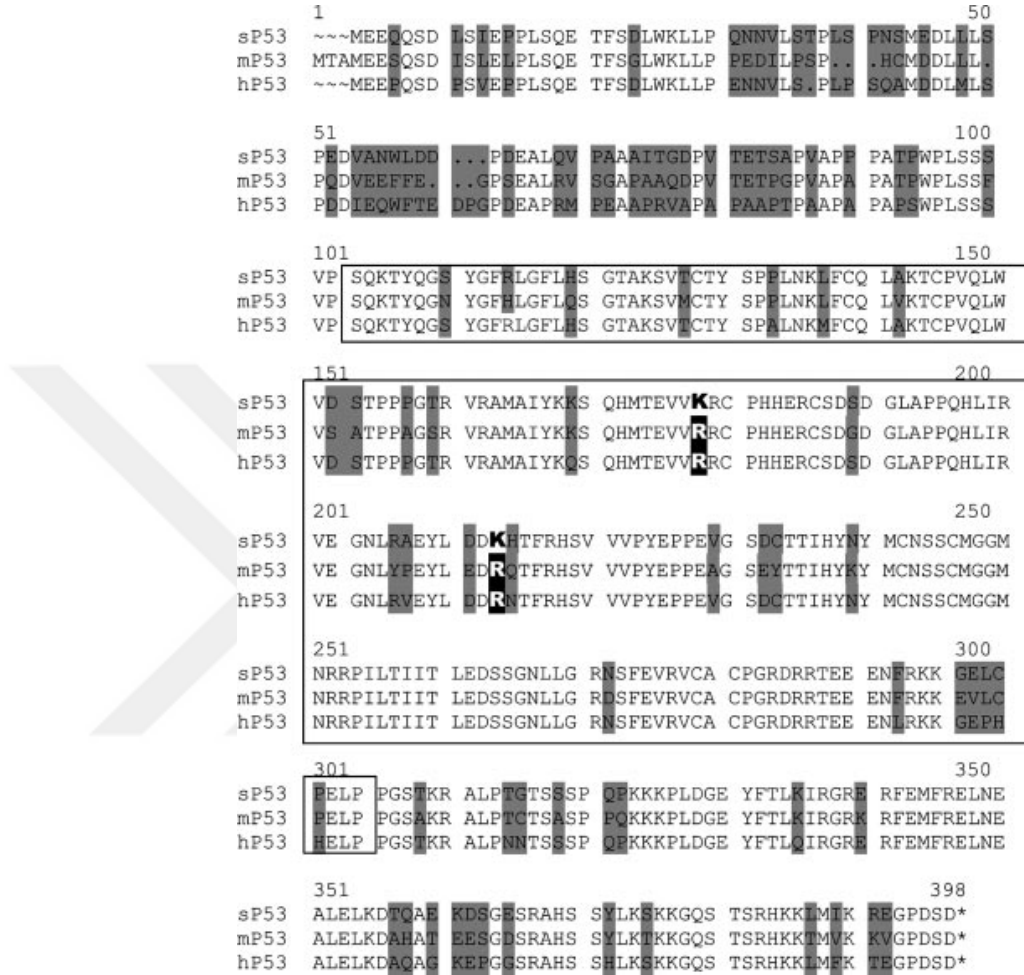
yapıtaşları olan karbonhidrat, protein ve lipitlerin yanı sıra, hücrenin kalıtsal materyali olan DNA'ya ve hücre içerisinde birçok önemli görevi olan RNA'ya zarar verir (Schülke ve ark. 2012). Bu zararlardan korunmak için hücre içerisinde antioksidan enzimler olarak bilinen ve elektron verme yetenekleri sayesinde oksidatif stresi baskılayan yapılar mevcuttur. Transkripsiyonel faktör Nrf2 (Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2) ise, hücre içerisinde detoksifikasyon enzimleri ile antioksidan proteinleri kodlayan genleri düzenleyen ARE (Antioxidant Response Element) aracılı hücre savunma sistemini düzenleyerek, oksidatif strese karşı hücrede antioksidan cevabın oluşmasını sağlayan savunma sistemidir (Lee ve ark. 2005). Nrf2 ayrıca Gstp1 (Glutathione-S-transferase pi 1), GPX (Glutathione Peroxidase), HMOX1 (Heme Oxygenase 1), GSR (Glutathione-disulfide Reductase), SOD1 (Superoxide Dismutase) ve CAT'ın (Catalase) ekspresyonlarını düzenler (Schülke ve ark. 2012). Schülke ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, kör fare türlerinden olan *Spalax galili* (S52) ve *Spalax judaei* (S60) ile *Rattus norvegicus*'un antioksidan genleri ve bu genleri kontrol eden transkripsiyonel faktör Nrf2'nin ekspresyon profilleri incelenmiştir. Çalışmada deneysel olarak oluşturulan oksidatif strese ratlar ilgili antioksidan genlerini düzenleyerek cevap verirken, kör fareler bir reaksiyon göstermemektedir. Ayrıca normoksi altında antioksidan gen mRNA ekspresyonlarının dokulara göre farklılık gösterdiği ve en yüksek mRNA ekspresyon değerlerine *Spalax galili*'nin sahip olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 2). *Spalax galili* ile *Rattus norvegicus* arasında, GPX karaciğer mRNA ekspresyon miktarı farkı, yaklaşık 800 katlık bir katlanma göstermektedir. Tüm bunlara ek olarak, araştırmacılar tarafından kör farelerin Nrf2 gen bölgesini kodlayan DNA dizisinin farklı bir aminoasit dizisine sahip olduğu belirlenmiş, bu farklılığın yüksek antioksidan mRNA profilinden sorumlu olduğu ve pozitif evrimsel seçilime işaret ettiği düşünülmüştür (Schülke ve ark. 2012).



Şekil 2. *Spalax galili* (S52), *Spalax judaei* (S60) ve *Rattus norvegicus*'un (rat) normoksik karaciğer, kalp ve beyin dokularına ait ROS savunma genlerinin mRNA ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması (Schülke ve ark. 2012). (*) ile işaretlenmiş değerler çok küçük verileri ifade etmektedir.

Hücre içi antioksidan savunmadan ayrı olarak, hücre genetik materyalinin denetimini üstlenen bazı yapılar bulunmaktadır. Bu yapılardan biri olan p53 ise, DNA hasarı ve hipoksi gibi çeşitli stres koşullarında hücrenin cevabını oluşturulmasını sağlayarak, eğer gerekli ise hücre bölünmesinin durdurulması ya da hücrenin apoptoz yoluyla kontrollü olarak öldürülmesini sağlayan bir tümör supressör genidir. p53 mutasyona uğrayarak hücrenin kontrolsüz olarak bölünmesine yardımcı olduğundan, proto-onkogenler içerisinde değerlendirilir (Finlay ve ark. 1989). p53'ün ileri evre insan kanserlerinin büyük bölümünde mutasyona uğradığı bildirilmiştir (Greenblatt ve ark. 1994). Kör farelerde ise, insan p53'ünde 174. ve 209. pozisyonlara denk gelen bölgelerde Arjinin aminoasidi yerine Lizin aminoasidinin

geldiği ortaya çıkartılmıştır (Şekil 3). R174K bölgesi (Arg-174) ise insan kanserlerinin çoğunda sıklıkla mutasyonların meydana geldiği bölgedir (Ashur-Fabian ve ark. 2004).



Şekil 3. Spalax p53'ü (sp53), Fare p53'ü (mp53) ve İnsan p53'ü (hp53) aminoasit dizi kıyaslaması (Ashur-Fabian ve ark. 2004).

Yakın bir zamana kadar, kör farelerin sahip olduğu R174K bölgesince evrimleşmiş p53 formunun (sp530), yalnızca mitokondriyal apoptoz yolağında önemli işlevi olan Apaf-1'in (Apoptotic Protease Activating Factor 1) promotör aktivasyonunu 3 kat arttırdığı (Ashur-Fabian ve ark. 2004) bilinmekteydi. Fakat yakın bir zamanda Ellis ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, sp53 proteininin plazmitlerce p53-null insan akciğer kanser hücre hatlarına (H1299) aktarılması ile bu hücrelerde, kaspaz temelli hücre ölümünün yanında otofajinin de gerçekleştiği gösterilmiştir.

KontROLSÜZ proliferasyonun bir diğer nedeni ise hücrelerin birbirleri arasındaki sinyalizasyonun bozulmasıdır. Sağlıklı hücreler bölünürken, birbirleriyle temas ettikleri anda büyümeyi durdururlar ve bu durum ECI (Early Contact Inhibition) olarak isimlendirilir. Kanserli hücrelerde ise ECI ortadan kalktığından hücrelerin proliferasyonu durmamaktadır. Gorbunova ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada ise, iki farklı *Spalax* türü olan *Spalax judaei* ve *Spalax golani*'nin farklı dokularından fibroblastlar alınmış ve ECI duyarlılığı açısından *Mus musculus*'unki ile karşılaştırılmıştır. Araştırmacıların sonuçlarına göre kör farelerin fibroblastlarında ECI meydana gelmemekte fakat ilginç olarak belirli bir yoğunluktan sonra tüm hücre hattı kendi kendini öldürmektedir. Çalışma ekibi ilk defa böyle bir durum ile karşılaştığından bu durumu Kararlaştırılmış Hücre Ölümü (Concerted Cell Death – CCD) olarak isimlendirmişlerdir. Flow cytometry analizi ile ölümlerin büyük çoğunluğunun nekrotik hücre ölümünden kaynaklandığı gösterilerek interferon analizleri ile de bu toplu ölüme IFN- β 'nin (Interferon- β) aracılık ettiği ortaya çıkarılmıştır (Gorbunova ve ark. 2012).

2.2. Hipoksi Nedir?

Evrin ağacının kolları, sayısız yaşam tarzına uyum sağlamış, farklı görünümlü canlıları barındırır. Tüm bu canlıların canlılık özelliklerinin temeli ise enerjinin dönüştürülmesine dayanır. Canlılar, enerji elde edebilecekleri molekülleri çeşitli kimyasal reaksiyonlarla işleyerek, homeostazilerini sağlamaya çalışırlar. Birçok canlı bu enerji üretim sürecinde oksijene ihtiyaç duyar ve oksijen olmaksızın hayatlarını sürdürmezler.

Dünyamız, canlılar arasındaki karşılıklı uyum neticesiyle, coğrafik bölgelere göre değişmekle birlikte, deniz seviyesinde ortalama %20-21'lik (210 hPa ya da mbar) oksijen yoğunluğuna sahiptir (Peacock 1998). Bunun bir sonucu olarak birçok canlının tolere edebildiği oksijen yoğunluğu aralığı oldukça dardır. Hipoksi, organizmada dokuların yeterli oksijen miktarından yoksun kalma durumu olarak tanımlanmaktadır (Harris 2002).

HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1), hücre içerisinde iki helix-loop-helix protein olan HIF-1 β alt ünitesi ile HIF-1 α alt ünitesinin oluşturduğu bir

heterodimerdir. HIF-1 β alt ünitesi, esas bir nükleer protein olarak transkripsiyon sürecinde görev alırken, HIF-1 α alt ünitesi ise büyük ölçüde hipoksi tarafından uyarılır (Schofield ve Ratcliffe 2004). Esasında HIF direkt olarak oksijen yoğunluğuna karşı bir duyarlılık göstermez. Bu özelliği HIF'e, hücre içi oksijen basıncına duyarlı sensör enzimler katmaktadır. Bu enzimler Non-haem Oksidasyon Enzim Ailesi 2-Oksoglutarat ve Demir Bağımlı Dioksijenaz'ın bir sınıfına ait PHD (Prolyl Hydroxylase Domain proteinler) ve FIH (Factor-Inhibiting HIF-1) olarak bilinen Asparaginyl Hydroxylase'dır (Pouyssegur ve ark. 2006). Bu sensör enzimler, HIF-1 α üzerinde ilişkili bölümlere bağlanarak HIF-1 α 'nın çekirdeğe göç etmesini ve HIF-1 β ile heterodimer oluşturmasını tetikler (Metzen ve Ratcliffe 2004). Ardından bu yapı, DNA üzerinde hedef genlerin HREs (Hypoxia Response Elements) bölgelerine bağlanarak yanıt meydana getirir (Weidemann ve Johnson 2008).

Tümör dokusunun üç boyutlu yapısının iç kısımlarında kalan hücrelerin, yaşamlarına devam edebilmeleri için enerji üretmeleri gerekmektedir. Bu durumdan yoksun kalan hücre grupları hipoksiye maruz kalarak birtakım hipoksi faktörleri sentezlerler ve bu bakımdan tümör büyümesinde hipoksi kilit bir rol üstlenmektedir (Harris 2002). *In vitro* tümör çalışmalarında, maruz kalma süresi ve şiddetine göre etkisi değişmekle birlikte hipoksinin; hücre proliferasyonu, farklılaşması, HIF-1 α aracılı p53 aktivasyonunun tetiklenmesi ve hücre siklusu arresti gibi birçok etkiye sahip olduğu ortaya çıkartılmıştır (Vaupel ve Mayer 2007). Organizma boyutunda bakılacak olduğunda ise, canlının yaşama devam etmesi için, azalan oksijen basıncına karşı uyum göstermesi gereklidir. Bu adaptasyonlardan ilki dokulara yeterli oksijenin ulaştırılabilmesi için eritrosit sayısının artırılmasıdır. Eritropoietin (Epo) kemik iliğini uyararak eritrosit oluşumunu (Eritropoez) indükleyen bir hormondur ve hipoksiye maruz kalma sonucunda ağırlıklı olarak böbreklerden sentezlenir (Yiğit 2011). Eritropoietin hormonunun salgılanmasını sağlayan Epo geni HIF-1'in etkilediği hedef genlerden biridir. HIF-1'in bu önemli rolü kör farelerin hipoksiye karşı geliştirdikleri adaptasyonda önemli bir yer tutar. Shams ve ark. (2005b) tarafından yapılan çalışmada, *Spalax*'lar ile normoksik koşullarda yaşayan *Rattus*'ların karaciğer ve böbrek eritropoietin ve HIF-1 α mRNA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Yetişkin *Spalax* bireylerinde her iki parametrede de *Rattus*'lara nazaran iki kat fazla HIF-1 α mRNA ekspresyonu tespit edilmiştir.

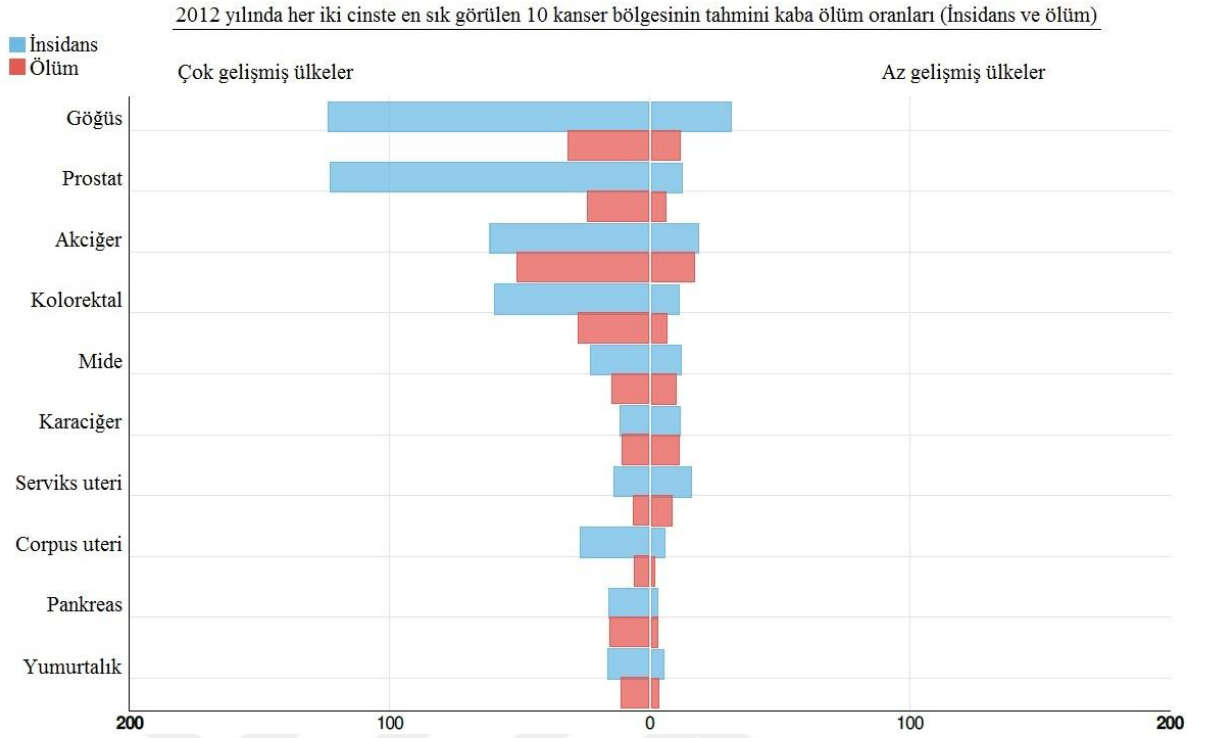
Birçok canlının hipoksiye maruz kalması ile dokularda hasarlar oluşmakta ve uzun süren şiddetli hipoksi şartları ölümle sonuçlanmaktadır (Northington ve ark. 2001, Vaupel ve Mayer 2007). Kör fareler ise hipoksiye karşı oldukça dirençli canlılardır. Hatta kör farelerin düşük oksijen basıncına karşı olan dirençleri, yüksek irtifa ve dalış yapan memelilerin düşük oksijen basıncına karşı sahip oldukları direnci oldukça aşmaktadır (Ar ve ark. 1977, Yahav ve ark. 1988).

2.3. Kanser ve Küresel Kanser Tehdidi

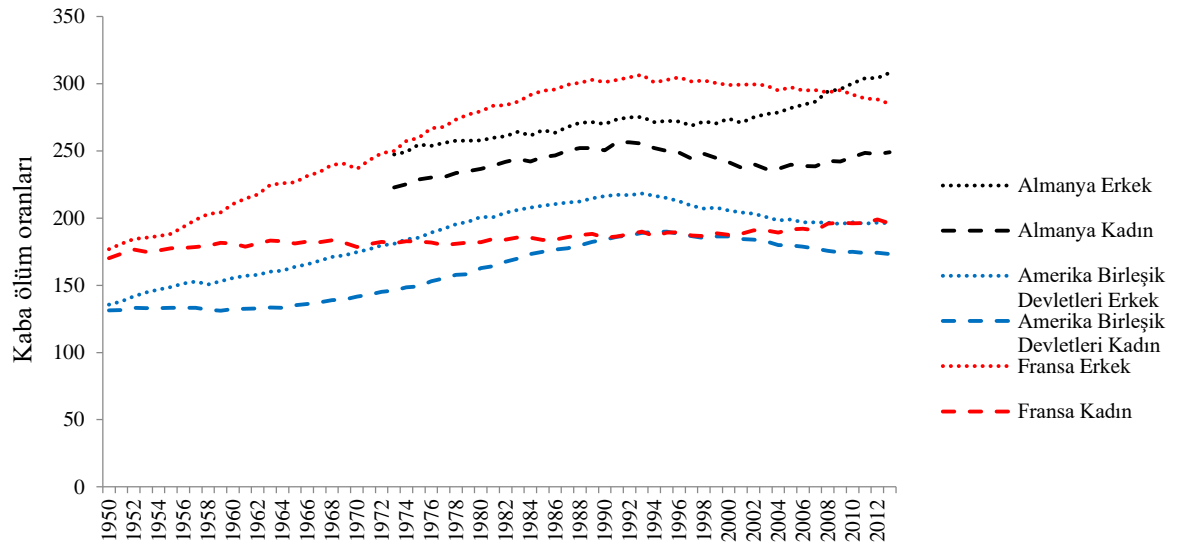
Çok hücreli canlılarda hücreler, fizyolojik sınırlar içerisinde kontrolsüz bir bölünme eğilimi göstermezler. Bölünme sinyali alan hücreler ilgili sinyal doğrultusunda bölünerek sayısını arttırırken, ölüm sinyallerini alan hücreler ise kontrollü bir şekilde kendilerini öldürürler. Fakat kanserleşmiş hücreler bu biyolojik hiyerarşiye uymayarak sayılarını arttırır (Kontrolsüz proliferasyon) ve dışarıdan gelen ölüm sinyallerine cevap vermezler. Bunun sonucunda çevre veya uzak dokulara yayılarak metabolik aksamalara sebep olurlar (Metastaz). Hücrelere bu kontrolsüz proliferasyon özelliğini kazandıran, hücre DNA'sında meydana gelebilecek mutasyonlardır. Hücrelere mutant özelliklerini kazandıran etmenler ise kabaca kimyasal, biyolojik ve fiziksel etkiler olarak sıralanabilir.

Çağımızda küresel bir gelişmeye paralel olarak ortaya çıkan yeni teknolojiler, bu gelişmelere bağlı olarak ortaya çıkan ihtiyaçlar ve yaşam şekilleri gibi birçok yeni kazanım aynı zamanda birtakım olumsuz çevresel etmeni de beraberinde getirmektedir. Bu çevresel etmenler bölgenin coğrafik, ekolojik ve teknolojik özelliklerine göre çok farklı özellikler gösterebilir ve canlılar üzerindeki etkileri göz ardı edilemeyecek derecede önemlidir.

Gelişmiş ülkelerde yaşayan insanların kanser sonucu ölüm oranları zamanla artmakla birlikte, aynı zamanda az gelişmiş ülkelerde yaşayan bireylere kıyasla fazladır. DSÖ (WHO-World Health Organization) verilerine göre hazırlanmış, çok gelişmiş ülkelerdeki bireylerin kansere yakalanma insidansları ve kaba ölüm oranları Şekil 4'te ve bazı çok gelişmiş ülkelerdeki 1952-2013 yılları arasındaki kanser kaynaklı kaba ölüm oranları şekil 5'te gösterilmiştir.

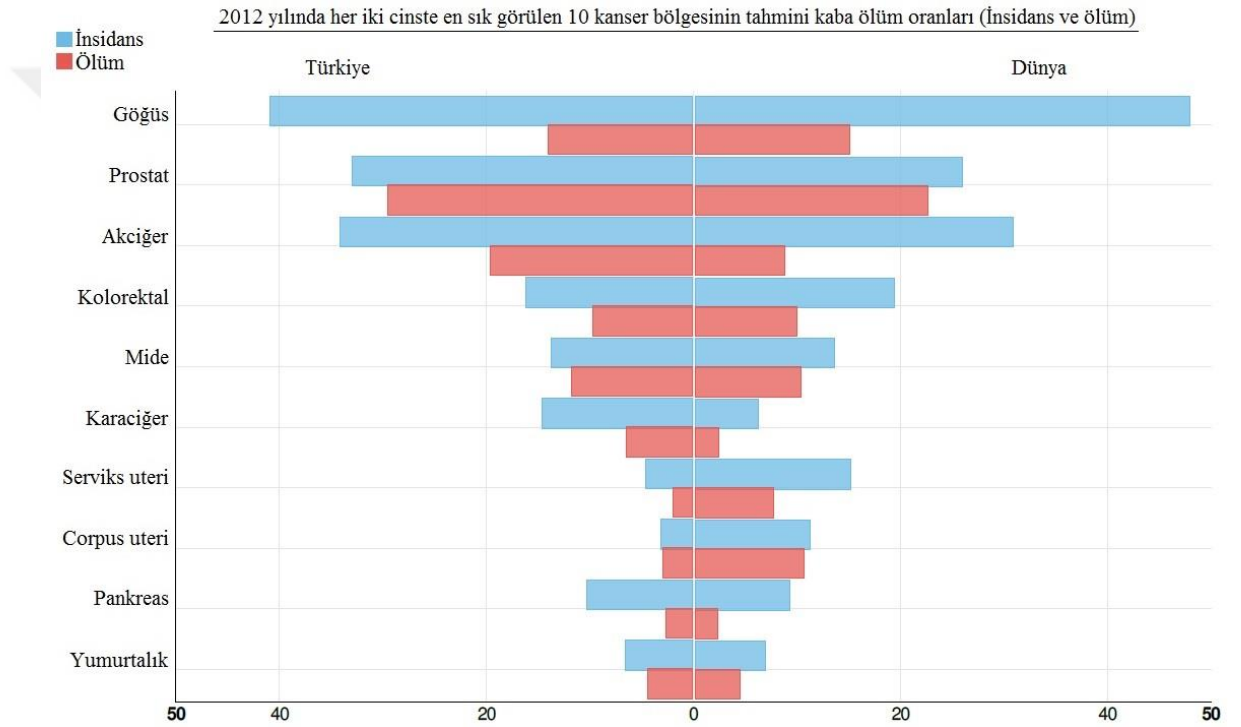


Şekil 4. WHO, International Agency for Cancer Research on Cancer, GLOBOCAN verilerine göre hazırlanmış, çok gelişmiş ülkeler ile az gelişmiş ülkelerdeki kanser insidansları ve kaba ölüm oranları (<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> Erişim tarihi: 10 Şubat 2017).



Şekil 5. WHO, International Agency for Cancer Research on Cancer, Global Cancer Observatory verilerine göre hazırlanmış, bazı gelişmiş devletlerin 1950-2013 yılları arasında kadın ve erkek cinsiyetlerine göre kanser kaynaklı kaba ölüm oranları (<http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm> Erişim tarihi: 23 Ocak 2017).

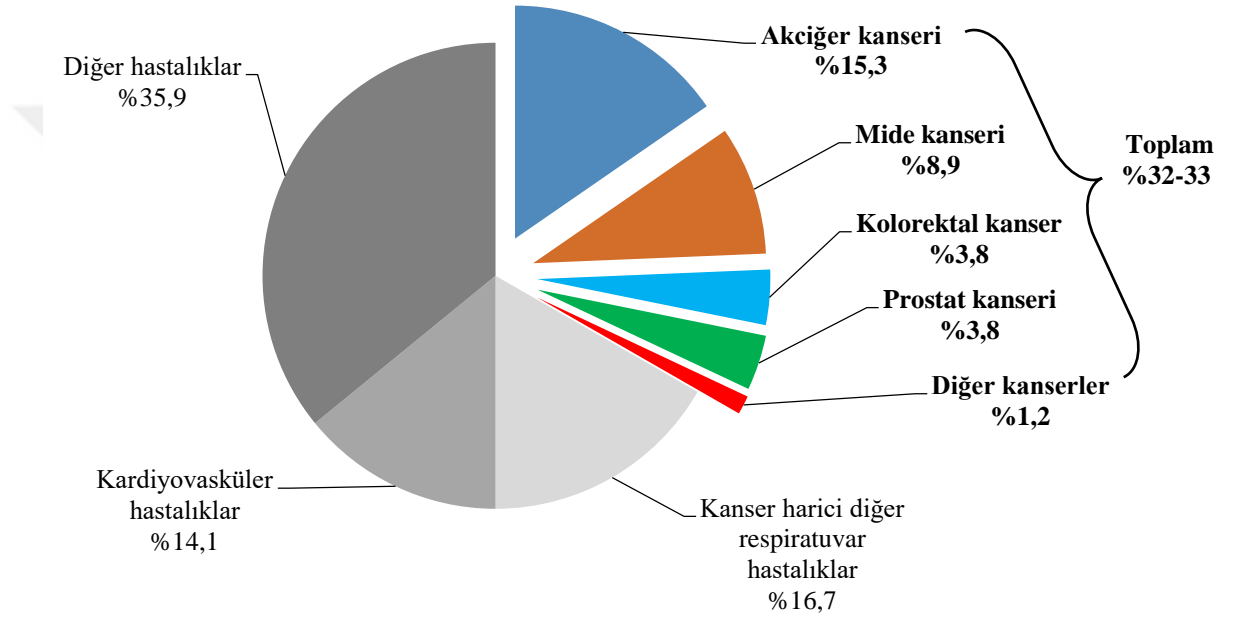
Türkiye’de yaşayan bireylerin sahip olduğu kanser insidansları ve kaba ölüm oranları da dünya ortalamasından pek farklı değildir. Şekil 6’da, Türkiye ile Dünya geneli kansere yakalanma insidansları ve kaba ölüm oranlarının bir karşılaştırması sunulmuştur. Ülkemizde toplam ölüm nedenleri sıralamasında %21’lik oranıyla kanser (Malign ve benign neoplazmlar) ikinci sırada yer almaktadır (TÜİK Basın Odası Haberleri 2016). Şekil 5 ve 6’da görüldüğü üzere, çok gelişmiş ülkelerde olduğu gibi Türkiye’de de göğüs, prostat, akciğer ve kolorektal kanser insidansları ve ölüm oranlarının yüksekliği dikkat çekicidir.



Şekil 6. WHO, International Agency for Cancer Research on Cancer, GLOBOCAN verilerine göre hazırlanmış, Türkiye ile Dünya geneli kanser insidansları ve kaba ölüm oranları (<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> Erişim tarihi: 16 Mayıs 2017).

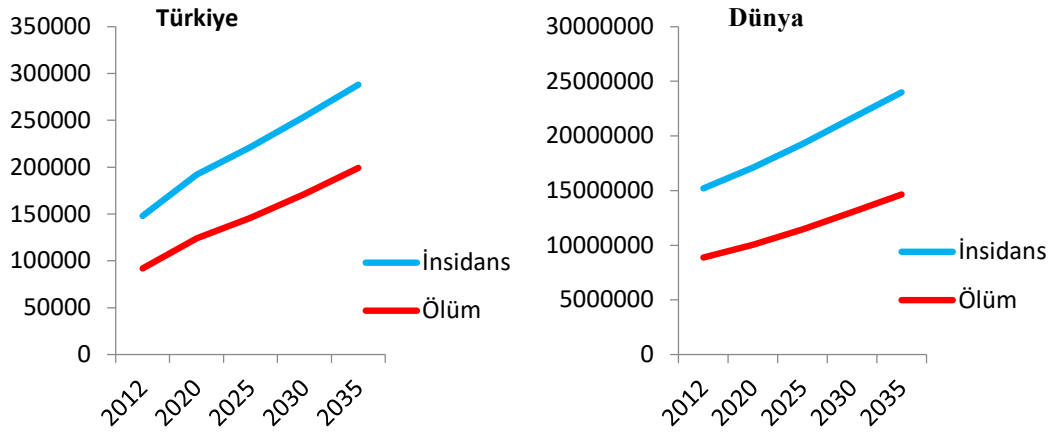
Çevresel etmenlerin kanser kaynaklı ölümler üzerindeki etkisini çarpıcı bir şekilde ortaya koyan örneklerden biri, ülkemizin en gelişmiş sanayi bölgelerinden olan Kocaeli Dilovası bölgesidir. Hamzaoğlu ve ark. (2011) tarafından Kocaeli Dilovası bölgesindeki ölüm nedenleri üzerine yapılan çalışmada, saptanan 505 ölümden 161’inin (%32-33) kanser kaynaklı olduğu bildirilmiştir. Şekil 7’de ilgili

çalışmada saptanan ölüm nedenleri ile kanser kaynaklı ölümlerin kanser türlerine göre dağılımları gösterilmiştir. Kocaeli Dilovası bölgesinde, akciğer kanserinden ölüm ortalaması 2,6 kat, prostat kanseri ölüm ortalaması 2,6 kat, ve mide kanseri ortalaması ise 2,3 kat dünya ortalamalarından fazladır (Hamzaoğlu ve ark. 2011). Ayrıca yine Hamzaoğlu ve ark. (2014) tarafından yapılan farklı bir çalışmada, annelerin kolostrumu ve yeni doğan bebeklerin dışkılarında DSÖ tarafından belirtilen düzeyden daha yüksek miktarda ağır metal tespit edilmiştir.



Şekil 7. Kocaeli Dilovası bölgesinde tespit edilen ölüm nedenleri ve kanserlerin bu ölüm nedenleri içerisindeki yüzdeleri (Hamzaoğlu ve ark. 2011).

Günümüzdeki kanser verileri demografik olarak değerlendirildiğinde, gelecek yıllarda kanser insidansı ve ölüm oranları hem Türkiye hem de dünya çapında artarak devam edeceği düşünülmektedir. GLOBOCAN verileri kapsamında, kanserin Türkiye ve Dünya genelindeki tahmini insidansı ve mortalitesinin 2035 yılına kadar olan değerleri şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8. WHO, International Agency for Cancer Research on Cancer, GLOBOCAN verilerine göre hazırlanmış, 2035 yılına kadar Türkiye ve Dünya’da beklenen kanser insidansları ve ölüm oranları (<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> Erişim tarihi: 12 Ekim 2017).

Bu veriler incelendiğinde önümüzdeki yıllarda kanserin, Türkiye ve Dünya genelinde en önemli sağlık sorunlarından biri olacağı açıktır. Kanser tedavileri açısından hali hazırda yaygın olarak kullanılabilen, etkili ve ucuz bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu yönüyle maliyeti az, yeni tedavi yöntemlerinin bulunması insanlık için elzemdir.

2.4. Kanser Oluşum Mekanizmaları

Kanserler çoğu zaman tek bir hücreden köken alırlar. Bu hücreyi diğerlerinden farklı kılan ise, farklı davranışsal özellikler göstermesidir. Sağlıklı bir insan vücudunda ortalama 75 trilyon hücre bulunduğu düşünülürse, arasından bazılarının birtakım etmenler sonucunda farklı davranış göstermesi olağan bile karşılanabilir. Peki hangi özellikler fizyolojik sınırlar içerisinde davranan bir hücreyi diğerlerinden farklılaştırarak, organizma için bir tehdit unsuru haline getirmektedir? Bu sorunun cevabı, ‘canlılık’ özelliğinin biyolojik olarak en temel açıklamasında saklıdır.

DNA, canlıların çalışma prensiplerini açıklayan organik bir kullanma kılavuzudur. İçerdiği çok sayıda nükleotidi, uygun enzimler ve aracı RNA’lar yardımıyla proteine dönüştürerek veya direkt RNA olarak kopyalayarak yaşamsal faaliyetleri sürdürür ve kontrol eder. Yani hücrelerin organizmanın yaşam normlarına

göre sahip olması gereken davranış sınırlarını belirleyen, DNA üzerindeki bilgilerdir. Bu yüzden hücre DNA'sındaki bilgilerin yanlış veya hatalı aktarımı sonucunda ilgili proteinin yapısı değişebilir, miktarı artabilir/azalabilir veya protein hiç oluşmayabilir. Kısacası kalıtsal bilginin etkilenmesi dolaylı olarak hücrenin davranışlarını da etkilemektedir.

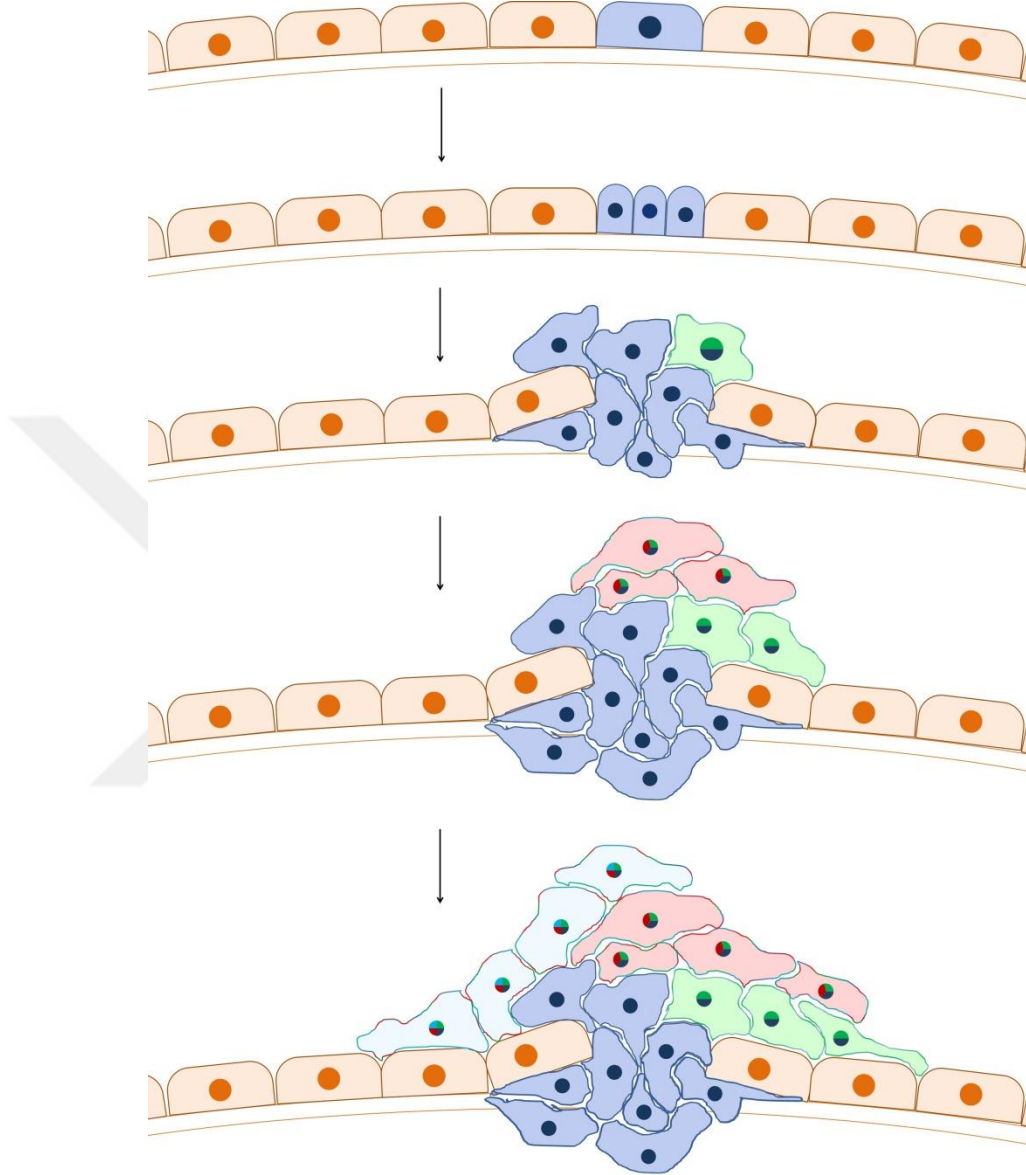
DNA farklı etkiler yoluyla hasar alabilmekte ve bu hasarlardan bazıları, DNA üzerindeki hasarları denetleyen proteinlerden kaçabilmektedir. Ayrıca DNA'nın hasar almasının dışında, üzerindeki bilginin düzgün bir şekilde aktarılıp istenilen proteine dönüşmesi için, çeşitli hücre içi koşulların da belirli sınırlar içinde tutulması gerekmektedir. Kısacası DNA üzerindeki bilginin düzgün bir şekilde aktarılabilmesini etkileyen iki ana faktör vardır; genetik faktörler ve epigenetik faktörler. Epigenetik faktörler kısaca, DNA üzerindeki değişimlerle ilişkili olmayarak kalıtsal olarak aktarılan, gen ifadeleri üzerindeki değişikliklerdir. Genetik ve epigenetik faktörler uygun koşullar altında, direkt veya dolaylı olarak, zamanla DNA üzerinde birtakım farklılıkların oluşmasını sağlayabilirler.

Kanserleşmiş hücrelerin genleri, fizyolojik sınırlarda hücre çoğalması ve doku homeostazını düzenleyen birtakım biyolojik yolu etkiler. Bu yollar hücre döngüsü, farklılaşma ve apoptozistir. Bu yolların her biri farklı ve benzersiz bir moleküler olay döngüsüne sahip olmakla birlikte, biyolojik olarak kesin sınırlarla ayrılmazlar (Corn ve El-Deiry 2002). Kendi olay döngüleri içerisinde yer alan moleküler karakterler, diğer döngüler içerisinde de rol üstlenebilir. Bunun bir sonucu olarak bu genler üzerinde meydana gelebilecek farklılıklar birden çok yolağa etki edebilir.

Kanserin oluşması için, hücrenin kalıtsal materyali üzerinde bir dizi mutasyonun birikmesi gerekmektedir (Şekil 9). Kanserli bir hücrenin davranışı izlendiğinde, 6 karakteristik özellik göze çarpmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000);

1. Kendi büyüme sinyallerini oluşturabilme
2. Büyüme engelleyici sinyallere duyarsızlık
3. Apoptozisi atlatabilme
4. Sınırsız bölünebilme potansiyeli

5. Devamlı anjiyogenez
6. Doku işgali ve metastaz



Şekil 9. Kanserli bir hücre hattında zamanla farklı mutasyonların birikmesi.
Her farklı renk hücre, farklı bir mutasyonu biriktiren hattı temsil etmektedir.

Bu özellikler, temelinde kanser dokusunun özgür bir şekilde hareket edebilmesini sağlamaktadır. Kanser hücrelerinin bu hareket özgürlüğünü kazanabilmeleri için biriktirmeleri gereken önemli mutasyonlar mevcuttur ve kanserli hücrelerin sahip oldukları bu mutasyonlar incelendiğinde, proto-onkogen olarak isimlendirilen genlerin büyük rol aldıkları görülmektedir. Mutasyon her ne kadar evrimin

dinamolarından biri olsa da, bir uyarlanma değil onarılamamış bir hasarın sonucu olduğundan (Futuyma 2008), kanser örneğinde olduğu gibi çoğunlukla canlıya zarar verir. Kanser olgularında 300 farklı genin benzer sıklıkta mutasyon geçirdiği, fakat bu mutasyonlardan 20-30 kadarının neredeyse tüm kanserlerde sıklıkla mutant olduğu bilinmektedir (DSÖ 2008).

2.4.1. Kanser Oluşumunda Proto-onkogenler ve Onkogenlerin Rolü

Canlılarda örgeleşme düzeyinin artması beraberinde, bu örgeleşimin ve doğurduğu hiyerarşinin korunması adına birtakım denetim faaliyetlerini de zorunlu kılar. Çok hücreli canlılarda herhangi bir hücre ya da hücre grubu, fizyolojik sınırlar içerisinde, gerekmediği müddetçe çoğalamaz, farklılaşamaz veya ortadan kaldırılması gerekiyorsa bundan kaçamaz. Bu üç kuralın herhangi birinin veya tamamının aşılması organizmada aksaklıklara sebep olarak canlının hayatta kalma şansını azaltır. Proto-onkogenler bu kilit noktalarda rol oynayan genlerdir. Bu genlerin kanser açısından önemi ise, üzerlerinde mutasyonların meydana gelmesi ile kontrolsüz hücre üremesinin bir şekilde önünü açmasında saklıdır. Proto-onkogenlerin mutasyona uğraması ile bu genler onkogen olarak isimlendirilirler. Önceleri yalnızca retrovirüsler tarafından oluşturulduğu düşünülen onkogenlerin, daha sonra retrovirüs aktivitesine ek olarak delesyonlar, translokasyonlar, nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları gibi birçok süreç içerisinde oluşabildiği anlaşılmıştır (Yokuş ve Çakır 2012). Onkogenler hücre davranışı üzerinde çok farklı etki gösterebilirler; örnek olarak bir hücrenin DNA hasarından kaçmasını sağlayabilir (Finlay ve ark. 1989), kendi kendine sürekli bölünme sinyalleri oluşturarak kontrolsüz proliferasyonu sağlayabilir (Tamm ve ark. 2006) ya da hacmi artan kanser dokusuna kan damarlarının ulaşmasını sağlayabilirler (Rak ve ark. 1995).

Hücresel süreçlerin çeşitli yerlerinde görev alan bazı proto-onkogenlerin görevleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Bazı proto-onkogenler ve fizyolojik sınırlar içerisindeki görevleri.

Proto-onkogen	Fizyolojik Görevi
<i>RAS</i>	Üç formu bulunan (Hras, Kras ve Nras) RAS gen ailesi, hücre büyümesi ve farklılaşmasında görevli olup 50'ye yakın gen ile ilişkilidir (Hesketh 1997a)
<i>MYC</i>	Embriyonal gelişimin tüm basamakları, yetişkin dokuların proliferasyonu ve apoptozisin uyarılmasında görev alır (Hesketh 1997b)
<i>MDM2</i>	Tumor Supressor p53 proteinin transkripsiyonu ve kontrolünde görevlidir (Zhao ve ark. 2014)
<i>Bcl-2</i>	Apoptozisin mitokondriyal yolunun düzenlenmesinde görevlidir (Chipuk ve ark. 2010)
<i>CDK4</i>	Hücre siklusunun devamlılığının düzenlenmesinde görev alır (Hesketh 1997c)

2.4.2. Tümör Supressör Genler

Tümör supressör genler işlevleri gereği hücre bölünmesi üzerinde engelleyici rol üstlenen genlerdir. Baskıladıkları aktivite bakımından bekçi (Gatekeeper) ve bakıcı (Caretaker) olarak iki tiptir. Bekçi tümör supressör genler doğrudan proliferasyonu baskımlarken bakıcı tümör supressör genler DNA üzerindeki mutasyonları tarayarak birikmesini önlerler (Çefle 2009). Farklılaşmış tümör supressör genler ise mutant karakterler taşıyan hücrelerin çoğalmasına izin vererek, ilgili mutant karakteri taşıyan kalabalık bir hücre hattının oluşmasını ve böylece bölünmesi kontrol edilemeyen bu hattın, farklı mutajenik etkilere karşı daha da duyarlı olmasını sağlaması açısından önemlidir. Bakıcı tümör supressör genlerde meydana gelecek mutasyonlar ise DNA'yı kararsızlaştırarak bekçi tümör supressör genlerin ve onkogenlerin birikimini hızlandırır. Bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülen Mutatör Fenotip (Mutator Phenotype) kavramı tam olarak bu etkileşimi ortaya koymaktadır. Mutatör Fenotip olarak ifade edilen hücrelerin, normal hücrelere kıyasla DNA üzerinde hasar biriktirme eğilimleri daha fazladır. Bu eğilim aynı zamanda ilgili hücre hattına karşı kullanılacak olan kemoterapik ilaçlara karşı dirençlilik geliştirmesi yönünden önemlidir. Bilinen bazı tümör supressör genler Tablo 5'te gösterilmiştir (Loeb ve ark. 2008).

Tablo 5. Bazı tümör supressör genler ve fizyolojik sınırlar içerisindeki görevleri.

Tümör Supressör	Fizyolojik Görevi
<i>p53</i>	Transkripsiyonel düzenleme, hücre arresti ve apoptoziste rol oynar
<i>Rb1</i>	Hücre döngüsünde transkripsiyonel düzenleme işlevi görür
<i>NF1</i>	RAS-GAP aktivitesi
<i>VHL</i>	Proteolizisin düzenlenmesi
<i>E-Cadherin</i>	Hücre adezyonunun düzenlenmesi
<i>BRCA1, BRCA2</i>	Transkripsiyonel düzenleme ve DNA tamiri

Tümör supressör genleri onkogenlerden ayıran önemli bir özellik, bu genlere bağlı kontrolsüz hücre büyümesinin, genetik olarak resesif olmasıdır. Knudson'nun (1971) retinablastomanın meydana gelmesinde Rb1 geninin her iki allelinin de mutasyona uğramış olması gerektiğini bulması, "İki Mutasyon Hipotezi" olarak bilinmektedir. Kısacası heterozigot retinoblastoma bölgesine sahip hücre normalden, bu heterozigotluğun kaybolması hastalığa neden olmaktadır. Bu yönüyle, tümör supressör genlerde meydana gelebilecek mutasyonlar yalnızca resesif alleller ile ifade edildikleri zaman mutajenik etki göstermeleri bakımından önemlidir. Ancak delesyonlar sonucu resesif allel tek başına da ifade edilebilir ve mutasyonu içeren bu allel, onkogenezi tek başına sağlayabilir (Yokuş ve Çakır 2012).

2.5. Anormal Hücre Çoğalmasının Önlenmesi: Apoptozis ve Oluşum Mekanizmaları

2.5.1. Apoptozisin Organizma İçin Önemi

Apoptozis, çok hücreli canlılarda, protistlerde (Deponte 2008) ve bitkilerde görülen (Havel ve Durzan 1996), nekrozdan farklı olarak, programlı bir biçimde gerçekleşen intihar mekanizmalarından biridir. Canlının kontrollü gelişimini, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi kurması ve istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması yönünden, birçok hastalık ve gelişim mekanizmasının kritik noktalarını tanımlamak adına önemi büyüktür (Kerr ve ark 1972). Metabolizma içerisinde yapım ve yıkım olaylarının dengelenmesi, canlının normal olarak gelişmesi ve potansiyel tehlikeli hücrelerin ortadan kaldırılması açısından önemlidir. Bu yapım ve yıkım arasındaki dengenin bozulması, yapılan sayısız çalışmada görüldüğü gibi, birçok

önemli hastalığın temelini oluşturmaktadır. Aynı zamanda apoptozis, embriyonik dönemden itibaren çok hücreli canlıların morfolojik organizasyonu üzerinde büyük roller üstlenir ve normal gelişimlerini sürdürebilmeleri, önceden belirlenmiş bazı hücrelerin programlı bir şekilde yok edilmesine bağlıdır. Apoptozisin anlaşılması için sıklıkla kullanılan model organizma olan 1mm uzunluğundaki *Caenorhabditis elegans*, başlangıçta 1090 olan toplam hücre sayısını, genetik miras sonucu apoptoz ile 131 hücre azaltıp ergin forma dönüşmektedir (Vaux ve ark. 1992). Omurgalılarda ise merkezi sinir sisteminin organizasyonun düzenlenmesi, göz lensinin orta kısmındaki hücrelerin belirli bir programa göre ölererek şeffaflığın sağlanması, menstruasyonda endometriyumun değiştirilmesi, etkisiz veya otoimmün reaksiyon veren T hücrelerin ortadan kaldırılması, kurbağaların metamorfoz evresinde kuyruklarını kaybetmesi, parmak oluşumunda aradaki dokunun ortadan kaldırılması gibi birçok sayısız işlev apoptozisin rol aldığı bazı olaylara örnek gösterilebilir (Coşkun ve Özgür 2011).

Apoptozisin, morfolojik örgeleşme süreçleri dışında, bir homeostatik düzenleme sistemi olarak işlev gördüğü birçok önemli görevi de bulunmaktadır. Fizyolojik veya patolojik birçok süreç apoptozisi tetikleyebilir. Apoptozis endeksinin arttığı fizyolojik süreçlerden biri de yaşlanmadır. Yaşlanma, genetik bir programın yanında, homeostatik eksikliklere vücudun adapte olamama durumudur (Koyutürk 2004). Yaşlanma ilerledikçe metabolizma içerisinde apoptotik defektlerin meydana geldiği bilinmektedir. Yaşlanma süreci içerisinde aynı zamanda hücrelerin biriktirdiği mutasyon sayısı da artmaktadır. Kısacası organizma, hiçbir karsinojenik etkene maruz kalmasa bile yaşlanma sürecinin sonunda kanserli hücreler üretebilir. Kanser araştırmalarının öncülerinden olan ve ilk insan onkogenini (RAS) keşfederek kanser araştırmalarında büyük bir atılım yaşatan Robert A. Weinberg'a göre ise, yeteri kadar yaşayan herkes mutlaka kansere yakalanacaktır (<http://www.nytimes.com/2010/12/28/health/28cancer.html> Erişim tarihi: 01 Ocak 2017).

2.5.2. Apoptozisin Oluşumu

Enflamatuvar cevap oluşumuna sebep olan nekrotik hücre ölümünden farklı olarak hücrelerin programlı bir şekilde ortadan kaldırılması, plazma membranının, içeriğini paketler halinde, kendilerini sindirecek olan makrofaj ya da komşu hücrelere sunulması ile ayırt edilir. Apoptozisin oluşması birçok farklı yolla tetiklenebilmektedir. Programlı hücre ölümleri genetik olarak belirlenmiş bir şekilde belirli hücrelerin ortadan kaldırılması ile ya da ilgili hücrenin dışarıdan uyarılması veya hücrenin kendi kendini tetiklemesiyle gerçekleşebilir. Apoptozisin genel ilerleme adımları ise şu şekildedir (Savitskaya ve Onishchenko 2015);

1. İndüklenme veya tetiklenme
2. Pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu
3. Hedef proteinlere saldıran kaspazların kaskadı
4. Organellerin bozulması ve yeniden organizasyonu
5. Hücrenin apoptotik baloncuklara bölünmesi
6. Fagositoz için apoptotik baloncukların hazırlanması

Bir hücre membranı elemanı olan sfingomiyelin, sfingolipid türevidir ve radyasyon, UV, ölüm reseptörleri etkisi, çeşitli kimyasallar ya da SPT (Serine-palmitoyl Transferase) enzimi sayesinde Seramid'e dönüşür. Seramid'in sfingomiyelinden şekillenmesi sonucu hücre içerisinde hücre arresti, hücre farklılaşması, yaşlanma ve apoptozisin uyarılması için bir tür ikinci haberci rolü üstlenmektedir. Oluşan seramid, Rb (Retinoblastoma), p21 ve CDK2 (Cyclin Dependent Kinase-2) aracılığı ile hücre arrestini sağlar. Ayrıca seramid pro-apoptotik özellik gösterdiğinden, araştırmacılar tarafından tümör supressör lipit olarak da adlandırılmaktadır (Taha ve ark. 2006). Hücrelerin farklılaşması ve büyümesi ile ilişkili olarak, büyüme faktörü hücrelerin yaşamlarını devam ettirebilmesi için gereklidir. Ekstraselüler ortamda hücreler için besin ve yapı maddesi yönünden bir sınırlama bulunmamaktadır. Fakat büyüme faktörünün yetersizliği majör glukoz taşıyıcısı olan GLUT1 (Glucose transporter 1), LDL (Low Density Lipoprotein) reseptörü, aminoasit taşıyıcıları ve demir alım reseptörlerinin yüzey ekspresyonlarını azaltıcı bir etki göstermektedir (Lum ve ark. 2005). Bu yönüyle hücrenin enerji üretim yeri olan ve birçok durumda apoptoziste kilit role

sahip mitokondri üzerinde oluşan stres, birtakım pro-apoptotik proteinlerin translokasyonunu sağlayarak apoptozise sebep olabilmektedir (Vander Heiden ve ark. 2001). Lenfositler ise programlı hücre ölümüne uğramamak için dışsal sinyalleri almalıdır (Rathmell ve ark. 2000). Makrofajlar da dahil olmak üzere lenfositler aynı zamanda tümör hücreleri başta olmak üzere, bazı hücre tipleri üzerinde litik etkisi olduğu anlaşılan hücrelerdir. Bu özelliklerinin en başta TNF adı verilen bir molekülle sağladıkları düşünülmüş fakat daha sonra, TNF'nin birçok reseptör ve ligandı içerisine alan bir aile olduğu anlaşılmıştır (Locksley ve ark. 2001). TNF ailesine ait ligandlar apoptozise neden olduğu bilinen ve çoğu kanser araştırmalarında sitotoksik etkilerinden dolayı sıklıkla üzerinde durulan moleküllerdir. Bu ligandlar hücre yüzeyinde ilgili reseptöre bağlanarak hücre içerisinde kaspaz olarak bilinen bir grup molekülü uyararak hücreyi apoptoza sürüklerler. Kaspazlar (Caspases – Cysteine Aparty-specific Proteases), programlı hücre ölümünde rol oynayan intraselüler inaktif zimojen proteazlardır. Fare ve insanlarda 14 farklı üyesi belirlenen kaspazların bazıları, biyokimyasal yapılarından kaynaklı olarak apoptoziste rol oynamazken bir kısmı görev alır ve bu kaspazlar aktivatör kaspazlar olarak ifade edilir. Başlatıcı kaspazlar (Initiator caspases) farklı aktivatörler ile aktifleşebilir ve birbirleri üzerinden ilerleyen bir kaskad oluştururlar. Bir kaspaz kaskadı, TNF ailesi reseptörler veya apoptotik mitokondri faaliyetleri sonucu oluşabilir (Reed 2000). Bazı apoptotik yollar kaspaz bağımlıyken bir diğer kısmı kaspaz bağımsız olarak apoptoza neden olabilmektedir (Savitskaya ve Onishchenko 2015).

Görüldüğü gibi hücrenin apoptotik indüksiyonu, hücre içi ve hücre dışı birçok yolla sağlanabilmektedir. Bundan dolayı apoptozisi indükleyici yollar içsel (Intrinsic) ve dışsal (Extrinsic) yollar olarak da ayrılabilir. Fakat bu yollar kesin ve net sınırlar ile ayrılamadıklarından, içsel yollar dışsal aktivatörleri birtakım koşullar altında etkileyebilmekte ve böylece daha karmaşık bir mekanizma tablosu şekillenmektedir (Yamaguchi ve Wang 2004, Beurel ve Jope 2006). Fakat yine de apoptozis için kilit rolü üstlenen bazı merkezler ve birtakım yollar vardır.

2.5.2.1. Mitokondrinin Apoptozisteki Yeri

Mitokondri neredeyse tüm ökaryotik canlıların sahip olduğu, besin moleküllerinin kimyasal bağlarından aldıkları enerjiyi ATP moleküllerine aktararak hücrenin iş yapabilme yeteneğini sağlayan organeldir (Karnkowska ve ark. 2016). Mitokondri morfolojik olarak dışta düz bir zara, iç kısmında ise matrikse uzanan ve krista olarak adlandırılan kıvrımlara sahip bir iç zara sahiptir (Widmaier ve ark. 2014b). Bu sayede dış membran, ara membran alanı, iç membran ve matriks olmak üzere dört farklı bölgeye ayrılmaktadır. Mitokondri enerji üretimi sorumluluğu dışında hücre bölünmesi, sinyalizasyon ve apoptozis gibi birçok önemli metabolik aktivitenin gerçekleştirilmesinde de önemli rol oynar (McBride ve ark. 2006). Mitokondrinin apoptozisteki rolünün önemli olmasının sebebi ise kendi içerisinde birçok pro-apoptotik ve anti-apoptotik öğeleri içermesinden kaynaklıdır. Bazı hücrelerde (Tip-I Hücreler) apoptozisin oluşması için mitokondri bir zorunluluk olmasa da, bir diğer hücre tipleri için (Tip-II Hücreler) gereklidir (Westphal ve ark. 2011).

Hücreye apoptotik ölüm sinyallerinin gelmesi veya hücrenin herhangi bir aksiyon sonucu kendini programlı ölüme sürüklemesi, mitokondri üzerinden gerçekleşen birtakım olaylara sebebiyet verebilmektedir. Erken apoptozis sürecinde mitokondride gerçekleşen değişimler ve aktiviteler gözlemlendiğinde ETS (Elektron Taşıma Sistemi) aksamalarına bağlı olarak oksidatif fosforilasyon ve ATP üretiminde bozulmalar görülmektedir. ETS elemanlarından olan sitokrom-c, çeşitli apoptotik indüksiyonlarda etkilenen belirli yapılardan biridir ve bu etki sonucunda, ETS'nin aksaması ile ATP üretiminde yaşanan aksaklıklar daha da anlaşılır olmaktadır (Green ve Reed 1998). Sitokrom-c'nin apoptozis için önemi, mitokondriden salınıp sitoplazmaya geçmesinin ardından sitoplazmada inaktif halde bulunan Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) (Zou ve ark. 1997) ve kaspaz-9 ile birleşerek, prokaspaz-3'ü kaspaz-3'e çeviren apoptozom ünitelerinin oluşumunu tetiklemesidir (Zou ve ark. 1999). Kaspaz-9 apoptozom oluşumuna katılmadan önce aktif değildir (Prokaspaz-9), aktivasyonu sonunda kaspaz-9 apoptozomdan ayrılarak efektör kaspazlar olan kaspaz-3, 6 ve 7'yi aktive eder. Kaspaz-3'ün aktivasyonu, DNA fragmentasyonuna neden olan CAD'ı (Caspase-activated Deoxyribonuclese)

bağlayarak fragmentasyonu engelleyen ICAD'ın (Inhibitor of Caspase-activated Deoxyribonuclese) kırılmasını ve böylece CAD'ın çekirdeğe göçünü sağlar (Nagata 2000). Sitokrom-c'nin mitokondriden salınması ise Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) ailesi proteinlerin denetimi altındadır. Bcl-2 ailesi, anti-apoptotik (Veya Pro-survival) (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W ve A1) ve pro-apoptotik (Bax, Bak ve Bok) üyelere sahiptir. Anti-apoptotik üyelerin dışındaki üyeler Bax (Bcl-2-associated X Protein) grubu üyeleri (Bim, Bad, Bid, Bik, Bmf, Puma, Noxa ve Hrk) Bcl-2 homoloğu olduklarından ve ortak olarak BH3 interaksiyon bölgesine sahip olduklarından BH3-only olarak da bilinirler (Willis ve Adams 2005). Pro-apoptotik üyeler olan Bax ve Bak (Bcl-2 Antagonist Killer Protein), mitokondri permabilitesi üzerinde membran porlarını düzenleyici etkileri sayesinde geçirgenliğin artmasını ve böylece apoptozisin oluşmasına yardımcı olduklarından dolayı düzenleyici işlev görürler. VDAC (Voltage-dependent Anion Channel) voltaj duyarlı kapılardır ve mitokondrinin dış membranında bulunurlar. VDAC1, VDAC 2 ve VDAC3 olmak üzere üç farklı formda bulunan kanallar, Bax ve Bak ile farklı etkileşim eğilimlerine sahiptirler. Bax ve Bad'ın bu kanallar ile olan etkileşimleri sonucunda mitokondri permabilitesi değişmektedir (Keinan ve ark. 2010). Bu iki üye mitokondri dışında ER'da (Endoplazmik Retikulum) da tanımlanmıştır, fakat buradaki fizyolojik görevleri tam olarak açık değildir (Westphal ve ark. 2011). Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri ise sitokrom-c'nin translokasyonu (Sitoplazmaya) üzerinde engelleyicidir (Kluck ve ark. 1997). Buna bağlı olarak, aynı zamanda Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu hücrenin apoptoza uğramasını engellediğinden (Yang ve ark. 1997) bir proto-onkogen olarak değerlendirilmektedir (Scorrano 2009).

Mitokondriye etki eden çeşitli apoptotik uyarılar ara membran alanından Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis-binding Protein with Low pI), OMI/HtrA2 (High-temperature Requirement A2), AIF (Apoptosis-inducing Factor) ve Endonükleaz G'nin translokasyonunu tetiklemiş olurlar (Cregan ve ark. 2004). Smac/DIABLO ve OMI/HtrA2 sitoplazmaya geçtiklerinde kaspaz-9'u tutan IAP grubu proteinleri (cIAP-1, cIAP-2 ve XIAP) bağlayarak kaspaz kaskadını indüklerler (Savitskaya ve Onishchenko 2015). Bu yüzden IAP ailesi proteinlerin artışı apoptozisin oluşmasını engellemektedir (Park ve ark. 2002). AIF ve Endonükleaz G'nin sitoplazmaya

geçmesi ise kaspaz bağımsız DNA fragmentasyonuna sebep olmaktadır (Savitskaya ve Onishchenko 2015).

2.5.2.2. Endoplazmik Retikulum ve Apoptozis

Ökaryotik canlılarda bulunan, granüllü veya granülsüz yapıda bulunabilen ER hücre içerisinde sentezlenmiş protein paketlerini ve katlanmalarını yapan, bazı lipit özellikli molekülleri sentezleyen, birtakım hidrofob molekülleri detoksifiye eden ve birçok hücre içi aktivitede rol oynayan Ca^{++} iyonunun homeostazisini sağlayan organeldir (Widmaier ve ark. 2014a). Hipoksi, besin maddesi miktarı, değişmiş Ca^{++} iyonu miktarı, artan protein katlama trafiği ve yanlış katlanmış veya katlanmamış protein yapılarının ortamda birikmesine sebep olan patojen veya yangısal uyaranlar ER stresi olarak bilinen bir durum yaratır. Hatalı katlanmış proteinler BIP (Immunoglobulin Heavy-Chain Binding Protein) olarak bilinen şaperona tutunur ve ardından serbest BIP seviyesi düştükçe BIP ve diğer şaperonlarını kodlayan farklı genlerin transkripsiyonu artar (Wang ve Kaufman 2014). Bu kontrol mekanizması UPR (Unfolded Protein Response) olarak bilinir ve ER membranında, şaperonlarla bağlanan, katlanmamış ya da yanlış katlanmış proteinlere duyarlı sensörler bulunur. Bu sensörler ER lümeninde yer alan IRE1 (Inositol-requiring Enzyme 1) ve PERK'tir (Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase) (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo 2015). UPR aktivasyonunun artması sonucunda protein sentezinin bir süreliğine baskılanması ve otofaji gibi birtakım önlemler tetiklenir. Bu önlemlerin yeterli olmadığı durumlarda ise (Uzamış UPR aktivasyonu) hücre apoptoza sürüklenerek programlı bir şekilde ortadan kaldırılır. Onkogenik hiperaktivasyon ya da tümör supressör genlerdeki fonksiyon kaybına bağlı olarak oluşan yüksek protein katlama aktivitesi gibi nedenlerden dolayı, birçok kanser tipinde artmış UPR aktivasyonu görülmektedir (Wang ve Kaufman 2014). UPR cevabında yer alan sensörlerden PERK, eIF2 α 'yı (Eukaryotic Translation-Initiation Factor α) fosforilleyerek birçok proteinin sentezini baskılar. Fakat bu yol aynı zamanda CHOP'u (C/EBP Homologous Protein) aktive eden ATF4'ün (Activating Transcription Factor 4) translasyonunu arttırarak TNF) ailesi ligand etkileşimli reseptörlerden olan DR5'in, upregülasyonunu da sağlamaktadır (Yamaguchi ve Wang 2004).

Proteinlerin kontrolü dışında ER'nin en önemli görevlerinden bir diğeri hücre içi Ca^{++} homeostazisini sağlamaktır. Hücrede meydana gelen birçok fizyolojik süreç için Ca^{++} anahtar aktivatör ve düzenleyici iyonudur. Bu sebeple, Ca^{++} derişiminde meydana gelebilecek farklılıklar hücrede düzensizliklere sebep olur. Sitozoldeki Ca^{++} iyonları, ER membranında bulunan SERCA (Sarco/endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) pompası aracılığı ile ER içerisine taşınır. Ca^{++} yoğunluğunu düzenleyen SARCA mRNA'sı, bazı kanser tiplerinde fazla ifade edilmekte ve hücrede düzensiz Ca^{++} sinyalizasyonu görülmektedir (Seo ve ark. 2016). Kanser hücrelerinde SARCA mRNA'sının artan ifadesi, hücrelerin apoptozisten kaçabilmelerinin bir yolu olarak da düşünülebilir çünkü sitozolde artan Ca^{++} yoğunluğu, apoptotik süreçlerde kilit rol oynayan mitokondrinin normal koşullar altında içerdiği düşük yoğunluklu Ca^{++} yoğunluğunu da beraberinde yükselterek, birtakım apoptojenlerin sitoplazmaya geçmesini sağlar (Orrenius ve ark. 2003).

2.5.2.3. p53 ve DNA Hasarına Bağlı Apoptozis

p53 insanlarda 17. kromozomun kısa kolu üzerinde TP53 geni tarafından kodlanan ve DNA kararlılığının sağlanmasında katkıda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür (Varley ve ark. 1997). İnaktivasyonundan hiperaktivasyonuna kadar kanser, karaciğer hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çok geniş bir hastalık yelpazesiyile ilişkili olması (Fridman ve Lowe 2003, Amaral ve ark. 2010), alanında çalışan birçok araştırmacı tarafından üzerinde çokça durulmasına neden olmuştur (Koçak ve ark. 2011). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın veri tabanına göre, hemen her tür insan kanserinde 24000 civarı TP53 mutasyonu tanımlanmıştır (DSÖ 2008).

Yapısal olarak benzer fakat farklı stres koşulları altında ayrıca indüklenebilen p63 ve p73'ü de içeren gen ailesinin üyesi olan p53 proteini (Avivi ve ark. 2005a), transkripsiyonel aktivasyon bölgesi olan N-ucu, heterodimerizasyonun sağlandığı C-ucu (Oligomerizasyon) ve çoğu onkogenik mutasyonların meydana geldiği merkez kısmı olarak üç bölgeye ayrılmaktadır (Prives ve Manfredi 1993). DNA'nın kararlılığının sağlanması, hasara uğrayan DNA bölgelerinin tamir edilmesi ve hücrenin programlı hücre ölümüne sürüklenmesinde rol almasının yanı sıra birçok

kanserde mutasyona uğraması ve sonucunda kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasına karşı bir direnç faktörü rolü üstlenmesinden dolayı, kanser araştırmalarında üzerinde sıklıkla durulmaktadır (Avivi ve ark. 2005a). Bu özelliği ile p53 günümüzde kullanılan yaygın kanser tedavi yöntemlerinin kilit rolünü üstlenmektedir (Levine 1997). Hücre bölünmesi ile ortaya çıkabilecek hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin, kontrolsüz olarak üremelerinin önündeki en etkili tespit mekanizmalarından biri olan p53'ün mutasyona uğrayarak hata denetiminin ortadan kalkması ciddi bir sorundur ve birçok ileri evre insan kanser hücresinde p53'ün mutasyona uğradığı bildirilmiştir (Greenblatt 1994).

Bir transkripsiyon faktörü olan p53, hücre siklusunda denetim yaparak gerekli durumlarda hücrenin bölünmesini engeller ve DNA tamiri için zaman kazandırır. Fizyolojik sınırlar içerisinde belirli bir hızla üretilip yine belirli bir hızla ortadan kaldırılan p53 proteinin yarılanma ömrü yaklaşık 20 dakikadır ve bu yarılanma süresi, N-ucuna bağlanarak p53'ün negatif düzenlenmesinde görevli Mdm2/Hdm2 (Murine/Human Double Minute-2) aracılığıyla sağlanır. Mdm2, p53 N-ucunun fosforillenmesini sağlar (Koçak ve ark. 2011). Ubikuitinleme olarak bilinen bu işaretleme p53 proteininin proteazomlara yönlendirilmesine ve böylece parçalanmasına neden olarak p53 aktivasyonunu önler. DNA hasarı ve hücrel stres durumlarında ise Chk2 (Checkpoint kinase-2), ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein), ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ve p14 gibi proteinlerin aktivasyonları Mdm2'yi tutarak fosforillenmeyi önler ve p53'ün aktivasyonuna sebep olur (Gasco ve ark. 2002). p53'ün aktivasyonu sonucunda ise hücre arresti dolaylı yoldan sağlanır. Arrestin sağlanması, DNA üzerinde meydana gelmiş hasarların belirlenmesi, eğer mümkünse düzeltilmesi, onarılamıyorsa hücrenin apoptoza uğratılarak hasarlı DNA'nın kontrolsüz çoğalmasının önlenmesi amacıyla yürütölmektedir.

Mutant olmayan p53 (Wild Type p53) hücreyi hücre döngüsünün kontrol noktalarından olan (Checkpoint) G₁ kontrol noktasında tutarak, hücrenin S evresine geçmesini engellemekte ve bu sayede DNA'sı hasarlı hücreyi G₁/G₀ evresinde tutmaktadır (Levine 1997). p53 bu işlevini, G₁/G₀ evresinde rol alan CDK'ların (Cyclin Dependent Kinases) işlevini engelleyen p21'in transkripsiyonunu

indükleyerek gerçekleştirmektedir (Harris 1996). Ek olarak, yapılan çalışmalar p21 eksik fibroblastların malignant oluşum sergilemeden normal gelişim göstermelerinin yanı sıra, bu hücrelerin DNA hasarına maruz kalması ile G₁ arrestini sağlamada yetersiz kaldıklarını, fakat p21'in p53 aracılı apoptozun sağlanmasında bir zorunluluk olmadığını göstermektedir (Deng ve ark. 1995, Attardi ve ark. 1996). p53 G₁ fazından başka, hücreyi G₂ fazında meydana gelen sorunlar sonucunda G₂ kontrol noktasında da tutabilir. Fakat buradaki arrest, p53'ün E2F'ye bağlanarak, mitoz için gerekli olan c-myc ve c-fos gibi proto-onkogenlerin transkripsiyonunu engelleyerek sağlanmaktadır (Gabriel 2007). p53'ün düzenleyebildiği pro-apoptotik proteinler ise Bax, Apaf-1, Puma (p53-upregulated Modulator of Apoptosis), p53AIP1 (p53-regulated Apoptosis Inducing Protein 1), Pidd (p53-induced Protein with Death Domain) ve Noxa'dır (Gasco ve ark. 2002).

Kör fareler p53'ün evrimleşmiş bir formuna sahiptirler. Ashur-Fabian ve ark. (2004) tarafından insan p53 geni (hP53) ile kör farelerinki (sP53) karşılaştırılmış ve kör farelerde, insan p53 geninin 174. pozisyonuna karşılık gelen kısmın Arjinin aminoasidi yerine Lizin aminoasidini içerdiği gösterilmiştir. Bu bölge birçok insan kanserinde görülen p53 gen hasarında sıklıkla mutasyona uğrayan bölgedir (Gorbunova ve ark. 2012). Kör farelerde farklılaşmış bu ünite (Arg174Lys) aynı zamanda p53'ün, apoptozis transkripsiyon genlerinden olan Apaf-1, PTEN, Puma ve Noxa üzerindeki etkinliğini de azalttığı bilinmektedir (Avivi ve ark. 2007). Sahip oldukları bu eşsiz farklılık kör fareleri kanser karşısında oldukça avantajlı bir duruma getirdiği söylenebilir.

2.5.2.4. TNF Üstfamilyası ve Ligand-Reseptör Etkileşimli Apoptozis

1968 yılında lenfositlerin ürettiği bir ürün olan ve Lenfotoksin'in sitotoksik etkilerinin olduğu keşfedilmiştir (Williams ve Granger 1968). Bu keşfin ardından, 1975 yılında daha çok makrofajlarca üretilen ve TNF olarak adlandırılan farklı bir ajanın da sitotoksik etkilerinin olduğu ortaya çıkartılmıştır (Carswell ve ark. 1975). Benzer sitotoksik özellikleri olan ve daha sonra moleküler yapılarının da benzer olduğu anlaşılan (Aggarwal ve ark. 1985) bu iki madde, sırasıyla TNF α ve TNF β olarak isimlendirilmiştir. Günümüzde bu iki maddenin keşfedilen diğer reseptörleri

TNF Receptor Superfamily (TNFRSF) (Tablo 6), ligandlar ise TNF Superfamily (TNFSF) (Tablo 7) olarak sınıflandırılmaktadır.

Tablo 6. TNF Receptor Superfamily (TNFRSF)

(<http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/782> Erişim tarihi: 18 Temmuz 2017).

Kısaltma	Ad	Diğer Adlandırmalar	Kromozom
EDAR	Ectodysplasin A receptor	ED5, EDA3, Edar, ED1R, EDA1R	2q13
TNFRSF1A	TNF receptor superfamily member 1A	TNF-R, TNFAR, TNFR60, TNF-R-I, CD120a, TNF-R55	12p13.31
TNFRSF1B	TNF receptor superfamily member 1B	TNFBR, TNFR80, TNF-R75, TNF-R-II, p75, CD120b	1p36.22
LTBR	Lymphotoxin beta receptor	TNF-R-III, TNFCR, TNFRSF3, TNFR2-RP, TNFR-RP	12p13
TNFRSF4	TNF receptor superfamily member 4	ACT35, OX40, CD134	1p36.33
CD40	CD40 molecule	p50, Bp50	20q13.12
FAS	Fas cell surface death receptor	CD95, APO-1	10q23.31
TNFRSF6B	TNF receptor superfamily member 6b	DcR3, DCR3, TR6, M68	20q13.33
CD27	CD27 molecule	S152, Tp55	12p13.31
TNFRSF8	TNF receptor superfamily member 8	KI-1	1p36.22
TNFRSF9	TNF receptor superfamily member 9	CD137, 4-1BB	1p36.23
TNFRSF10A	TNF receptor superfamily member 10a	DR4, Apo2, TRAILR-1, CD261	8p21.3
TNFRSF10B	TNF receptor superfamily member 10b	DR5, KILLER, TRICK2A, TRAIL-R2, TRICKB, CD262	8p21.3
TNFRSF10C	TNF receptor superfamily member 10c	DcR1, TRAILR3, LIT, TRID, CD263	8p21.3
TNFRSF10D	TNF receptor superfamily member 10d	DcR2, TRUNDD, TRAILR4, CD264	8p21.3
TNFRSF11A	TNF receptor superfamily member 11a	RANK, CD265, FEO	18q21.33
TNFRSF11B	TNF receptor superfamily member 11b	OCIF, TR1, OPG	8q24.12
TNFRSF12A	TNF receptor superfamily member 12A	FN14, TweakR, CD266	16p13.3
TNFRSF13B	TNF receptor superfamily member 13B	TACI, CD267, IGAD2	17p11.2
TNFRSF13C	TNF receptor superfamily member 13C	BAFFR, CD268	22q13.2
TNFRSF14	TNF receptor superfamily member 14	HVEM, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA, CD270	1p36.32
NGFR	Nerve growth factor receptor	TNFRSF16, p75NTR, CD271	17q21.33
TNFRSF17	TNF receptor superfamily member 17	BCM, CD269, TNFRSF13A	16p13.13
TNFRSF18	TNF receptor superfamily member 18	AITR, GITR, CD357	1p36.33
TNFRSF19	TNF receptor superfamily member 19	TAJ-alpha, TROY, TAJ, TRADE	13q12.12
RELT	RELT, TNF receptor	FLJ14993	11q13.2
TNFRSF21	TNF receptor superfamily member 21	DR6, CD358	6p12.3
TNFRSF25	TNF receptor superfamily member 25	DR3, TRAMP, WSL-1, LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3	1p36.31
EDA2R	Ectodysplasin A2 receptor	XEDAR, EDAA2R, EDA-A2R, TNFRSF27	Xq12

İlk keşfinden sonra sitotoksik etkilerinin kanserli hücreler üzerine etkili olduğu anlaşılan TNF ailesi ligandların, zamanla çok daha farklı etkilerinin olduğu anlaşılmıştır (Tablo 8). Bu etkiler arasında kemik homeostazisi, sağkalım, farklılaşma ve enflamasyon gibi birçok fizyolojik süreç yer alsa da, çeşitli araştırmacılar tarafından en çok araştırılan etkileri apoptozis olmuştur (Tablo 8) (Gaur ve Aggarwal 2003). Kanser hücreleri kontrolsüz üreyen topluluklar olmasına rağmen, normal hücrelerden çok daha fazla apoptoza uğrarlar. Bu özelliklerinden dolayı kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olan maddeler, sıklıkla klinik

çalışmalarda kullanılmaktadır (Pennarun ve ark. 2010). Bundan dolayı, apoptozisin TNF araştırmalarının neredeyse dinamosu sayılabilecek olmasının sebebi, elbette ki kanser araştırmalarıdır.

Tablo 7. TNF Superfamily (TNFSF)

(<http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/781> Erişim tarihi: 08 Aralık 2017).

Kısaltma	Ad	Diğer Adlandırmalar	Kromozom
TNF	Tumor necrosis factor	TNFSF2, DIF, TNF-alpha	6p21.33
LTA	Lymphotoxin alpha	LT, TNFSF1	6p21.33
LTB	Lymphotoxin beta	TNFSF3, p33	6p21.33
TNFSF4	TNF superfamily member 4	OX-40L, gp34, CD252	1q25.1
CD40LG	CD40 ligand	CD40L, TRAP, gp39, hCD40L, CD154	Xq26.3
FASLG	Fas ligand	FasL, CD178	1q24.3
CD70	CD70 molecule	CD27L	19p13.3
TNFSF8	TNF superfamily member 8	CD153	9q32-q33.1
TNFSF9	TNF superfamily member 9	4-1BB-L	19p13.3
TNFSF10	TNF superfamily member 10	TRAIL, Apo-2L, TL2, CD253	3q26
TNFSF11	TNF superfamily member 11	TRANCE, RANKL, OPGL, ODF, CD254	13q14
TNFSF12	TNF superfamily member 12	TWEAK, DR3LG, APO3L	17p13.1
TNFSF13	TNF superfamily member 13	APRIL, CD256	17p13.1
TNFSF13B	TNF superfamily member 13b	BAFF, THANK, BLYS, TALL-1, TALL1, CD257	13q33.3
TNFSF14	TNF superfamily member 14	LIGHT, LTg, HVEM-L, CD258	19p13.3
TNFSF15	TNF superfamily member 15	TL1, VEGI, TL1A, VEGI192A, MGC129934, MGC129935	9q32
TNFSF18	TNF superfamily member 18	AITRL, TL6, hGITRL	1q25.1
EDA	Ectodysplasin A	EDA1, XLHED, HED, XHED, ED1-A1, ED1-A2, EDA-A1, EDA-A2	Xq13.1

İşlevsel TNF reseptörleri (Apoptozise neden olan) hücre membranı üzerinde bulunurlar ve hücre içi kısımlarında, reseptör-ligand kompleksinin bağlanması ile gerçekleşen konformasyon değişimini hücre içine ileten, ölüm bölgesi (Death Domain – DD) olarak isimlendirilen yapıyı ihtiva ederler. Fakat tüm TNF reseptörleri DD bölgelerine sahip değildir. DD'den yoksun bu reseptörler (Yem Reseptörler - Decoy Receptors) hücre membranına gelen ligandları bağlayarak ligand yoğunluğunu azaltmaktadırlar (Pan ve ark. 1997, Sheridan ve ark 1997). Dahası, tümörlerde artan malignansiye bağlı olarak, yem reseptör ekspresyonun arttığına (Roth ve ark. 2001, Lin ve Hsieh 2011) ve bu işlevsiz reseptörlerin birtakım yollar sayesinde apoptozise aracılık ettiğine dair deliller vardır (Haridas ve ark. 1998).

Tablo 8. TNF ligand ve reseptör etkileşimleri ile proliferasyon ve apoptozis etkileşimleri (Gaur ve Aggarwal 2003).

(?) *TNF ailesi dışı veya bilinmeyen ligandlar ile etkileşen reseptörlerdir (Park ve ark. 2005, Polek ve ark. 2006, Walczak 2013).*

Ligand	Reseptör	Apoptozis	Proliferasyon	NF- κ B	JNK	p42MAPK	p38MAPK
TNF- α	TNFR1, R2	+	+	+	+	+	+
LT α	TNFR1, R2	+	+	+	+	+	+
FasL	Fas	+	-	+	+	-	-
VEGI	DR3	+	-	+	-	-	-
TRAIL	DR4, DR5	+	-	+	+	-	-
LT β	LT- β R	+	+	+	-	-	-
CD27L	CD27	+	+	+	+	+	-
CD30L	CD30	+	+	+	+	-	-
4-1BBL	4-1BB	+	-	+	+	-	-
TWEAK	Fn-14	+	+	+	+	-	-
LIGHT	LT- β R, HVEM	+	+	+	-	-	-
CD40L	CD40	-	+	+	+	-	-
OX40L	OX-40	-	+	+	-	-	-
RANKL	RANK	-	+	+	+	+	+
APRIL	TACI	-	+	+	+	-	-
BAFF	TACI, BCMA	-	+	+	+	-	-
GITRL	GITR	-	+	+	-	-	-
EDA-A1	EDAR	+	-	+	+	-	-
EDA-A2	XEDAR	-	-	+	-	-	-
?	TROY	-	+	+	-	-	-
?	DR6	-	-	+	+	-	-
?	RELT	?	+	+	?	?	?

DD içeren reseptörlerden olan CD95, DR4, DR5, TNFR1, DR3 ve TNFR2’de işe ayrıca reseptörün sitoplazma kısmında DD’lerden sonra yer alan adaptör proteinler karışır. CD95, DR4, ve DR5 reseptörlerine ilgili ligandların bağlanması sonucu DD’den sonra FADD (Fas-associated Death Domain) adaptör protein yolu üzerinden kaspaz-8 aktivasyonu sağlanarak kaspaz kaskadı başlatılmış olur. TNFR1 DR3 ve DR6 ise ligand bağlanmasının ardından TRADD (TNFR-associated Death Domain) adaptör proteini ile etkileşim kurmakta ve bunun sonunda TRAF2 (TNFR-associated Factor-2) veya FADD üzerinden sinyal yolu oluşabilmektedir. DR6 ayrıca GRB2 (Growth Factor Receptor-bound Protein-2) adaptör proteini ile de etkileşim kurabilmektedir. DD’ye sahip diğer reseptörler (EDAR ve NGFR) ise TRAF6 adaptör proteini vasıtasıyla sinyalizasyonlarını devam ettirir. DD’ye sahip olmayan reseptörler ise TRAF1, 2, 3, 4, 5 ve 6 adaptör proteinleri yoluyla sinyalizasyonlarını sağlarlar (Aggarwal 2003). Ligand-Reseptör-Adaptör protein olarak kenetli yapı DISC (Death-inducing Signaling Complex) olarak isimlendirilir. Adaptör proteinler aracılığı ile (DISC yapısı) sitoplazmaya ulaşan sinyal, reseptörlere göre değişmek ile

birlikte, hücrede apoptozis, proliferasyon ve farklılaşma gibi birçok süreci tetikler. TNF reseptörleri ile hücreye ulaşan sinyaller NF- κ B (Nuclear Factor kappa-B), JNK (Jun N-terminal Kinase), MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ve kaspaz kaskadını içeren bir dizi yolu tetikleyebilir (Tablo 8).

2.5.2.4.1. Neden TRAIL? TRAIL ve Apoptozisdeki Önemi

İleri evre kanserlerin çoğunda mutant olduğu bildirilen p53, birçok apoptotik yolağın uğrak noktasıdır ve bu sebeple çeşitli ileri evre kanserlerde, apoptozis indüksiyonunun üzerinde mutant p53 kaynaklı bir dirençlilik doğmaktadır (Levine 1997). Bu direncin atlatılabilmesi için p53'den bağımsız olarak apoptozisi indükleyebilen sinyal yollarının araştırılması son derece önemlidir. TNF Üstfamilyası'nın diğer yollardan farklı olarak kendisini özel kılan nokta da tam burasıdır. TNFSF üyeleri p53'den bağımsız olarak apoptozisi tetikleyebilmekte ve bu özellikleri sayesinde ileri evre kanser tedavilerinde önemli bir seçenek olarak yer almaktadırlar. Fakat güçlü sitotoksik etkileri ve p53'den bağımsız bir yolla apoptozis indüksiyonunu sağlamalarının yanında, kanser hücrelerinden ziyade, sağlıklı hücreler üzerinde de etkili bir şekilde apoptozise sebep olmaktadır (Şanlıoğlu 2011). Bu durum, iyi bir kemoterapik ajanın sahip olması istenilen özelliklerinden değildir. Yapılan araştırmalar, bir TNF üyesi olarak TRAIL reseptörlerinin apoptozisi indükleyebilen diğer TNF reseptörlerinden daha yaygın bir doku yelpazesinde bulunduğunu (Spierings ve ark. 2004) ve diğer üyelerden farklı olarak mutant hücreler üzerinde, hücre ölümünü çok daha seçici bir şekilde tetiklediği, böylece neredeyse yan etkisiz bir şekilde apoptoza neden olduğu göstermiştir (Griffith ve Lynch 1998, Bonavida ve ark. 1999, Ashkenazi ve ark. 1999, Mitsiades ve ark. 2001, Duiker ve ark. 2006, Oldenhuis ve ark. 2008). TRAIL'in deney hayvanlarında sistemik kullanımı herhangi bir toksik etki göstermezken TNFSF üyesi diğer ligandların sistemik kullanımı ciddi toksik etkilere sebep olmaktadır (Walczak ve ark. 1999). TRAIL aracılı hücre ölümü aynı zamanda hem mitokondri temelli hem de mitokondriden bağımsız olarak apoptotik sinyalizasyon sağlar. TRAIL'in bu özelliği, apoptozisin oluşması için zorunlu olarak mitokondrinin uyarılması gereken ve gerekmeyen kanser hücrelerini aynı anda indükleyebildiği için eşsizdir (Pennarun ve

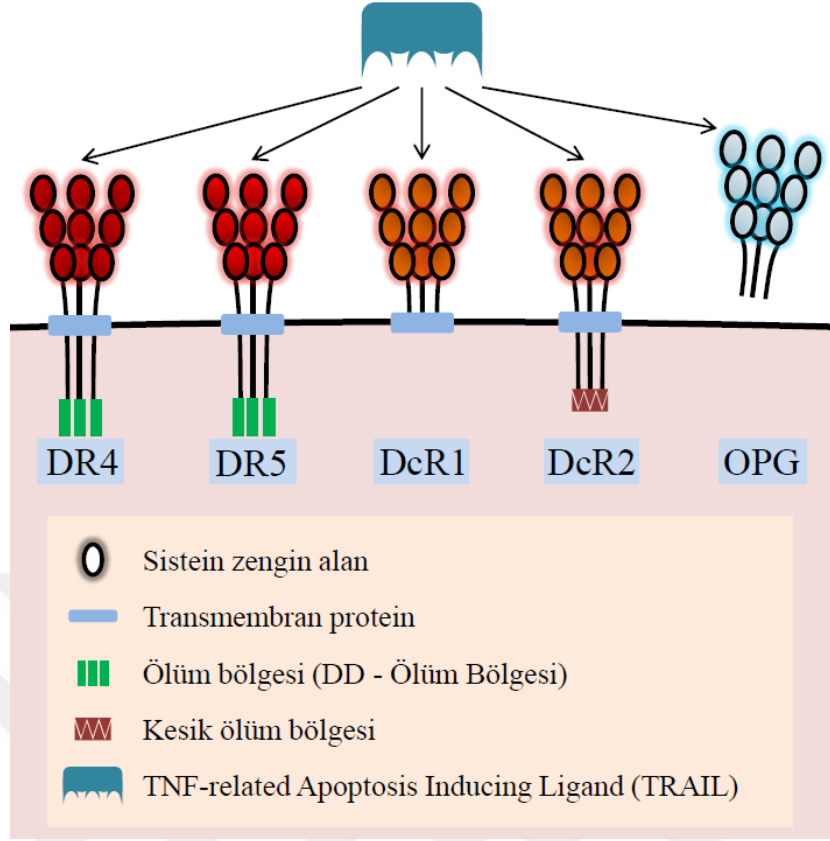
ark. 2010). Bu benzersiz özelliklerinden dolayı TRAIL, ileri evre kanser tedavileri için ahit sandığının kapağını aralamıştır.

2.5.2.4.2. TRAIL ve Reseptörleri

TRAIL, NK (Natural Killer) hücreleri, monositler, periferal T-hücreleri ve dendritik hücrelerce sentezlenebilen TNFSF üyesi ligandır (Duiker ve ark. 2006). Ligandın etkileşebildiği reseptörler ise DR4, DR5, DcR1, DcR2 ve OPG reseptörleridir (Şekil 10). Bu reseptörlerden yalnızca DR4 ile DR5 hücre içerisine ölüm sinyalleri ulaştırabilir. DcR1, DcR2 ve OPG, TRAIL için yem reseptörler olarak adlandırılır ve TRAIL ile etkileşebilmelerine rağmen apoptoza neden olmazlar. DcR1 ve OPG DD içermezler fakat DcR2 bu iki yem reseptörden farklı olarak kesik ve fonksiyonel olmayan bir DD'ye sahiptir (Von Karstedt ve ark. 2017).

TRAIL reseptörleri arasından en az ifade edilen reseptör DcR1'dir ve aşırı ekspresyonu apoptozis ile ilişkili değildir. Dahası NF- κ B DcR1'i upregüle etmektedir (Bernard ve ark. 2001). DcR2 ise yaygın olarak ifade edilir ve işlevsel reseptörler olan DR4 ve DR5 ile %58-70 arasında benzerlik göstermektedir. DcR2'nin de aşırı ekspresyonunun apoptozis ile ilişkili olmamasının yanı sıra, DcR2'nin TRAIL ligandı ile bağlanması NF- κ B'nin aktivasyonuna neden olmaktadır (Falschlehner ve ark. 2007).

DR4 ve DR5'in aşırı ekspresyonu ise apoptozisle doğrudan ilişkilidir. TRAIL 37°C'de DR5'e karşı en yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Bu tercih sebebinin, fizyolojik koşullar altında endojen TRAIL yoğunluğunun sınırlı olmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Von Karstedt ve ark. 2017). OPG ise fizyolojik olarak TRAIL dışında RANK (Receptor Activator of NF- κ B) ile yarışarak kemik homeostazında rol alır ve osteoklastogenezin dengelenmesinde önemlidir. NF- κ B reseptör aktivatörü olarak anti-apoptotik görev üstlenir. Ayrıca immun cevabın düzenlenmesinde görev alan OPG'nin TRAIL ile etkileşimi ise tam olarak anlaşılmış değildir. Fakat TRAIL için yem reseptör görevi gördüğünden (NF- κ B aktivasyonu), hücre sağkalımı üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Kimberley ve Screatton 2004, Goswami ve Sharma-Walia 2016).

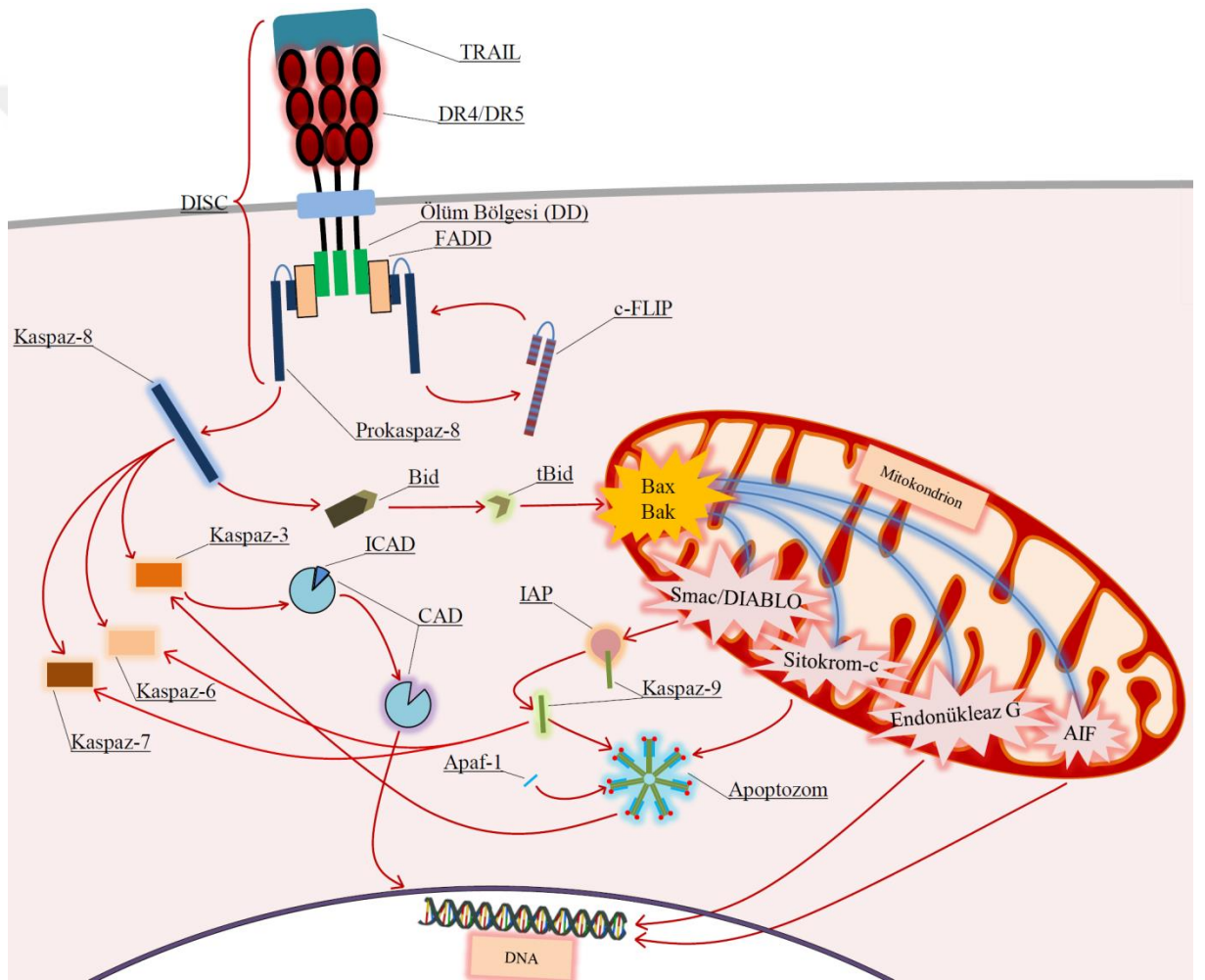


Şekil 10. TNF-related Apoptosis Inducing Ligand'ın bağlandığı reseptörler.

2.5.2.4.3. TRAIL Aracılı Hücre Ölümü Mekanizması

TRAIL, işlevsel ölüm reseptörlerine (DR4 ve DR5) bağlandıktan sonra, membran yüzeyinde üç parça halinde bulunan reseptörlerin trimerizasyonu şekillenir. Trimerizasyonun şekillenmesi, reseptörlerin hücre içi kısımlarında bulunan DD'lerin kümelenmesine sebep olur ve bu ölüm bölgeleri aracılığı ile TRAIL sinyalizasyonunda görev alan adaptör protein FADD da bu yapıya tutunarak DISC şekillenmiş olur. DISC yapısının oluşması prokaspaz-8'in aktif kaspaz-8'e dönüşmesine neden olarak kaspaz kaskadını başlatır. Burada önemli olan bir molekül de prokaspaz-8'in negatif dominantı olan FLIP'tir (Cellular FLICE-like Inhibitory Protein-FLIP). FLIP prokaspaz-8 ile yarışarak adaptör protein FADD'ı meşgul eder ve kaspaz kaskadının başlamasını engellediğinden anti-apoptotik bir rol üstlenir. TRAIL ile bağlanan ölüm reseptörlerinin oluşturduğu DISC yapısının, Prokaspaz-8'i aktif kaspaz-8'e dönüştürmesi ile başlayan kaspaz kaskadı, diğer TNFSF üyelerinin oluşturduğu sinyalizasyondan farklı olarak hem mitokondri temelli içsel (Intrinsic)

hem de dışsal (Extrinsic) sinyalizasyon oluşturur. Bu durum ise Tip-I ve Tip-II hücrelerin her ikisinde de apoptozise neden olur. Tip-I hücrelerde kaspaz-8 aktivasyonu efektör kaspazlar olan kaspaz-3, 6 ve 7'yi aktifleştirerek direk olarak apoptozis tetiklenmiş olur. Bu yoldan ilerleyen kaspaz kaskadı, aktin ve nükleer laminler gibi birçok hücre içi proteinin parçalanmasını (Krammer ve ark. 2007) ve ICAD'ın (Inhibitor of Caspase-activated DNase) kaspaz-3 tarafından CAD'a dönüştürülerek çekirdeğe göçü ile de DNA fragmentasyonu oluşumuna sebep olur (Şekil 11) (Nagata 2000).



Şekil 11. TRAIL aracılı hücre ölümü mekanizması.

Mitokondri permabilitesi üzerinde etkili pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasında, hücrenin sağkalımının devamı için bir denge bulunmaktadır. Bcl-2 ve Bcl-XL proteinleri anti-apoptotik işlev görürler ve permabilitenin arttırılmasını

tetikleyen sinyalleri baskırlar. Apoptozun oluşması için bu denge bozulmalı ve Bcl-2 ailesi üyeleri Bax (Bcl-2-associated X Protein) ve Bak'ın (Bcl-2 Antagonist Killer Protein) mitokondri kısımlarında translokasyonları sağlanmalıdır. Bu stimülasyonun oluşması için aracılık eden protein ise Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid'dir (BH3 Interacting-domain). DISC tarafından aktive edilen kaspaz-8 Bid'i tBid'e (truncated Bid) dönüştürür ve bunun sonunda tBid mitokondriye göç eder. Mitokondriye göç eden tBid, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri Bax ve Bak'ı indükleyerek mitokondri permabilitesinin artırılmasını sağlar (Happo ve ark. 2012). Artan mitokondri permabilitesi sonucunda pro-apoptotik moleküller olan sitokrom-c, Smac/DIABLO, AIF, OMI/HtrA2 ve Endonükleaz G sitoplazmaya geçer. Buradan itibaren ilerleyen yol içsel yol olan mitokondri aracılı apoptozistir. Smac/DIABLO ve OMI/HtrA2, sitoplazmada bulunan IAP ailesi üyeleri cIAP-1, cIAP-2 ve XIAP'ı bağlar. IAP ailesi normal koşullarda sitoplazmada bulunan prokaspaz-9'u tutarak apoptozom oluşumunu engellerler. IAP ailesi üyelerin tutulması ile kaspaz-9 apoptozom yapısına katılır ve ardından, sitokrom-c ile sitoplazmik protein olan Apaf-1'i de tutarak apoptozom oluşması tetiklenmiş olur. Esasında kaspaz-9'un aktivasyonu kaspaz kaskadını tekrardan tetiklediğinden bir pozitif geri besleme (Positive Feedback) döngüsüdür. Apoptozomlar da kaspaz-8'den ayrı olarak kaspaz-3 aktivasyonunu bağımsız olarak sağlarlar. Kaspaz-3'ün aktivasyonu ile ICAD dışsal sinyalizasyonda olduğu gibi CAD'a dönüştürülerek çekirdeğe göç eder ve de diğer hücre proteinlerine saldırı başlar. Ayrıca artan mitokondri permabilitesi ile sitoplazmaya geçen AIF ve endonükleaz G, kaspazlardan bağımsız olarak çekirdeğe göç eder ve bağımsız olarak DNA fragmentasyonuna neden olur (Yadav ve ark. 2014).

2.5.2.4.4. TRAIL Aracılı Hücre Ölümüne Karşı Direnç Oluşturan Yollar

Yem reseptörlerden olan DcR1 ve DcR2, TRAIL aracılı hücre ölümüne neden olmamakla birlikte aynı zamanda hücre yüzeyine gelen ligandlara bağlanarak ligand yoğunluğunu azaltmaktadırlar. Yem reseptörlerin bu durumda, işlevsel reseptörler olan DR4 ve DR5 ile yarıştığı söylenebilir. TRAIL'a dirençli kanser hücre hatlarında DcR2'nin ekspresyon profilinin yüksek olması ve aksine TRAIL'a karşı duyarlı hücre hatlarında ise DcR2 ekspresyonunun olmaması bu hipotezi destekler

niteliktedir (Şanlıoğlu ve ark. 2007a). Dahası, TRAIL'a dirençli kanser hücre hatlarının yem reseptörleri siRNA ile bloke edildiğinde, bu hücre hatlarının TRAIL'a karşı duyarlı hale geldiği gösterilmiştir (Aydın ve ark. 2007, Şanlıoğlu ve ark. 2007b). TRAIL aracılı hücre ölümüne dirençliğin oluşması aynı zamanda DR4, DR5 ve DcR2 reseptörlerinin NF- κ B'yi aktive etmesi ile de ilişkilidir (Falschlehner ve ark. 2007). NF- κ B, 200'den fazla gen üzerinde düzenleyici işlev görerek çeşitli stres durumlarında hücrenin sağkalımını sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür ve TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı direnç oluşumunda neredeyse anahtar rolü gördüğü söylenebilir.

NF- κ B aktivasyonu DR4, DR5 ve DcR1 reseptörlerinin TRAIL ile bağlanması sonucu aktive edilebilir. FADD'dan bağımsız olarak, ölüm bölgeleri aracılığıyla RIP (Receptor-interacting Protein) NF- κ B ile etkileşir ve aktivasyon sağlanarak anti-apoptotik uyarılar oluşturulur (Falschlehner ve ark. 2007). Bu anti-apoptotik uyarıların içerisinde FLIP geninin transkripsiyon kontrolü de bulunmaktadır. NF- κ B aktivasyonu sonucu FLIP transkripsiyonu artarak DISC'in aktif kaspaz-8 oluşturmasını engeller ve bu sayede hücre proliferasyonunu destekler (Kreuz ve ark. 2001). Çeşitli kanser tiplerinde FLIP ekspresyonunun artış göstermesi ve ayrıca FLIP ekspresyonunun artan tümörigenesis ile ilişkili olmasıyla birlikte, TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı bir direnç unsuru olarak değerlendirilmektedir (Day ve ark. 2008). NF- κ B aynı zamanda Bcl-2 ailesi anti-apoptotik proteinler üzerinde aktivite sağlayarak TRAIL aracılı hücre ölümü üzerinde baskılayıcı etki gösterebilmektedir. Bcl-XL NF- κ B tarafından da kontrol edilir. Reseptör-RIP-TRAF2-NF- κ B etkileşimi sonucunda IAP ailesi proteinler ve Bcl-XL aktivasyonu artmaktadır (Ravi ve ark. 2001).

TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı direnç oluşturan önemli unsurlardan bir diğeri de reseptörler üzerinde meydana gelebilecek mutasyonlardır. Ligandın etki ettiği işlevsel reseptörler olan DR4 ve DR5'i ifade eden kromozom bölgesi insanlarda 8p21-22 üzerinde bulunmaktadır. Çeşitli tümörlerde DR4 ve DR5 üzerinde mutasyonlar meydana gelebilmekte ve en sık görülen mutasyon DR5'in FADD bağlanma bölgesinde meydana gelmektedir. TRAIL'in işlevsel reseptörlere bağlanması ile oluşan DISC yapısı, hücre içerisinde apoptotik şelaleyi başlatan

yapıdır ve FADD bağlanma bölgesinde meydana gelebilecek konformasyon sorunları ölüm sinyallerini hücre içersine iletemeyecek duruma getirir. Aynı zamanda DR5 üzerinde meydana gelen mutasyonların DR4 reseptörü üzerinde dominant negatif bir etki gösterdiği de bilinmektedir (Bin ve ark. 2007).

Son yıllarda TRAIL aracılı hücre ölümünü engelleyen bu nedenlerin yanına, etkileri yeni anlaşılmaya başlanan Sig1R de (Sigma 1 Receptor) eklenmiştir. Sig1R inme ve nörodejeneratif hastalıklarda rol oynayan ve aynı zamanda farklı kanser türlerinde yüksek ekspresyon profiline sahip bir şaperondur (Crottès ve ark. 2016). ER membranı üzerinde bulunan Sig1R, ER'nin mitokondriye yakın ara bölgesinde yoğun olarak bulunur. Stres aracılı olarak, farklı iyon kanallarının aktivitesini ve kalsiyum kanalları, protein kinazlar ve inozitol fosfatlar gibi sinyalizasyon moleküllerinin aktivasyonunu, translokasyona uğrayıp birebir proteinler ile etkileşerek düzenler. Kanser hücre hatlarına TRAIL uygulanması, farklı kanser türlerinde yüksek ekspresyon profiline sahip olduğu bilinen Sig1R protein seviyesini arttırmakta ve böylece TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı bir direnç oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu şaperonun susturulması ile TRAIL dirençliliği gösteren farklı kanser hücre hatları duyarlı hale getirilmektedir (Das ve ark. 2016).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Glove box kabin
- Neopren glove box eldiveni
- Arduino UNO R3 kartı
- Grove O₂ sensörü
- DHT22 sıcaklık ve nem sensörü
- ESP8266 WiFi serial transceiver
- 150 Litre 200 Bar çelik tüp (HABAŞ)
- Karışım gaz regülatörü (Özsoy Pres, 403.05)
- Homojenizatör (Scilogex, D160)
- Hassas terazi (Precisa, 205A SCS)
- Laminer hava kabini (Nüve, LN090)
- Vortex (ISO Lab, MX-S)
- Derin dondurucu (Beko, 3400 CF)
- Thermalcyclers (GenePro, TC-E-96G)
- Yatay Elektforez (CBS Scientific, WSGE-014)
- Nanodrop spektrofotometre (UVS-99)
- UV-Jel görüntüleme cihazı (DNR, MiniLumi)
- Mikrodalga Fırın (Beko, MD 1610)
- Mikrosantrifüj (Scanspeed, mini)
- 0,5-2,5µl, 2-20µl, 100-1000µl ayarlanabilir otomatik pipetler (Eppendorf)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

- Sevofluran (Sevorane)
- %7 O₂ + %93 balans Azot karışım gazı (HABAŞ)
- TRI Reagent (Sigma)

- Kloroform (Sigma)
- İzopropanol (Sigma)
- Nuclease Free H₂O (AppliChem)
- Etanol (Sigma)
- Agar (peqlab)
- 50X TAE Elektroforez Tamponu (ThermoFisher)
- Etidyumbromür (MP Bio)
- 100 bp Marker (Amresco)
- DNA Yükleme Boyası (Thermo Scientific)
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)
- Taq Polimeraz Seti (Sigma)
- dNTP Seti (Thermo Scientific)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Primerler

Çalışmada kullanılan TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, XIAP, cIAP-1 ve cIAP-2 F (Forward) ve R (Reverse) primerleri Tablo 9'da gösterilmektedir.

Tablo 9. Çalışmada kullanılan primerler.

TRAIL	F: atgccttctcaggggccctgaaggacctc R: ttagttaattaaaaaggctccaaagaagct	54-58°C
DR4	F: atggcgccaccaccagctagagtacatc R: tcactccaaggacacgggtgccatctt	54-58°C
DR5	F: atgttacaagcttttctgctactgagtttc R: ctaggctgtagtgttctgataaacgaact	54-58°C
DcR1	F: atggcccggatccccaagaccctaaagtctgc R: tcaaacacaacacaatcagaagcacaattagaac	54-58°C
DcR2	F: atgggactttggggacaaagcgtcccaccgc R: tcacaggcaggacgtagcagagcctgcctcat	54-58°C
OPG	F: atgaacaagtggctgtgctgcgcactcctgg R: ttataagcagcttatttcacggattgaacc	54-58°C
FLIP	F: atggcctgagcactgtgtctgctgagg R: tcatgtgtgagacaggatgagtttctcc	54-58°C
cIAP-1	F: atggacaaaactgtctcccagagactc R: tcatgagagaaatgtgcgcacagtccc	54-58°C
c-IAP-2	F: atgacatgggtcaagacagcgcctttcta R: tcaggagagaaatgtgcgcactgtgccc	54-58°C
XIAP	F: atgacttttaacagttttgaaggatctagaa R: ttaagacataaaaattttgcttgacgtaa	54-58°C

3.2. Metot

3.2.1. K r Farelerin Yakalanması

K r farelerin araziden toplanmasına yönelik etik kurul izni, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (KA -HADYEK) 17.12.2015 tarihli ve 2015/129 sayılı şartı uygun kararına binaen, T.C. Orman ve Su İŐleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'ne yapılan baŐvuru sonucunda alınan 29.01.2016 tarihli ve 72784983-488.04-23381 sayılı araştırma izni ile sağlanmıştır. Araştırmada kullanılan k r fareler, Kafkas  niversitesi kampüs sınırları içerisinde 2 ve kampüs sınırına yakın bulunan 1 farklı popülasyondan 28.09.2016 - 09.10.2016 tarihleri arasında yapılmış 5 arazi çalışması sonucu yakalanmıŐtır.

Hayvanlar kapalı galerilerde yaŐadıklarından, galerinin sahibi olan hayvan eğer üreme odası oluŐturmuŐ bir dişi değilse, cinsiyet tahmini yapmak zordur. Bu sebeple yakalanan dişi k r fareler yakalanmalarından hemen sonra kendi tünellerine tekrardan bırakılmıştır. Araştırmada kullanılan k r farelerin tamamının tek bir popülasyonlardan yakalanmamalarının sebebi ise, tek bir popülasyon üzerinde üreme baskısının oluşmasını engellemektir. K r farelerin yakalandığı arazilerin uydu görüntüsü Resim 2'de, ilgili arazilerin koordinatları ve arazi çalışmasının yapıldığı alanların yaklaşık m² değerleri ise Tablo 10'da gösterilmiştir.

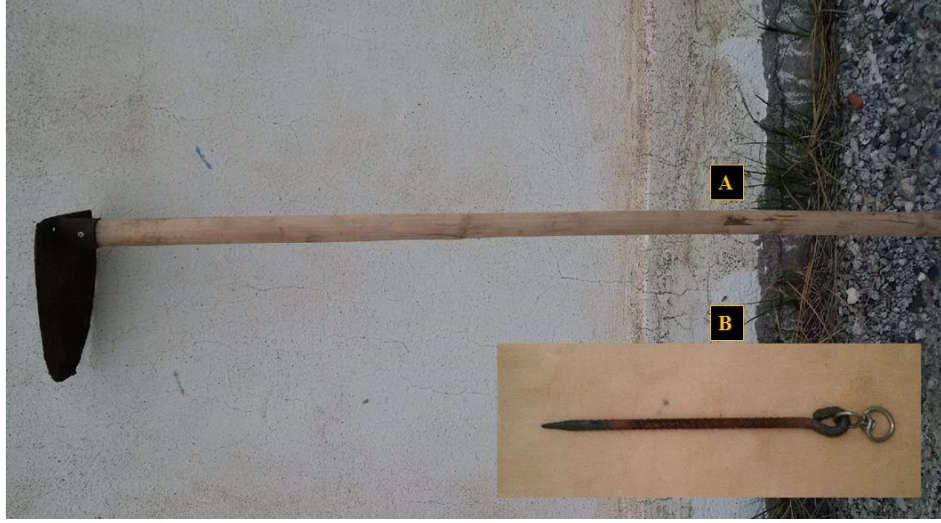


Resim 2. Kör farelerin toplandığı arazilerin uydu görüntüsü.

Tablo 10. Kör farelerin yakalandığı arazilerin koordinatları ve arazi çalışmasının yapıldığı alanların yaklaşık metre kare değerleri.

	Koordinat	Alan (m²)
1. Arazi Çalışması	40°34'43.40''K 43°03'34.21''D	~ 23.402 m ²
2, 3 ve 4. Arazi Çalışması	40°34'27.53''K 43°02'21.55''D	~ 28.087 m ²
5. Arazi Çalışması	40°34'47.70''K 43°03'32.40''D	~ 15.354 m ²

Hayvanların yakalanması için ilk önce kazdıkları tünellerden çıkarttığı taze toprak kümeleri belirlenir. Taze olan toprak kümeleri hava ısısına göre değişim göstermekle birlikte nemli olmalarıyla ayırt edilebilir. Taze toprak kümeleri belirlenerek çapa (Resim 3A) yardımıyla kaldırılır ve bir çubuk yardımıyla (Resim 3B) var olan tünel yönleri belirlenir. Yönleri belirlenen tünellerin üst kısmındaki toprak, tünel hava almayacak kadar kalın, çapa ile müdahale edilebilecek kadar ince bir şekilde temizlenir. Tünelin yönü doğrultusunda yaklaşık 40-50 cm boyunca yapılan bu işlem sonucu tuzak hazırlanmış olur. Bu penetrasyon işlemi ile tünel içerisinde hava akımı, ısı ve ses gibi birçok etmen değiştiğinden kör fare bir süre sonra bu açık kısmı kapatmaya çalışır.



Resim 3. Kör fareleri yakalamak için kullanılan çapa ve demir çubuk.

Kör fare bu açık kısmı kapatmaya çalıştığı sırada hayvana zarar vermeden açılan galeri ağzının 30-40 cm gerisine çapa ile vurularak hayvanın kaçış yönü kapatılır. İnceltilmiş üst toprak kısmı bir demir çubuk yardımı ile yine hayvana zarar vermeden kırılarak kör fare canlı olarak yakalanır.

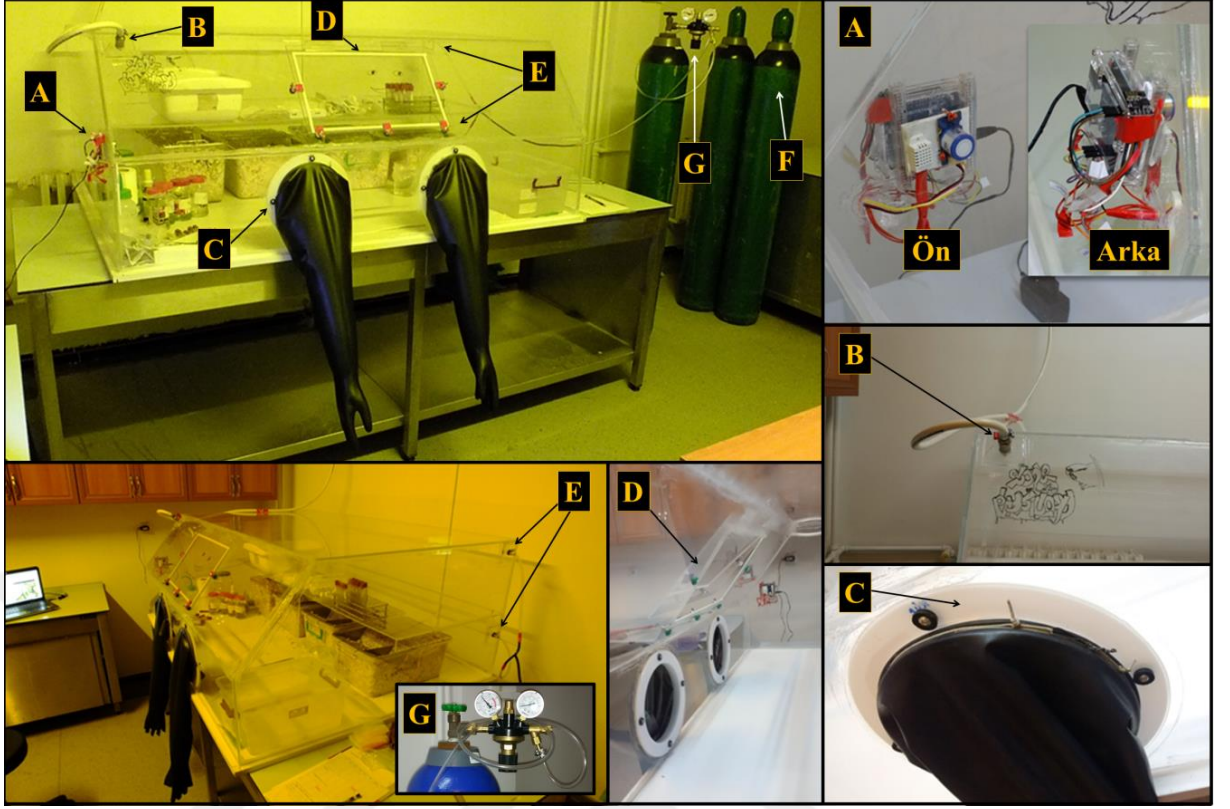
3.2.2. Yakalanan Kör Farelerin Bakımı ve Beslenmesi

Kör fareler soliter, teritoryal ve saldırgan rodentlerdir. İlk yakalandıkları andan itibaren 3-4 haftalık süreç içerisinde oldukça streslidirler. Bu sebeple kendilerini güvende hissedebilmeleri için sessiz, nemli ve ortam sıcaklığı yaklaşık 20-23°C arasında seyreden laboratuvarında, kısmen de olsa rahat hareket edebilecekleri büyük boy sıçan kafesleri (42,5x26,5x18cm) içerisinde tutuldular. Hayvanların kendilerini rahatlıkla gömebilmeleri ve saklanabilmeleri için kafesler her temizleme işleminden sonra tamamen tozsuz talaş ile dolduruldu. Temizliklerine çok düşkün olduklarından talaşları kirlenmeye müsaade edilmeden 2-3 günde bir değiştirilerek temizlendi. *Nannospalax nehringi* tamamen vejetaryen beslenen ve su ihtiyaçlarını yedikleri taze bitkilerden karşılayan canlılardır. Bu sebeple beslenme mönüleri günlük olarak taze havuç, turp, elma, salatalık, patates, mor havuç ve haftalık olarak da mısır ve buğdayı içecek şekilde, *ad libitum* olarak oluşturuldu. Oldukça stresli ve sinirli olan kör farelerin laboratuvar koşullarına adaptasyonlarının

sağlanması için deney başlangıcından önce yaklaşık 3 ay belirtilen koşullar altında bakımları sağlandı.

3.2.3. Deney Düzeneginin Tasarlanması

Kör farelerin hipoksiye maruz bırakılmaları ve deney sonunda hayvanların normoksiye maruz kalmadan analizler için gerekli dokuların alınması için, 1 cm kalınlığında şeffaf polipropilen malzemeden tasarlanan glove box kabini kullanıldı (Resim 4). Polipropilen glove box kabininin tamamlanması için 8" çaplı neoprene eldiven kullanıldı (Resim 4). Neoprene eldivenin kabine takılması için ise, eldiven ölçülerine göre 3D yazıcıda tasarlanıp üretilen eldiven portu kullanıldı (Resim 4C). Karışım gaz tüplerinden gelen hipoksik gaz, kabin gaz giriş musluklarından (Resim 4E) akıtıldı ve açılan farklı bir tahliye vanası ile çıkan gaz dışarıya verildi (Resim 4B). Yüksek basınçlı karışım gaz tüplerinden gelen gazın basıncını düşürmek ve dakika litre akış hızını ayarlamak içinse karışım gaz regülatörü kullanıldı (Resim 4G). Gaz girişi başladıktan sonra kabinden kaçak olmaması için kabinin her eklem bölgesi üç kat gaz sızdırmaz özellikli yağ bazlı silikon ile izole edildi. Kabin kapağının sızdırmazlığı ise, gaz sızdırmaz plastik conta ve sıkıştırma vidalarının yardımıyla sağlandı.



Resim 4. Deney düzeneğinin tasarımı; **A:** Oksijen, nem ve sıcaklık takip cihazı, **B:** Kabin içi gaz tahliye vanası, **C:** Eldiven portu, **D:** Kabin kapağı, **E:** Gaz giriş musluğu, **F:** 150 barlık %7 O₂ + %93 Azot karışım gaz tüpleri, **G:** Karışım gaz regülatörü.

Deney düzeneğine ayrıca, her türlü ihtimale karşı oksijen ısı ve nem miktarlarındaki değişimlerin takip edilmesi amacıyla, fiziksel programlama ve robotik geliştirme platformu olan Arduino UNO R3 kartı üzerine eklenerek kodlaması yapılan Grove O₂ Sensörü ($\pm\%0,05-0,15$ duyarlıklılı) ve DHT22 Sıcaklık ve Nem Sensörü entegre edildi. Bu sensörlerden ayrı olarak yine Arduino UNO R3 kartı üzerine, WiFi aracılı olarak çevrimiçi bağlantının sağlanabilmesi için ESP8266 WiFi Serial Transceiver bağlanarak verilerin internet üzerinden uzaktan takibi sağlanmış oldu (Resim 4A). Arduino UNO R3 kartı üzerine yapılan kodlamalar EK1’de verilmiştir.

3.2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Kör farelerin laboratuvar şartlarına uyumlarının sağlanması için, deney gruplarının oluşturulmasından önce, 3 ay boyunca belirtilen koşullar altında bekletildiler. Hayvanların ilk yakalandıktan sonra göstermiş oldukları agresif

davranışlar kaybolduktan sonra normoksi ve hipoksi grubu olmak üzere rastgele iki gruba ayrıldılar. Hipoksi grubunu oluşturan kör fareler (n=5) tam karanlıkta (24K:0A), kafesleri ile birlikte %70 nem ve 20-23°C sıcaklığa sahip glove box kabin içerisinde 52 saat boyunca %7 oksijen + %93 azot karışım gazına maruz bırakıldı. Hayvanların hipoksi altında artacak olan dakika solunum hızlarıyla tidal volümleri göz önüne alınarak ve kabin içi oksijen yoğunluğunun %7'nin altına düşmesi veya hiperkapni oluşmasının da engellenmesi için, karışım gazının kabin içerisine akış hızı 20 litre/dakika olarak belirlendi (Resim 4G). Normoksi grubunu oluşturan kör fareler ise (n=4) tam karanlıkta (24K:0A), %70 nem ve 20-23°C sıcaklığa sahip laboratuvar koşullarında 52 saat boyunca bekletildi. Deney süresi sonunda, hipoksi koşullarını değiştirmeden dokuların alınması için, kör fareler glove box kabininin içerisinde, sevofluran ventilasyonu ile anestezi edilerek, batin ön duvarı insizyon ile açılıp diyaframdan kalbe ulaşılarak sağ ventrikülden kan örnekleri toplandı. Açılan insizyon bölgesinden karaciğer, kalp, böbrek, akciğer, mide ve pankreas, foramen magnumdan girilerek ise beyin dokusu alınıp Tri Reagent içerisinde homojenize edildi. Elde edilen homojenizatlar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.5. TRI Reagent ile Total RNA İzolasyonu

Hayvanların öldürülmelerinin ardından dokular hızlıca parçalanıp 1 mL TRI Reagent içerisinde homojenize edilmiştir.

1. 1 mL TRI reagent içerisinde konulan dokular, homojenizasyonun ardından sürekli pipetlenerek TRI reagent'in dokulara iyice nüfus etmesi sağlanmıştır.
2. 5 dk. oda sıcaklığında bekletilen homojenizatlar ardından -20°C'de bir gece bekletilmiştir.
3. Bir gece bekletilen homojenizatlar buz üzerinde çözdürülerek her 1mL TRI reagent için 200 µl kloroform eklenmiş ve 15 saniye boyunca hızlı bir şekilde çalkalanmıştır.
4. Karışım 10 dk. boyunca oda ısısında bekletilmiş ve bu süre sonunda 15 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonunda oluşan üst faz, orta ve alt fazın alınmamasına dikkat edilerek yeni bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır.

6. Yeni tüpe aktarılan üst fazın üzerine, kullanılan 1 mL TRI reagent için 500 µl izopropanol eklenerek 10 dk. boyunca oda ısısında bekletilmiştir.
7. Karışım, süre sonunda 8 dk. boyunca 13.000 rpm'de santrifüje edilmiştir.
8. Santrifüj sonunda karışım yavaş bir şekilde dökülerek pelet elde edilmiştir.
9. Elde edilen peletin üzerine, kullanılan 1 mL TRI reagent için 1 mL %75'lik etanol eklenerek vortexlenmiş ve peletin etanol içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.
10. Vortexlenen karışım 5 dk. boyunca 7.500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonunda karışım yavaş bir şekilde dökülerek tekrar pelet elde edilerek tüpler ters çevrilmiş ve 15-20 dk. boyunca oda ısısında tüplerin kuruması sağlanmıştır.
12. Kurutma işleminin ardından pelet, 80 µl DNase/RNase içermeyen dH₂O ile iyice çözülerek homojenize edilmiştir.

3.2.6. RNA Örneklerinin NanoDrop ile Spektrofotometrik Olarak Miktar ve Kalite Tayini

Nanodrop cihazı ile RNA örneklerinin, RNA çözeltilerinin hazırlanmış olduğu dH₂O kör olarak okutulurken, 280 nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır.

3.2.7. Total RNA Örneklerinden Geri Transkripsiyon (RT) yöntemi ile cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

cDNA kütüphanesinin oluşturulması için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Yürütülen tüm basamaklar kit protokolünde belirtilen yönergeler doğrultusunda yapılmıştır.

1. RNA örneklerinden eşit yoğunlukta alınması için gereken miktar belirlenmiştir.
2. RNA örnekleri bir pipet yardımıyla buz üzerinde tekrardan homojenize edilmiş ve 1. basamakta hesaplanan örnek miktarları PCR tüplerine aktarılmıştır.
3. PCR tüplerine aktarılan örneklerin üzerine 1 µl Oligo (dT)₁₈ primeri eklenerek son hacim steril dH₂O ile 12 µl'ye tamamlanmıştır.

4. Karışım pipet yardımı ile homojenize edilerek santrifüj edilmiştir (Tek spin).
5. Spinlemeden sonra karışım, 65°C'de 5 dk. boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
6. İnkübasyonun ardından her tüpe 2 µl dNTP (10mM) mix, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), 4 µl 5x Reaction Buffer ve 1 µl RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl) eklendi.
7. Son olarak karışım sırasıyla 42°C'de 60 dk. ve 70°C'de 5 dk. boyunca bekletilerek reaksiyonların tamamlanması sağlanmıştır.

3.2.8. TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, XIAP, cIAP-1 ve cIAP-2 Primerleri Kullanılarak PCR Reaksiyonlarının Gerçekleştirilmesi

TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, XIAP, cIAP-1 ve cIAP-2 genlerini ifade eden Reverse/Forward primerleri kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş, ürünler agaroz jel elektroforezde yürütülerek ilgili bantların görülmesi sağlanmıştır. Agaroz jel elektroforezde bantların görülmesinin ardından TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, XIAP, cIAP-1 ve cIAP-2 ile üretilen PCR ürünlerinin sekans analizleri hizmet alımı ile yapılmıştır.

1. PCR tüplerine 11 µl dH₂O, 2,5 µl dNTP mix, 2,5 µl 10x PCR buffer, 2,5 µl MgCl₂, 1 µl cDNA örneği konulmuştur.
2. Reaksiyon oluşturulacak PCR tüplerine 1. basamakta belirtilen maddeler eklendikten sonra ayrı ayrı TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, OPG, FLIP, XIAP, cIAP-1 ve cIAP-2 Reverse ve Forward primeri eklenmiştir.
3. Primerlerin eklenmesinden sonra karışım pipetlenerek santrifüj edilmiştir (Tek spin).
4. Spinleme işleminin ardından her PCR tüpüne 0,5 µl Taq DNA Polimeraz eklenerek toplam hacim 25 µl'ye çıkartılmıştır.
5. Tüpler tekrardan spinlenip thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir.
6. PCR programı, 94°C'de 3 dk., (94°C'de 1 dk., 58°C'de 1 dk., 72°C'de 1 dk. 30 defa tekrar edecek şekilde ayarlanmıştır) ve 72°C'de 5 dk., şeklinde yapılmıştır.

7. Tüm PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezde 60 dakika boyunca 100V'da yürütülerek UV görüntülemeleri yapıldı.
8. Beklenen büyüklükte elde edilen bantlar sekans analizi için ilgili firmaya gönderilmiştir (Hizmet alımı).

3.2.9. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

Tüm PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezde 60 dakika boyunca 100V'da yürütülerek UV görüntülemeleri yapılmıştır.

1. 2 mL 50x TAE tamponu, dH₂O ile 100mL'ye tamamlanmıştır.
2. 1gr agaroz tartılarak 1. basamaktaki karışımın üzerine eklendi ve mikrodalga fırında agaroz eriyinceye dek, karışım aralıklarla karıştırılarak ısıtılmıştır.
3. Homojen olarak çözünen agaroz çözeltisinin her 20 mL için 1 mL Etidyumbromür karışıma eklenerek elektroforez kasetlerine dökülmüş ve jelin oluşması için 30 dakika bekletilmiştir.
4. Elektroforez kasetlerine takılan taraklar jel oluşumunun ardından nazikçe çıkartılarak elektroforez tankının içerisine konulmuştur.
5. Elektroforez tankının içerisine, elektrik iletkenliğinin sağlanması için 50x TAE tamponundan, dH₂O yardımıyla 1x TAE çözeltisi hazırlanarak agaroz jelin üzerini yaklaşık 1cm aşacak şekilde eklenmiştir.
6. Agaroz jel kuyucuklarının en başına ve en sonuna 1µl 100bp'lik marker + 2µl yükleme boyası, örnek kuyucuklarına ise 10µl PCR ürünü + 2µl yükleme boyası pipetlenerek konulmuştur.
7. Tüm jel yürütmeleri 60 dakika boyunca 100V'de koşturulup ve son olarak UV görüntüleme sisteminde bant fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.10. Agaroz Jel Elektroforez Bant Görüntülerinin Dansitometrik Analizlerinin Yapılması ve İstatistiksel Değerlendirmeler

Elde edilen bant görüntülerinin yoğunlukları ImageJ 1.51j8 yazılımı yardımı ile sayısal değerlere (Arbitrary Unit) dönüştürülmüştür. Elde edilen sayısal değerlere IBM SPSS Statistics 20.0 yazılımı yardımıyla Independent-Samples-T Test'i

uygulanmıştır. Sonuçlar, ortalama \pm standart hata ($X \pm SE$) olarak belirlenmiş ve $p < 0.05$ istatistiksel farklılığı göstermiştir.

3.2.11. Biyoinformatik Analizler

Elde edilen sekans sonuçlarının değerlendirilmesi için çeşitli biyoinformatik araçlar kullanıldı.

NCBI (National Center for Biotechnology Information): Sekans analizi sonucunda elde edilen baz dizilerinin veritabanındaki diğer baz dizileri ile karşılaştırmak amacıyla BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) aracı kullanılmıştır. Aynı zamanda elde edilen sonuçlara göre dizi benzerliklerinin belirlenerek, yakınlık gösteren türlerin ilgili baz dizilerinden kütüphane oluşturulması amacıyla NCBI nükleotid veritabanı kullanılmıştır. BLASTp aracı da aminoasit diline çevrilen baz dizilerinin NCBI veritabanındaki benzer diziler ile karşılaştırılması amacıyla kullanılmıştır.

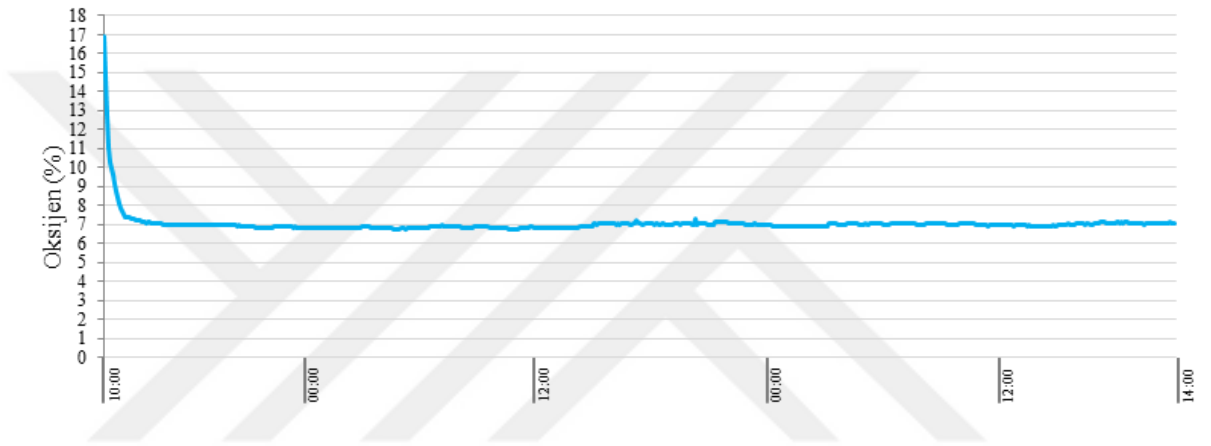
ClustalW2: Sekans sonuçları ve NCBI veritabanı taramaları doğrultusunda oluşturulan baz ve aminoasit kütüphanelerinin dikey hizalamalarının yapılması amacıyla kullanılmıştır.

Geneious: Sekans sonuçları ve NCBI veritabanı taramaları doğrultusunda oluşturulan baz ve aminoasit kütüphanelerinin dikey hizalamalarının yapılması ve sekans sonuçlarının protein diline çevrilmesi amacıyla kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Deney Süresince Glove Box Kabin İçi O₂ Basıncı ve K r Fare Davranışları

K r farelerde hipoksi kaynaklı meydana gelebilecek beklenmedik solunum hızı artışı ve kabin içerisine dışarıdan hava girişi gibi kabin içi oksijen yoğunluğuna etki edebilecek beklenmedik olumsuzlukların anlaşılması için, tasarladığımız O₂ takip cihazı yardımıyla (şekil 4A), anlık olarak kabin içi oksijen seviyesi görüntülenmiş ve deney süresince  l len O₂ yoğunluğu şekil 12’de gösterilmiştir.



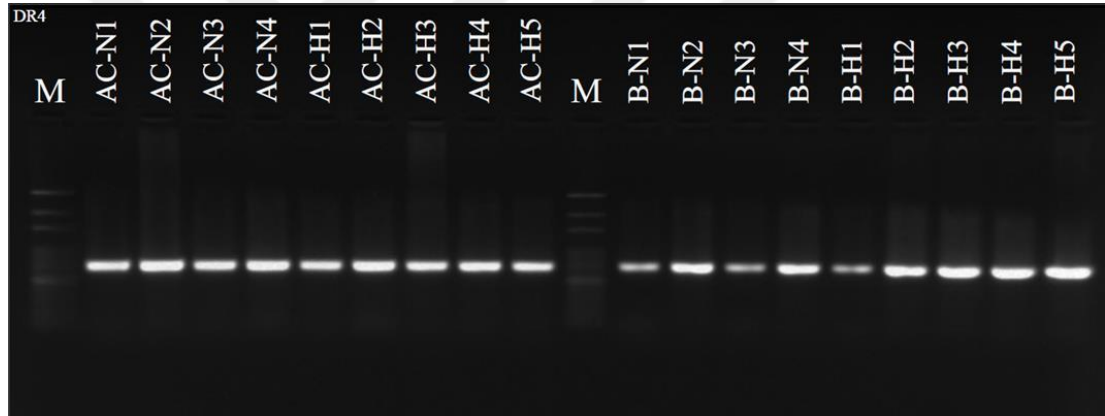
şekil 12. Deney süresince takip edilen O₂ miktarı.

Her ne kadar k r farelerin şiddetli hipoksiye karşı, neredeyse duyarsız oldukları bilirse de, deney süresince hayvanlar üzerinde meydana gelebilecek olumsuz sonuçların takibi amacıyla saatlik olarak refleks kontrolü yapıldı. K r fareler hipoksiye maruz bırakıldığı süreç içerisinde, saatte en az bir kere olmak koşuluyla, hayvanlar üzerinde gereksiz stres oluşturmamaya dikkat edilerek, davranışları ve sese karşı refleksleri kontrol edildi. 52 saatlik deney sürecinde hipoksi grubundaki k r farelerin hiçbirinde davranış değişikliği veya refleks kaybı gözlemlenmedi.

4.2. Hedef Genlerin mRNA Ekspresyonları ve Biyoinformatik Analizi

4.2.1. TNFRSF10A Geni (DR4) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi

Akciğer ve beyin dokularından izole edilerek üretilen TNFRSF10A genine ait PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulması ile elde edilen bant görüntüleri Resim 5'te gösterilmektedir. Bant görüntüleri üzerinde yapılan dansitometrik analizlerden elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizleri sonucunda, gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Ancak beyin dokusuna ait jel resimleri gözlemsel olarak karşılaştırıldığında Hipoksi Grubu'nda, Normoksi Grubu'na kıyasla DR4 mRNA ekspresyon seviyelerinde bir artışın şekillendiği görülmektedir. Akciğer dokusunda ise gen ekspresyon seviyesi açısından gözlemsel bir fark görülmemiştir.

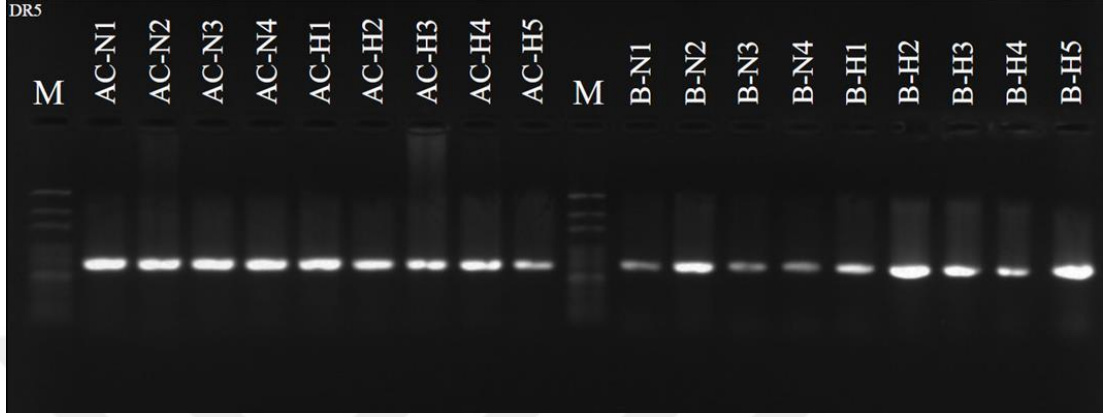


Resim 5. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF10A geni (DR4) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi'ye ait TNFRSF10A gen sekansı EK2'de sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait TNFRSF10A gen sekansının mevcut olmadığı görülmüş ve en yakın benzerliğin *Rattus norvegicus*'a ait TNF superfamily member 10 (TNFSF10) ile olduğu bulunmuştur (NCBI Accession: NM_145681.2).

Nannospalax nehringi'ye ait TNFRSF10A geninin ifade ettiği aminoasit dizisi (DR4) biyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde belirgin motifleri taşımakta olduğu görülmüştür. Yapılan üç tekrarlı sekans analizi sonucunda, *Nannospalax nehringi* DR4 reseptörü sistein zengin alanlarının Şekil 13'te verilen türler ile

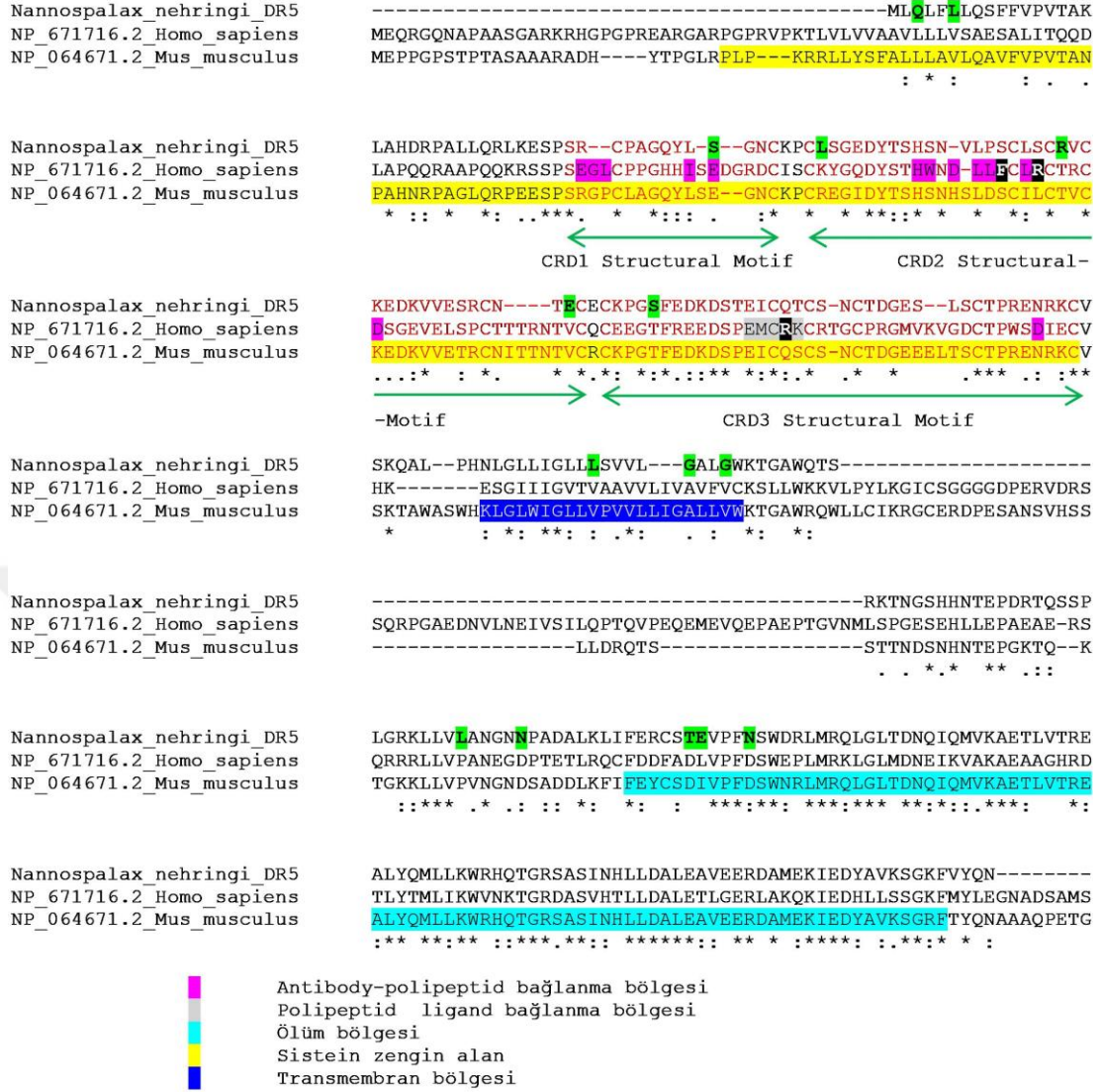
elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizleri sonucunda gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Fakat jel resimleri gözlemsel olarak incelendiğinde, hipoksinin beyin dokusu DR5 reseptörü mRNA seviyesinde belirgin bir artışa neden olduğu görülmüştür.



Resim 6. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF10B geni (DR5) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi TNFRSF10B gen sekansı EK3'te sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait TNFRSF10B gen sekansının mevcut olmadığı görülmüş ve en yakın benzerliğin *Mus musculus*'a ait Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 10b (DR5) ile olduğu bulunmuştur (NCBI Accession: NM_020275.4).

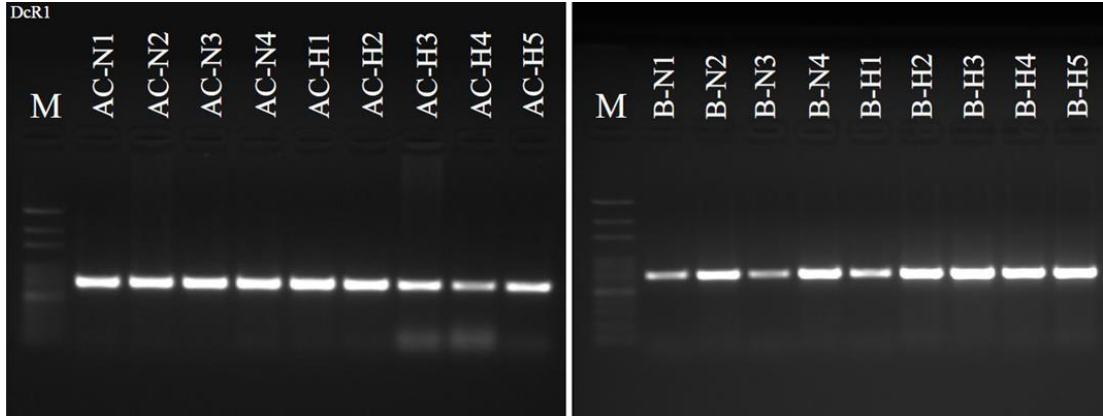
Nannospalax nehringi'ye ait TNFRSF10B geninin ifade ettiği aminoasit dizisi (DR5) biyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde belirgin motifleri taşımakta olduğu görülmüştür. Reseptörün ölüm bölgelerinin *Nannospalax nehringi*'de, Şekil 14'te verilen türlerle oldukça benzer olmakla birlikte çeşitli aminoasit farklılıklarına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca *Nannospalax nehringi*'ye ait DR5 reseptörü aminoasit dizisinin bu iki türden farklı olarak, transmembran bölgesinde sırasıyla Lösin (L), Glisin (G) ve Glisin (G), sistein zengin alanda içerisinde ise biri antibody-polipeptid bölgesine denk gelen, sırasıyla Glutamin (Q), Lösin (L), Serin (S), Lösin (L), Arjinin (R), Glutamat (E) ve Serin (S) aminoasitlerince farklılık arz ettiği belirlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. TNFRSF10B genine (DR5) ait aminoasit dizi hizalaması.

4.2.3. TNFRSF10B Geni (DR5) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi

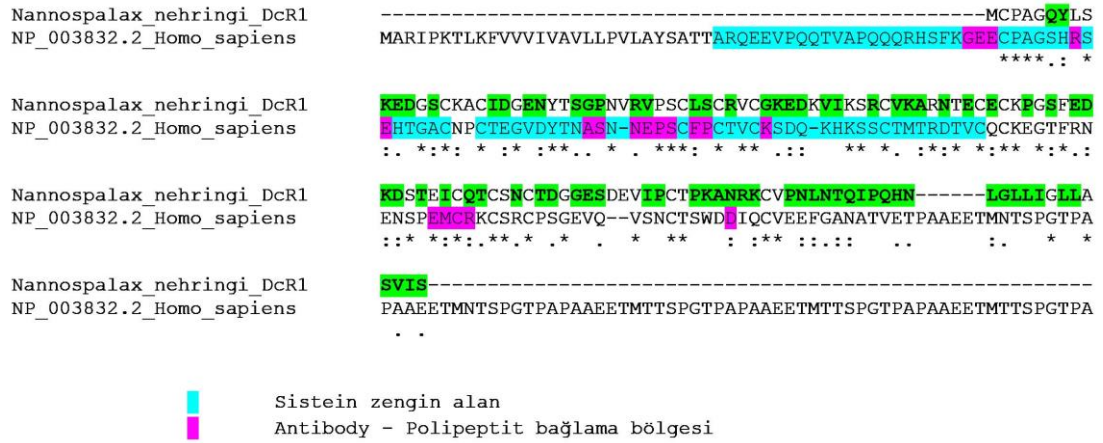
Akciğer ve beyin dokularından izole edilerek üretilen TNFRSF10C genine ait PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde 100 volta 60 dakika koşturulması ile elde edilen bant görüntüleri Resim 7’de gösterilmektedir. Bant görüntüleri üzerinde yapılan dansitometrik analizlerden elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizleri sonucunda gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Ek olarak beyin dokusuna ait jel resimleri gözlemsel olarak karşılaştırıldığında hipoksinin DcR1 yem reseptörü mRNA ekspresyon seviyelerinde belirgin bir artışa neden olduğu görülmektedir.



Resim 7. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF10C geni (DcR1) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi'ye ait TNFRSF10C gen sekansı ise EK4'te sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait TNFRSF10C gen sekansının mevcut olmadığı görülmüş ve en yakın benzerliğin *Rattus norvegicus*'a ait Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 10b (DR5) ile olduğu bulunmuştur (NCBI Accession: FJ515907.1).

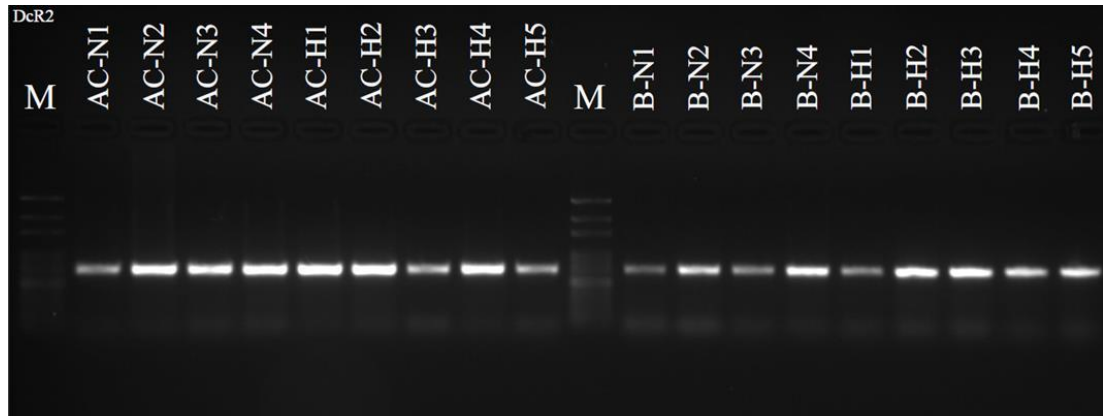
Nannospalax nehringi'ye ait TNFRSF10C geninin ifade ettiği aminoasit dizisi (DcR1) biyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde, NCBI veri tabanında *Homo sapiens* dışında, güvenilir ve benzer protein sekansına rastlanmadı. Üç tekrarlı sekans analizi yapılan *Nannospalax nehringi* TNFRSF10C geni verileri sonucu oluşturulan protein dizisi ile *Homo sapiens* DcR1 protein dizisi karşılaştırıldığında ise, 30'u sistein zengin alanda, 11'i de antibody-polipeptit bağlanma bölgesinde olmak üzere birçok aminoasit farklılaşmasının var olduğunu belirlenmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. TNFRSF10C genine (DcR1) ait aminoasit dizi hizalaması.

4.2.4. TNFRSF10D Geni (DcR2) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi

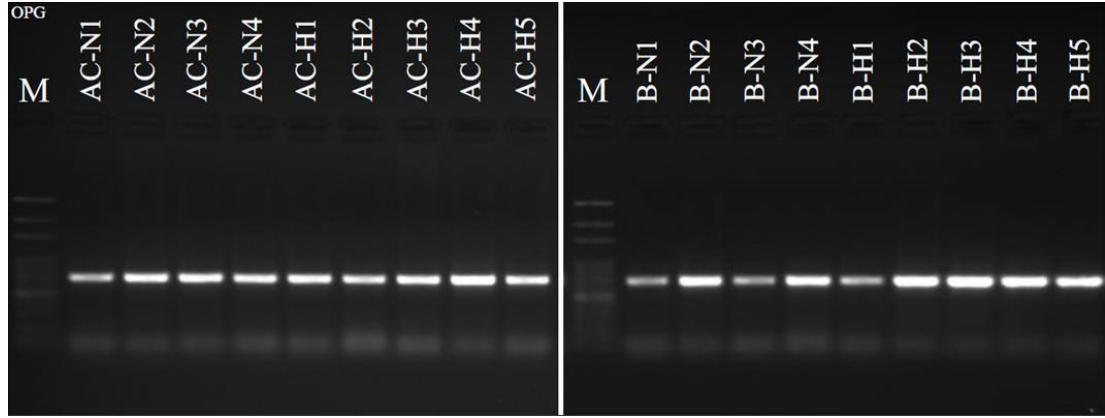
Akciğer ve beyin dokularından izole edilerek üretilen TNFRSF10D genine ait PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulması ile elde edilen bant görüntüleri Resim 8’de gösterilmektedir. Bant görüntüleri üzerinde yapılan dansitometrik analizlerden elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizleri sonucunda, gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Fakat jel resimleri gözlemsel olarak incelendiğinde, hipoksinin DcR2 yem resptörü mRNA ekspresyon seviyelerinde gözlemsel olarak bir artışa neden olduğu görülmüştür.



Resim 8. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF10D genini (DcR2) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi TNFRSF10D gen sekansı EK5’te sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait TNFRSF10D gen

gözlemsel olarak incelendiğinde, hipoksinin beyin dokusu OPG yem reseptörü mRNA seviyelerinde belirgin bir artışa neden olduğu görülmüştür.



Resim 9. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFRSF11B geni (OPG) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi TNFRSF11B gen sekansı EK6'da sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait TNFRSF11B gen sekansının mevcut olmadığı görülmüş ve en yakın benzerliğin *Rattus norvegicus*'a ait TNF receptor superfamily member 11B ile olduğu bulunmuştur (NCBI Accession: NM_012870.2).

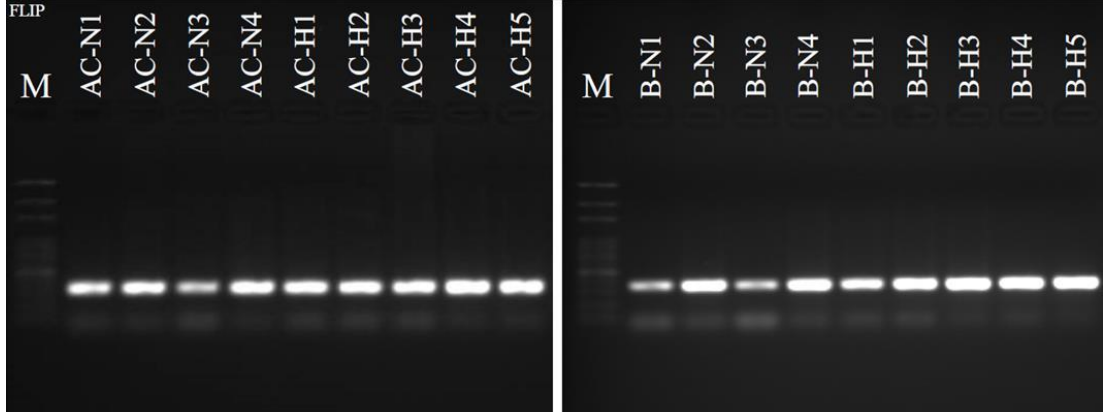
Nannospalax nehringi'ye ait TNFRSF11B geninin aminoasit dizisi (OPG) biyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde gene ait belirgin motifleri taşımakta olduğu görülmüştür. Üç tekrarlı sekans analizi yapılan OPG reseptörün sistein zengin alanlarının Şekil 17'de belirtilen türlerden farklı olarak sırasıyla Glisin (G), Glisin (G), Prolin (P) ve Arjinin (R) aminoasitlerini içerdiği görülmüştür. Farklılık arz eden aminoasitlerden birincisi olan Glisin'nin sistein zengin alan içerisinde diğer türlerden farklı olarak Sistein'e karşılık geldiği görülmüştür (Şekil 17).



Şekil 17. TNFRSF11B genine (OPG) ait aminoasit dizi hizalaması.

4.2.6. CFLAR Geni (FLIP) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi

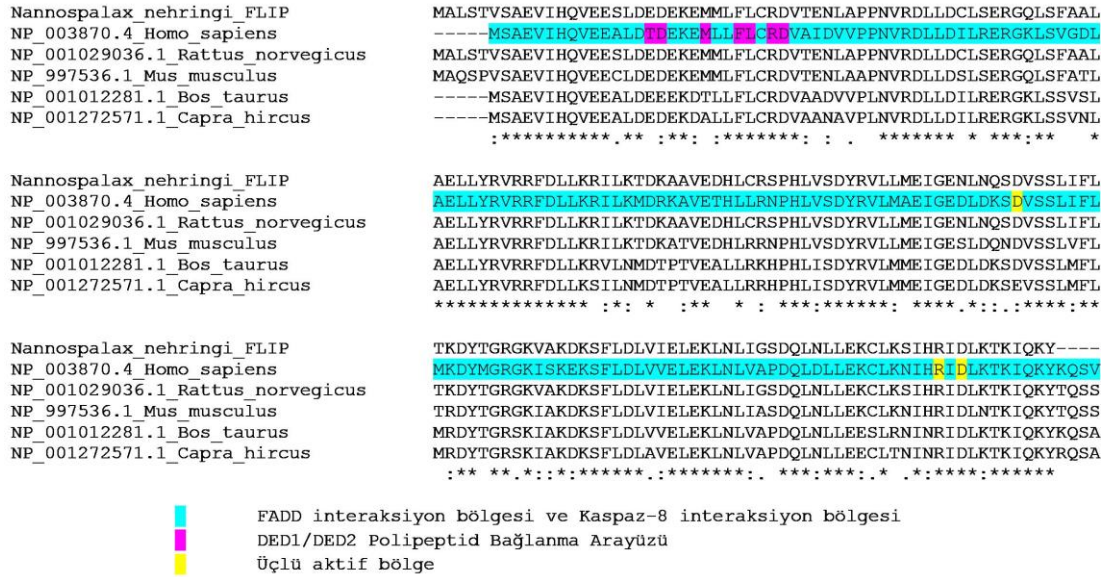
Akciğer ve beyin dokularından izole edilerek üretilen CFLAR genine ait PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulması ile elde edilen bant görüntüleri Resim 10'da gösterilmektedir. Yapılan dansitometrik analizlerden elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizleri sonucunda, gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Ancak jel görüntüsü gözlemsel olarak incelendiğinde, hipoksinin beyin dokusu FLIP proteini mRNA seviyesinde belirgin bir artışa neden olduğu görülmüştür.



Resim 10. Normoksi ve %7 hipoksi altında CFLAR geni (FLIP) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi'ye ait CFLAR gen sekansı EK7'de sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait CFLAR gen sekansının mevcut olmadığı görülmüş fakat büyük ölçüde *Rattus norvegicus*'a ait CASP8 and FADD-like Apoptosis Regulator ile benzer olduğu bulunmuştur (NCBI Accession: NM_001033864.2).

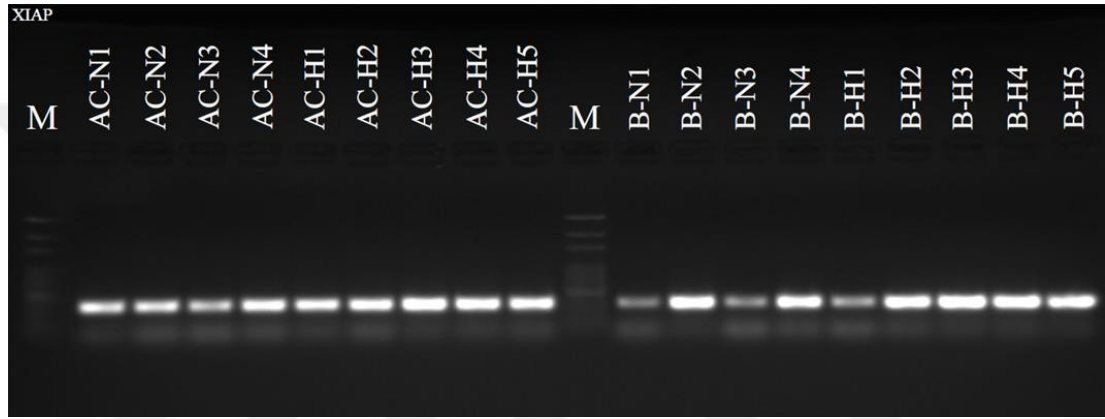
Nannospalax nehringi'ye ait CFLAR geninin ifade ettiği aminoasit dizisi (FLIP) biyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde Şekil 18'de verilen farklı taksonlardaki türlerden belirgin bir farklılık göstermediği belirlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. CFLAR genine (FLIP) ait aminoasit dizi hizalaması.

4.2.7. XIAP Geni mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi

Akciğer ve beyin dokularından izole edilerek üretilen XIAP genine ait PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulması ile elde edilen bant görüntüleri Resim 11’de gösterilmektedir. Jel görüntüleri üzerinde yapılan dansitometrik analizlerden elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizleri sonucunda, gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Bunun yanında jel resimleri gözlemsel olarak incelendiğinde, hipoksinin beyin dokusu XIAP proteini mRNA seviyelerinde belirgin bir artışa sebep olduğu görülmüştür.



Resim 11. Normoksi ve %7 hipoksi altında XIAP geni akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi'ye ait XIAP gen sekansı EK8’de sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait XIAP gen sekansının mevcut olmadığı görülmüş ve en yakın benzerliğin *Rattus norvegicus*'a ait X-linked inhibitor of apoptosis ile olduğu bulunmuştur (NCBI Accession: NM_022231.2).

Nannospalax nehringi'ye ait XIAP geninin ifade ettiği aminoasit dizisi biyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde, dizinin Şekil 19’da verilen türler ile büyük ölçüde benzerlik gösterdiği ve Zn^{+2} bağlanma bölgelerinin korunduğu görülmüştür. Fakat üç tekrarlı olarak yapılan sekans analizi sonucunda proteinin peptid bağlanma bölgelerinin farklılık gösterdiği ve ayrıca *Nannospalax nehringi*'de diğer türlerden ayrı olarak sırasıyla Glutamat (E) ve Glutamin (Q) aminoasitlerinin yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 19).

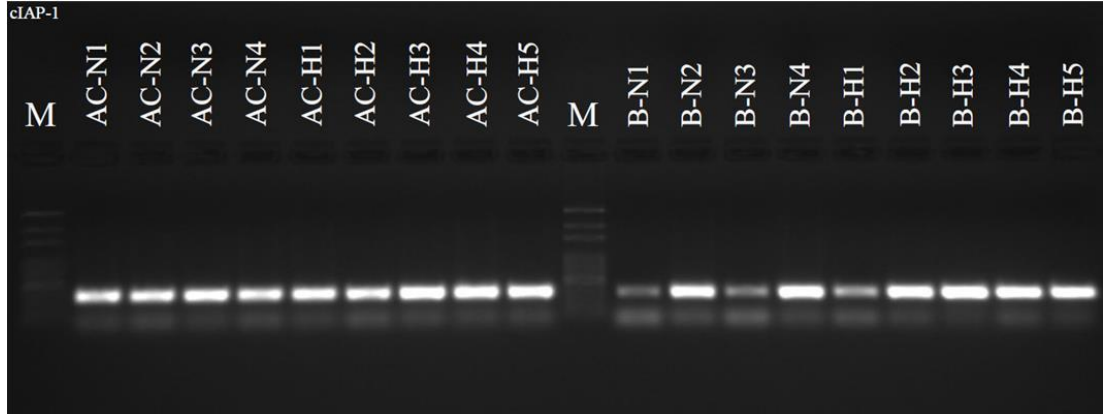
Nannospalax_nehringi_XIAP	MTFNSFEGSRTVVPADTNKDEEFVEEFNRLKTFANFPSSSPVSASTLARAGFLYTGGEG
NP_001158.2_Homo_sapiens	MTFNSFEGSKTCVPADINK--EEEFVEEFNRLKTFANFPSSSPVSASTLARAGFLYTGGEG
NP_071567.1_Rattus_norvegicus	MTFNSFEGSRTVVPADTNK--DEEFVEEFNRLKTFANFPSSSPVSASTLARAGFLYTGGEG
NP_001288568.1_Mus_musculus	MTFNSFEGTRTFVLADTNK--DEEFVEEFNRLKTFANFPSSSPVSASTLARAGFLYTGGEG
ACS66714.1_Cricetulus_griseus	MTFNSFEGSRTVVPADTNK--DEEFVEEFNRLKTFANFPSSSPVSASTLARAGFLYTGGEG
NP_001090905.1_Sus_scrofa	MTFNSFEGSKSCVPTDINK--DEEFVEEFNRLKTFANFPSSSPVSASTLARAGFLYTGGEG
NP_001192521.1_Bos_taurus	MTFNSFEGSKTCVPADIDK--DEEFVEEFNRLKTFANFPSSSPVSASTLARAGFLYTGGEG
NP_001271387.1_Canis_lupus	MTFNSFEGAKTCVPAGINK--DEEFVEEFNRLKTFANFPSSSPVSASTLARAGFLYTGGEG
	*****::: * .. :* :*****.*****
Nannospalax_nehringi_XIAP	DTVQCFSCHAAIDRWQYGD SAVGRHRRISPNCRFINGFYFENGAQSTNPGIQNGQYKSE
NP_001158.2_Homo_sapiens	DTVRCFSCHAAVDRWQYGS AVGRHRRISPNCRFINGFYFENGAQSTNPGIQNGQYKVE
NP_071567.1_Rattus_norvegicus	DTVQCFSCHAAVDRWQYGD SAVGRHRRISPNCRFINGFYFENGAQSTNPGIQNGQYKSE
NP_001288568.1_Mus_musculus	DTVQCFSCHAAIDRWQYGD SAVGRHRRISPNCRFINGFYFENGAQSTNPGIQNGQYKSE
ACS66714.1_Cricetulus_griseus	DTVQCFSCHAAVDRWQYGD SAVGRHRRISPNCRFINGFYFENGAQSTNPGIQNGQYKAE
NP_001090905.1_Sus_scrofa	DTVRCFSCHAAVDRWQYGD SAVGRHRRISPNCRFINGFYFENGAQSTNPGIQNGQYKAE
NP_001192521.1_Bos_taurus	DTVRCFSCHAAVDRWQYGD SAVGRHRRISPNCRFINGFYFENGAQSTNPGIQNGQYKAE
NP_001271387.1_Canis_lupus	DTVRCFSCHASIDRWQYGD SAVGRHRRISPNCRFINGFYFENGAQSTNPGIQNGQYNAE
	:**:::*****:***:*****:***:*****:***:*****:*
Nannospalax_nehringi_XIAP	NCVGNRN-----
NP_001158.2_Homo_sapiens	NYLGSRDHFALDRPSETHADYLLRTGQVVDISDTIYPRNPAMYSEEARLKSFQNWPDYAH
NP_071567.1_Rattus_norvegicus	NCVGNRNHFALDRPSETHADYLLRTGQVVDISDTIYPRNPAMYSEEARLKSFQNWPDYAH
NP_001288568.1_Mus_musculus	NCVGNRNPFADRPPEETHADYLLRTGQVVDISDTIYPRNPAMYSEEARLKSFQNWPDYAH
ACS66714.1_Cricetulus_griseus	NYVGNRNHFALDRPSETHADYLLRTGQVVDISDTIYPRNPAMYSEEARLKSFQNWPDYAH
NP_001090905.1_Sus_scrofa	NYLGNRNHFVLERPSETHADYLLRTGQVVDLSDTIYPRNPAMYSEEARLKSFQNWPDYAH
NP_001192521.1_Bos_taurus	NYLGNRNHFVLERPSETHADYLLRTGQVVDLSDTIYPRNPAMYSEEARLKSFQNWPDYAH
NM_001284458.1_Canis_lupus	NYLRNRDHFVLERPSETHADYLLRTGQVVDISDTIYPRNPAMYSEEARLKSFQNWPDYVH
	* : .:*

█ Peptit bağlanma bölgeleri
█ Zn⁺² iyon bağlanma bölgesi
█ Fosforilasyon bölgesi

Şekil 19. XIAP genine ait aminoasit dizi hizalaması.

4.2.8. BIRC2 Geni (cIAP-1) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi

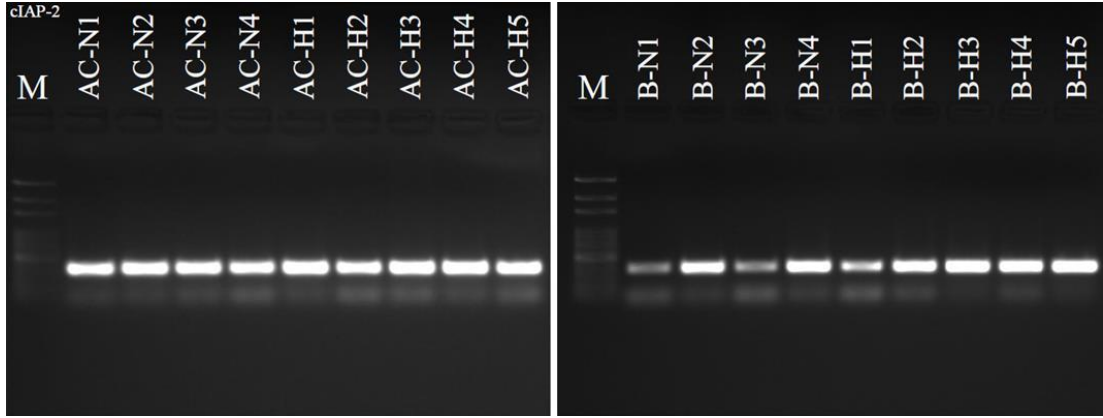
Akciğer ve beyin dokularından izole edilerek üretilen BIRC2 genine ait PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulması ile elde edilen bant görüntüleri Resim 12’de gösterilmektedir. Bant görüntüleri üzerinde yapılan dansitometrik analizlerden elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizleri sonucunda gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamakla birlikte, jel görüntüsünün gözlemsel olarak incelenmesiyle hipoksinin beyin dokusunda cIAP-1 proteini mRNA seviyesinde belirgin bir artışa neden olduğu görülmüştür.



Resim 12. Normoksi ve %7 hipoksi altında BIRC2 geni (cIAP-1) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi BIRC2 gen sekansı EK9'da sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait BIRC2 gen sekansının mevcut olmadığı görülmüş ve en yakın benzerliğin *Mus musculus*'a ait Inhibitor of Apoptosis Protein 1 ile olduğu bulunmuştur (NCBI Accession: U88908.1).

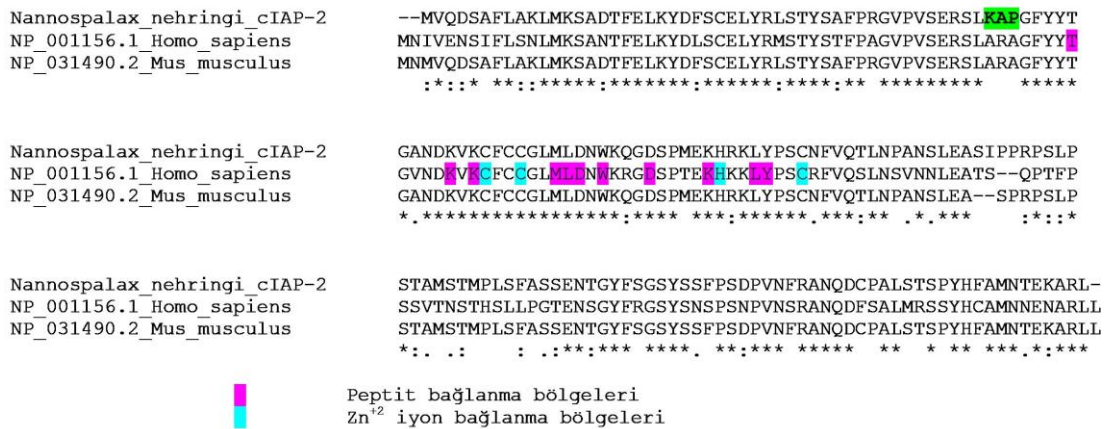
Nannospalax nehringi'ye ait BIRC2 geninin ifade ettiği aminoasit dizisi (cIAP-1) biyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde, cIAP-1 proteininin peptit ve Zn^{+2} iyon bağlanma bölgelerinin Şekil 20'de verilen türlerle büyük ölçüde ortak olduğu, fakat diğer türlerde sırasıyla Lizin (K) ve Lösin (L) aminoasitlerini içeren peptit bağlanma bölgelerine denk gelen dizilerin, farklı olarak İzölösin (I) aminoasitleri içerdiği görülmüştür (Şekil 20).



Resim 13. Normoksi ve %7 hipoksi altında BIRC3 geni (cIAP-2) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 volta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi BIRC3 gen sekansı EK10'da sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait BIRC3 gen sekansının mevcut olmadığı görülmüş ve en yakın benzerliğin *Mus musculus*'a ait Baculoviral IAP Repeat-Containing 3 ile olduğu bulunmuştur (NCBI Accession: NM_007464.3).

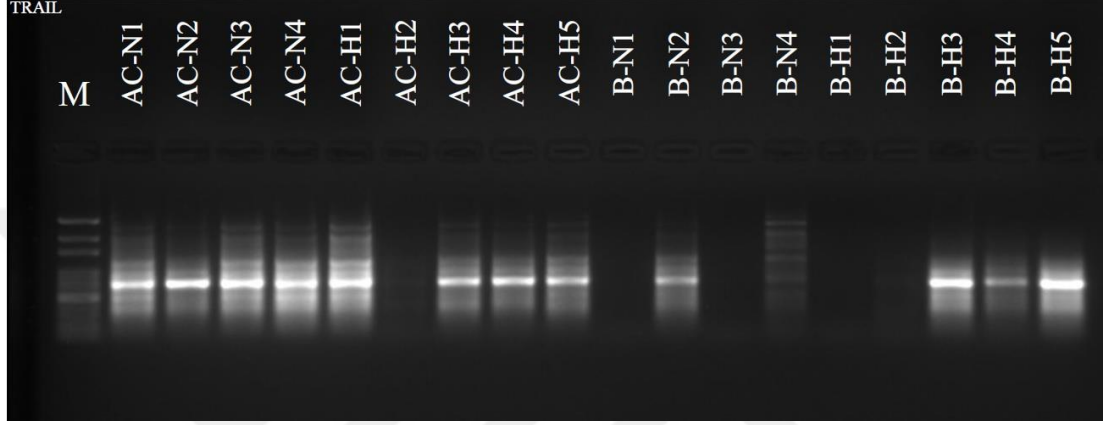
Nannospalax nehringi'ye ait BIRC3 geninin ifade ettiği aminoasit dizisi (cIAP-2) iyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde, proteine ait peptit ve Zn^{+2} iyon bağlanma bölgelerinin Şekil 21'de verilen türler ile ortak olarak korunduğu görülmüştür. *Nannospalax nehringi*'ye ait cIAP-2 proteininin aminoasit dizisi incelendiğinde, diğer türlerden farklı olarak sırasıyla Alanin (A), Arjinin (R) ve Alanin (A) olarak diziliş gösteren dizi bölgesinin, Lizin (K), Alanin (A) ve Pirolin (P) şeklinde sıralandığı belirlenmiştir (Şekil 21).



Şekil 21. BIRC3 genine (cIAP-2) ait aminoasit dizi hizalaması.

4.2.10. TNFSF10 Geni (TRAIL) mRNA Ekspresyonu ve Biyoinformatik Analizi

Akciğer ve beyin dokularından izole edilerek üretilen TNFSF10 genine ait PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulması ile elde edilen bant görüntüleri Resim 14'te gösterilmektedir. TRAIL bant görüntüleri üzerinde yapılan dansitometrik analizlerden elde edilen sayısal verilerin istatistiksel analizleri sonucunda gruplar arası anlamlı bir farka rastlanmamıştır.






Resim 14. Normoksi ve %7 hipoksi altında TNFSF10 geni (TRAIL) akciğer ve beyin mRNA düzeyleri. **AC:** Akciğer, **B:** Beyin, **N:** Normoksi, **H:** Hipoksi, **M:** 100bp marker. (%1 agaroz jelde 100 voltta 60 dakika koşturulmuştur).

Nannospalax nehringi TNFSF10 gen sekansı EK11'de sunulmuştur. Yapılan BLAST taramasında *Nannospalax nehringi* türüne ait TNFSF10 gen sekansının mevcut olmadığı görülmüş ve en yakın benzerliğin *Rattus norvegicus*'a ait TNF Superfamily Member 10 ile olduğu bulunmuştur (NCBI Accession: NM_145681.2).

Nannospalax nehringi'ye ait TNFSF10 geninin ifade ettiği aminoasit dizisi (TRAIL) biyoinformatik yöntemlerle incelendiğinde, ligandın Şekil 22'de verilen türler ile büyük ölçüde benzerlik gösterdiği ve reseptör bağlanma bölgeleri ile trimer arayüzlerinin tamamen korunmuş olduğu görülmüştür. Fakat *Nannospalax nehringi*'ye ait ligand dizisinin belirli bölgelerinin *Homo sapiens*'e kıyasla çeşitli farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Üç tekrarlı olarak yapılan sekans analizi sonucu, TRAIL aminoasit dizi içerisinde diğer türlerden farklı olarak *Nannospalax nehringi*'ye özgü Histidin (H) aminoasidinin yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 22).

Nannospalax nehringi TRAIL NP_003801.1_Homo_sapiens NP_663714.2_Rattus_norvegicus NP_033451.1_Mus_musculus NP_001019867.1_Sus_scrofa NP_001306830.1_Bos_taurus	MPSTGNLKGPSFSQHFTMTVICIVLLQVLLQALTVAVTYMYFNNEVKQLQDNYSKIGLAC MAMMEVQGGPSLGG---TCV LVIPTVLLQSLCVAVTYVYFTNELKQMQDKYSKSGIAC MPSTGNLKGPSFSQHFTMTVICIVLLQVLLQALTVAVTYMYFNNEVKQLQDNYSKIGLAC MPSSGALKDLSFSQHFRMMVICIVLLQVLLQAVSVAVTYMYFTNEMKQLQDNYSKIGLAC MAVMQTPGGPSPGQ---TCVLILLIPTVLLQALCVALTYYVFTNELKQMQDKYSKSGIAC MAL-KQAPGSRLGQ---ICMPILIFTVLLQAFGMAVFYMYFNKELKQMQNKYFKSGIAC * . * : *:: ***** : *: *:: ***** : *:: ***** : *:: *****
Nannospalax nehringi TRAIL NP_003801.1_Homo_sapiens NP_663714.2_Rattus_norvegicus NP_033451.1_Mus_musculus NP_001019867.1_Sus_scrofa NP_001306830.1_Bos_taurus	FSKEDGDFWDSSTDEGILNRPCLQKRLYQLIEEVTLRTEFTISTVPEKQLSTPPLPRG FLKEDDSYWDPNDEESMNSPCWQVKWQLRQLVRKMLRTSEETISTVQEKQONISPLVRE FSKEDGDFWDSSTDEGILNRPCLQKRLYQLIEEVTLRTEFTISTVPEKQLSTPPLPRG FSKTDDEDFWDSSTDEGILNRPCLQKRLYQLIEEVTLRTEFTISTVPEKQLSTPPLPRG FLKEDDSYWDPNDEESMNSPCWQVKWQLRQFVRKMLRTYEETISTVSEKQOGIPLHLERE FLEEDDRSWSRDEESIINPCWELKSKQLYLFVKKMTLRTEEMIPTNPEKQY-NPYLERE * : * ** * : ** : * ** : : : * ** : . * * ** *
Nannospalax nehringi TRAIL NP_003801.1_Homo_sapiens NP_663714.2_Rattus_norvegicus NP_033451.1_Mus_musculus NP_001019867.1_Sus_scrofa NP_001306830.1_Bos_taurus	RRPQRVAAHITGITRRSNLALIPISKDGKTLGQKIEWESSRRGHSFLNHVHLRNGELVI RGPQRVAAHITGITRRSNLSSPNSKNEKALGRKINSWESSRSRGSFLSNLHLRNGELVI RRPQRVAAHITGITRRSNLALIPISKDGKTLGQKIEWESSRRGHSFLNHVHLRNGELVI GRPQRVAAHITGITRRSNLALIPISKDGKTLGQKIESWESSRRGHSFLNHVHLRNGELVI KGPQRVAAHITGTSRKRSTFPSSLSSKYKALGQKINSWESSRRGHSFLNNHLRNGELVI KGPQRVAAHITGTSNRKSTLPVPGSKNEKAVGHKINSWESSRRGHSFLNNLYLRNGELVI * : * * * * : . ** * : * : * : * : * * * * * : : * * * * *
Nannospalax nehringi TRAIL NP_003801.1_Homo_sapiens NP_663714.2_Rattus_norvegicus NP_033451.1_Mus_musculus NP_001019867.1_Sus_scrofa NP_001306830.1_Bos_taurus	QEGLYYIYSQTYFRFKEAKEASKTVSKDG--GRIKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSA-R HEKGFY I I Y S Q T Y F R F Q E E I -----KENTKNDKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSA-R QEGLYYIYSQTYFRFKEAKEASKTVSKDG--GRIKQMVQYIYKYTSYPDPILLMKSA-R EQEGLYYIYSQTYFRFQEAEDASKMVSKDK--VRTKQLVQYIYKYTSYPDPILLMKSA-R HQTGFYYIYSQTYFRFQEPPEEILGTVSTEGNRKKNRQMIQYIYKWTSYDPDPILLMKSA-R LQTGFYYIYSQTYFRFQEPPEEVLGTVSTENRKKIKQMVQYIYKYTNYPDPILLMKSA-R : * : * * * * * : * : * . . : * : * * * * : * : * * * * * * * * *
Nannospalax nehringi TRAIL NP_003801.1_Homo_sapiens NP_663714.2_Rattus_norvegicus NP_033451.1_Mus_musculus NP_001019867.1_Sus_scrofa NP_001306830.1_Bos_taurus	NSCWSREAEYGLYSIYQGGLFELKENDRIFVSVTNEHLMDLQDEASFFGAFLLN NSCWSKDAEYGLYSI Y Q G G I F E L K E N D R I F V S V T N E H L I D M D H E A S F G A F L V G NSCWSREAEYGLYSIYQGGLFELKENDRIFVSVTNEHLMDLQDEASFFGAFLLN NSCWSRDAEYGLYSIYQGGLFELKENDRIFVSVTNEHLMDLQDEASFFGAFLLN NSCWSKDSEYGLYSIYQGGLFELKEDDRIFVSVTNEQLIDMDQDEASFFGAFLLG NSCWSKDSEYGLYSIYQGGLFELKENDRIFVSVTNERLVDLDQDEASFFGAFLLG : * * * * : : * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * *

 Transmembran bölge
 Trimer arayüzü (Trimerizasyon)
 Reseptör bağlanma bölgesi

Şekil 22. TNFSF10 genine (TRAIL) ait aminoasit dizi hizalaması.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Apoptozis, hem tek hücreli hem de çok hücreli canlılarda gözlenen, yok edilmek istenen veya yok edilmeye programlı hücrelerin, programlı bir biçimde ortadan kaldırılma/kalkma faaliyeti olup oldukça farklı ve girift basamaklar üzerinden şekillenmektedir (Gordeeva ve ark. 2004). Birbirinden oldukça farklı canlı taksonları arasında görülmesi ise apoptozisin, tek hücreli canlıların soy hatlarının korunmasında ve çok hücreli canlıların fizyolojik seyirlerinin devamının korunmasında ne denli önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Apoptozisin, çok hücreli canlıların gelişim süreçlerindeki rolü bir kenara bırakılırsa, canlıların organizasyon düzeylerinin artması ile bütünü parçalarının sorunsuz bir biçimde çalışıyor olması hayati önem taşımaktadır. Bu tür sorunları aşabilmek adına canlılar, birtakım içsel ve dışsal kontrol mekanizmaları kullanmaktadırlar. Kanser ise hücre düzeyinde kontrol ve apoptotik itaatin ne denli önemli olduğunu ortaya koyan en güzel örnektir. Kanser hücrelerinin en göze çarpan özelliği olan kontrolsüz üreme, denetim ve apoptotik emirlerden kaçma yetenekleri ile doğrudan ilişkilidir. Bu ilişki her ne kadar açık olsa da kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla apoptoza uğramaya daha eğilimlidirler (Koornstra ve ark. 2003, Pennarun ve ark. 2010). Bu sebeple kanserli hücrelerle başa çıkmak için birtakım sitotoksik ajanlar yardımıyla hücrelerin apoptozise sürüklenerek ortadan kaldırılması oldukça işlevsel bir yöntemdir. Ancak birtakım hücre içi hatalar bu işlergeleri bozabilmekte ve böylece apoptozise karşı direnç oluşmasını sağlamaktadır. Apoptotik dirençliliklerden ziyade, hedefe yönelik sitotoksik faaliyetlerin sağlıklı hücreleri etkileyebilmesi de ayrı bir dezavantajdır. Bu yönüyle ideal bir apoptotik yolak, seçici bir biçimde hedefe yönelik olmalı ve hücreler bazında gelişebilecek dirençlilikleri atlatabilecek sinyalizasyon basamaklarını kullanmalıdır. Apoptozisi indükleyebilen TNF üstfamilyası ligandların sistemik etkileri ise sağlıklı hücreler üzerinde oldukça sitotoksiktir. Bu ligandların sinyal akışları ise ileri evre insan kanserlerinin çoğunda mutant halde bulunduğundan kanser gelişimine katkı sağlayan p53'ün denetimi altındadır. TRAIL ise 2 işlevsel (DR4 ve DR5) ve 3 yem reseptör (DcR1, DcR2 ve OPG) olmak üzere toplamda 5 reseptöre bağlanabilen, TNF üstfamilyasına üye ligandlardan biridir ve p53 denetiminden bağımsız bir yolla apoptozisi indükleyebilmektedir (Şanlıoğlu 2011). TRAIL'in bağlanabildiği reseptörler diğer

TNF reseptörlerinden farklı olarak hem çok daha geniş doku yelpazesinde ifade edilmekte olup hem de mutant hücreler üzerinde oldukça seçicidir (Spierings ve ark. 2004). TRAIL reseptörü eksik geliştirilen farelerde lenf nodu metastazları geliştiği de bilinmektedir (Pennarun ve ark. 2010). Bu açıdan, TRAIL aracılı hücre ölümünün tetiklenmesi yoluyla kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması kanser tedavisi araştırmalarında umut vadeden bir stratejidir. Fakat kanser hücrelerinin sayıca artışı ile dokunun üç boyutlu yapısının derinliklerinde kalarak beslenme desteğini alamayan hücrelerde, TRAIL aracılı hücre ölümü üzerinde tartışmalı etkileri olan hipoksi stresini ortaya çıkmaktadır.

Hipoksi organizmada dokuların yeterli oksijen miktarından yoksun kalma durumu olarak tanımlanmakta olup, hücreler hipoksi aracılı olarak farklı transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi sonucu hipoksik çevreye adaptasyonlarını sağlamaktadırlar (Harris 2002). Türe göre değişmekle birlikte, birçok canlının hipoksiye maruz kalması sonucu dokularda hasarlar oluşmakta ve uzun süren şiddetli hipoksi şartları ölüme neden olmaktadır (Northington ve ark. 2001, Vaupel ve Mayer 2007). Söz konusu kanser hücreleri olduğunda ise bu şiddet, ilgili kanser hattı üzerinde neredeyse bir doğal seçim işlergesi görmekte ve hipoksiye daha dirençli mutant hatlarının hayatta kalmasını sağlayan görece bir avantaja dönüşmektedir. Solid tümörlerde anjiyogenetik malformasyon ve hatalar, tümör kütlelerinin üç boyutlu yapısı gereği, şiddetli hipoksinin yoğun olarak etki ettiği bölgelerin oluşmasına neden olur (Dong ve ark. 2003). Normal dokulara ulaşan oksijen yoğunluğu %5 civarındayken tümör dokularında bu oran %1'in altına kadar inebilmektedir (Harashima ve ark. 2017). Mutant hücrelerin bir tür seçilime maruz kaldığı bu bölgeler apoptotik direncin olduğu bölgelerdir. Bu bakımdan tümör büyümesinde hipoksi kilit bir rol üstlenmektedir (Harris 2002). Hipoksiye maruz kalan solid tümör hücrelerinin, kemoterapi ve radyoterapiye karşı dirençli oldukları da bilinmektedir (Park ve ark. 2002). TRAIL aracılı hücre ölümü de hipoksi aracılı olarak gelişebilen dirençliklerden bağımsız değildir. Ek olarak, her ne kadar TRAIL aracılı hücre ölümünün, transkripsiyon faktörü p53'ten bağımsız olarak apoptozisi indükleyebildiği biliniyor olsa da, bu işlengenin yürütülmesinin hipoksi ve p53 arasında kurulan hassas bir dengede olduğuna dair destekleyici veriler bulunmaktadır (Mayes ve ark. 2005). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında kısa vadede hipoksinin

çoğu canlı türü üzerindeki ölümcül etkileri daha anlaşılabilir olmaktadır. Fakat hipoksinin popülasyonlar üzerindeki doğal seçilimsel etkisi uzun vadede ele alınırsa, tıpkı kanser hücreleri üzerinde olduğu gibi, bu stresi barındıran habitatlarda yaşamaya adapte olmuş, hipoksinin ölümcül etkilerine karşı evrimsel kazanımlara sahip türlere rastlayabiliriz. Kör fareler ise bu evrimsel uyumun en iyi örneklerinden biridir. Habitatlarının kendilerini yaklaşık 30-40 milyon yıldan beri (Nevo ve ark. 1995) yeraltının şiddetli hipoksik koşullarınca test ettiği rodentlerden olan *Spalacidae* familyasına ait kör fareler, spontane kanser gelişimi göstermemelerinin yanında kimyasal ajanların dahi kanser oluşturmaya müsaade etmeyen 21 yıllık ömürleri ile diğer rodentlerden farklıdır (Ellis ve ark. 2016). Bu evrimsel yeteneklerinin yanında kör fareler birçok fizyolojik ve anti-kanser özellik barındırırlar (Avivi ve ark. 2006). Kör fareler p53'ün, ileri evre kanserlerde sıklıkla mutasyona uğrayan bölgesi olan (Gorbunova ve ark. 2012) 174. pozisyondaki Arjinin aminoasidi yerine Lizin aminoasidini içeren (Arg174Lys) bir formuna (sp53) sahiptirler (Ashur-Fabian ve ark. 2004). Bu özellikleri, hipoksiye karşı geliştirdikleri tüm fizyolojik ve morfolojik özelliklerinden farklı olarak anti-kanser yeteneklerini ön plana çıkarmakta ve bu canlıları kanser araştırmaları konusunda model organizma konumuna getirmektedir. sp53'ün, insanlardaki izoformuna kıyasla, apoptozis ilişkili transkripsiyon genlerinden olan Apaf-1, PTEN, Puma ve Noxa üzerindeki etkisinin az olduğu (Avivi ve ark. 2007) ve aynı zamanda kaspaz temelli hücre ölümünün yanında otofajiye de neden olduğu bilinmektedir (Ellis ve ark. 2016). Sahip oldukları anti-kanser özellikleri ile kanser gelişimine dayanıklılıkları ortaya konulan kör farelerin, kanser tedavilerinde umut vadeden TRAIL aracılı hücre ölümü doğaları henüz açığa çıkartılmamıştır. Kör farelerin sahip olduğu bu özellikler bir yana, TRAIL aracılı hücre ölümü üzerinde hipoksinin etkilerini anlamaya yönelik süregelen tartışmalar da diğer yana alınacak olursa kör fareler, hipoksinin TRAIL aracılı hücre ölümü üzerindeki etkilerini anlayabileceğimiz benzersiz organizmalardır.

TRAIL'in kanser tedavilerinde umut vadeden bir yol olması, birçok farklı rekombinant TRAIL ürününün ve TRAIL reseptör agonist antikollarının, apoptotik etkileri ve biyoaktivitelerinin araştırılmasını tetiklemiş olmakla birlikte, bunlardan bazılarının sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkiler gösterebildiği de

belirlenmektedir (Von Karstedt ve ark. 2017). Jo ve ark. (2000) rhTRAIL'ın (Rekombinant insan TRAIL proteini), farklı karsinom hücre kültürleri üzerinde apoptotik aktivasyonu sağlarken aynı zamanda sağlıklı insan hepatosit hücre kültürleri üzerinde de yüksek oranda sitotoksik etki gösterdiğini belirtmiştir. Lawrence ve ark. (2001) ise, ligand stabilitesini ve biyolojik aktiviteyi arttıran çinko içeriği yüksek farklı bir rekombinant TRAIL'in şebek ve insan hepatositleri üzerinde çok daha az sitotoksik etki gösterdiğini ve aynı zamanda hiçbir klinik görüntüde (Morfolojik, hematolojik, histolojik ve biyokimyasal) önemli bir değişikliğe yol açmadığını bildirmiştir. Ligandın çinko içeriğinin biyolojik aktivite ve stabilizasyon üzerinde bu denli önemli olmasının sebebinin; çinkonun ligandın tersiyer yapısı üzerinde etkili bir faktör olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (Mahalingam ve ark. 2009). Bu sebeple organizmada yan etki göstermeyen farklı TRAIL rekombinant ürünleri ve TRAIL işlevsel reseptörleri olan DR4 ve DR5'e bağlanarak apoptozisin indüklenmesini sağlayan farklı TRAIL-agonist antikorları da çeşitli klinik denemelerde kullanılmaktadır (Allen ve ark. 2015). Ek olarak, ATF4 transkripsiyon faktörü aracılı olarak, DR5 reseptörü dahil birçok apoptoz ilişkili geni düzenleyen bir diğer transkripsiyon faktörü CHOP'un uyarılması yoluyla işlev gören TIC10 (ONC201) kemoterapik ajanının, 2017 yılı içerisinde ilk faz-I klinik denemesi gönüllü hastalar üzerinde yapılmış ve herhangi bir toksikasyon belirtisinin görülmediği raporlanmıştır (Stein ve ark. 2017). Bu yönüyle TRAIL aracılı hücre ölümünü tetikleyebilecek, yan etki göstermeyen, biyoaktivitesi ve kararlılığı yüksek optimal ajan arayışları günümüzde de devam etmektedir. Yaptığımız literatür taramalarında hipoksinin TRAIL düzeylerinde yaptığı değişikliklere dair herhangi bir araştırmaya rastlayamadık. Yaptığımız bu çalışma ile ilk kez TRAIL mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri *Nannospalax nehringi*'de tespit etmiş olduk. Ayrıca, ilk kez hipoksi ve normoksi karşılaştırması yaparak bu uygulamaların TRAIL'in mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını belirlemiş olduk. Tüm bunların yanında, *Nannospalax nehringi*'ye ait TNFSF10 geninin kodlamış olduğu TRAIL proteinini biyoinformatik yöntemler ile inceledik ve bu proteinin NCBI veri tabanında kayıtlı olan *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Felis catus*, *Sus scrofa*, *Bos taurus* ve *Gallus gallus* türlerine ait TRAIL protein dizilerine oldukça benzer olduğunu, fakat tüm bu

türlerden farklı olarak bir Histidin (H) aminoasidi kodladığını tespit ettik. Bu aminoasit farklılığının biyolojik aktivite üzerindeki etkileri bundan sonraki yapılacak olan çalışmalar ile aydınlatılmaya muhtaç görünmektedir.

TRAIL'in benzersiz özelliklerinin yanında, çeşitli kanserlerde TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı gelişen direnç mekanizmaları, bu konuda aşılması gereken zorlukların başında gelmektedir. Hücre ölümü yolağında yer alan moleküllerden farklı olarak, ölüm bölgeleri içermeyen yem reseptörlerin varlığı da TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı direnç oluşturduğu düşünülen diğer bir önemli noktadır. TRAIL'in bağlanabildiği yem reseptörler (DcR1, DcR2 ve OPG) işlevsel reseptörlerden (DR4 ve DR5) farklı olarak, apoptotik sinyalleri hücre içerisine iletebilecek ölüm bölgelerinden yoksundurlar. Aynı zamanda yem reseptörleri ve işlevsel reseptörlerin hücre yüzeyindeki mevcudiyetleri dinamik bir durum içerisinde olup, hücrenin liganda (TRAIL) maruz kalmasıyla değişkenlik göstermektedir. Zhang ve ark. (2000) hücre yüzeyine ulaşan TRAIL moleküllerinin, DR4 reseptör ekspresyonuna önemli bir etki göstermezken DR5 reseptör ekspresyonunu azalttığı ve DcR1 ve DcR2 reseptörlerinin ekspresyonlarını arttırdığını ortaya koymuşlardır. Ölüm bölgelerinden yoksun olan yem reseptörler hücre yüzeyine ulaşan TRAIL ile bağlanabildiğinden ligand yoğunluğunu azaltıcı bir etki de göstermektedir. Aynı zamanda ölüm bölgelerinden yoksun olan yem reseptörler, anti-apoptotik tertipleri düzenleyebilen transkripsiyon faktörü NF- κ B'yi uyarırken bir taraftan da NF- κ B uyarısıyla TRAIL reseptör sayısını etkileyen karışık mekanizmaların parçası olarak da görülmektedir (Griffith ve Lynch 1998). Bu sebeple yem reseptörlerin aşırı ekspresyonları, farklı araştırmacılar arasında tartışmalı olmakla birlikte apoptotik dirençlilik nedenlerinden biri olarak ileri sürülmektedir (Mahalingam ve ark. 2009). Pei ve ark. (2010) beş farklı insan kolon kanseri hattının ifade ettiği TRAIL reseptör yoğunluklarını analiz etmiş ve bu hatların DcR2 reseptör ekspresyonlarının hipoksi altında arttığını, DR4, DR5 ve DcR1 protein ekspresyonları üzerine ise bir etki göstermediğini ortaya çıkartmışlardır. Aynı zamanda DcR2 reseptörü üzerindeki bu düzenlemenin HIF-1 α aracılı olarak gerçekleştiğini de ortaya koymuşlardır. Yaptığımız çalışma ile ilk kez *Nannospalax nehringi*'de akciğer ve beyin dokusunda hipoksi altında DcR1, DcR2 ve OPG mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri belirledik. Hipoksinin özellikle beyin dokusunda, DcR1, DcR2

ve OPG mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte gözlemsel bir artışa neden olduğunu gözlemledik. Biyoinformatik analizler sonucunda, NCBI veri tabanında *Homo sapiens* dışında, güvenilir ve benzer protein sekansına rastlanmaması sebebiyle *Nannospalax nehringi*'ye ait tespit ettiğimiz DcR1 yem reseptörü aminoasit dizisi yalnızca *Homo sapiens* ile karşılaştırılmış ve iki türün reseptörlerinin oldukça farklı aminoasit dizilişine sahip olduğunu belirledik. Ayrıca, DcR2 yem reseptörüne ait aminoasit dizisi NCBI veri tabanında kayıtlı olan *Homo sapiens* ve *Bos taurus* türleri ile karşılaştırıldı ve her iki türde ortak olan Antibody-Polipeptid bağlanma bölgelerinde, *Nannospalax nehringi* ile belirgin farklılıklara sahip oldukları belirlendi. TRAIL ligandını bağlayabilen diğer bir yem reseptör olan OPG reseptörünün NCBI veri tabanında kayıtlı *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Felis catus*, *Bos taurus* ve *Gallus gallus* türlerinden farklı olarak sistein zengin alanlarının dört farklı aminoaside sahip olduğunu gösterdik. Bu anlamda ilk defa *Nannospalax nehringi*'ye ait DcR1, DcR2 ve OPG yem reseptörlerinin biyoinformatik verisini literatüre kazandırmış olduk. Bununla birlikte *Nannospalax nehringi*'nin yem reseptörleri üzerinde meydana gelen bu farklılıkların biyolojik aktivitedeki olası etkileri hakkında yapılacak araştırmalara gereksinim duyulduğu açıktır. Buna dair, literatürde henüz bir araştırma sonucuna rastlanmamıştır.

Günümüze dek, TRAIL aracılı hücre ölümü üzerine hipoksinin etkilerinin aydınlatılması konusunda araştırmacılar tarafından birçok çalışma yapılmasına karşı, araştırmaların öznel koşullarının bir sonucu olarak değerlendirilebilecek sebeplerden dolayı bir konsensüs sağlanamamıştır. Park ve ark. (2002) 24 saat boyunca hipoksiye maruz bırakılan kanser hücre hatlarının (A549 İnsan akciğer karsinom hücreleri) TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı direnç geliştirdiklerini ve anti-apoptotik Bcl-2, Bcl-XL, cIAP-1, cIAP-2 ve XIAP gibi proteinleri arttırdığını ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada DR4 protein yoğunluğu değişmezken, DR5 protein yoğunluğunun hipoksiye maruz kalma süresi uzadığında arttığı da belirlenmiştir. Bunun aksine Weinmann ve ark. (2004) karsinom hücre hatlarında hipoksi altında TRAIL aracılı hücre ölümü oranının normoksik koşullardakinden farklı olmadığını ve Bcl-2 protein miktarının hipoksi altında upregülasyona uğramadığını göstermiştir. Bu zıt sonuçlar, hipoksi altında farklı hücre tiplerinin Bcl-2'yi farklı doğrultularda

düzenleyebilmeleri ve hipoksiyi takiben uygulanan TRAIL proteininin muamele sürelerindeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir (Park ve ark. 2002, Weinmann ve ark. 2004). Başka bir çalışma (Kim ve ark. 2004) HCT116 hücre hatlarının (İnsan kolon karsinom hücreleri), hipoksi altında TRAIL'in apoptotik etkilerine Bcl-2 miktarlarını arttırarak cevap verdiğini ve bu sayede hipoksi altında TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı apoptotik direnç oluşturduklarını ortaya koymuştur. Aynı çalışma, HCT116 hücre hatlarında Bax geninin susturulmasının (Bax(-/-)) normoksi koşullarında TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı güçlü bir direnç oluşturduğunu da göstermiştir. OSCC kanser hatlarında (Oral Squamous Cell Carcinoma) normoksi altında TRAIL uyarısına kırılma ile cevap veren Bid (tBid'e kırılması) ve upregülasyon ile cevap veren Bax'ın, hipoksi koşulları altında bu iki proteinin seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir (Nagaraj ve ark. 2007). Diğer taraftan hipoksiye maruz bırakılan ve TRAIL ile muamele edilen farklı kanser hücre hatlarının normoksi altındaki hücelere kıyasla, TRAIL'a karşı daha fazla duyarlılık gösterdikleri de bildirilmiştir (Gobbi ve ark. 2010). Özellikle TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı dirençli olan HeL ve U2OS hatlarının, normoksi altında düşük dozlarda TRAIL'a karşı apoptotik tepki vermezken, hipoksi altında oldukça güçlü tepki verdikleri gözlemlenmiştir. Hipoksinin TRAIL reseptör ekspresyonları üzerine ettikleri ile ilgili sonuçlar, farklı kanser hücre hatlarındaki TRAIL reseptörlerinin önemsiz değişimler gösterdiğini, bununla birlikte genel olarak hipoksinin reseptör ekspresyonu üzerinde bir etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır. Aynı araştırmada, hücrel hipoksi süreçlerinde rol alan Protein Kinaz C'nin epsilon izoformunun (PKC ϵ) mRNA miktarını azaltmak için kullanılan MG132 proteazom inhibitörünün hücreleri TRAIL aracılı hücre ölümüne duyarlı hale getirdiği de gösterilmiştir. TRAIL aracılı hücre ölümüne duyarlılığı azaltan PKC ϵ 'nin, HIF1- α aktivasyonu aracılığı ile downregülasyonunun normoksik koşullar altında hücre hatlarının TRAIL'a karşı duyarlı hale gelmelerini arttırdığı da belirtilmektedir. Normoksik koşullar altında yüksek derecede HIF-1 α ekspresyonu gösteren p53-null HCT116 kolon karsinoma hücre hatlarının, TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı aşırı duyarlılık gösterdikleri, hipoksik koşullarda ise TRAIL aracılı hücre ölümünden korundukları anlaşılmaktadır (Mayes ve ark. 2005). Harashima ve ark. 2017 karsinojenik hücre hatlarında HIF-1 α 'nın siRNA'lar aracılığıyla engellenmesinin DR5 reseptör

ekspresyonunda düşüş gerçekleştirdiğini bildirirken, bunun aksine Jeong ve ark. (2010) HIF-1 α inaktivasyonun TRAIL aracılı hücre ölümü oranının arttırdığını göstermiştir. Cao ve ark. (2006) kanser hücre hatlarından farklı olarak, insan hepatosit hücre hatlarının (HL-7702) hipoksi altında TRAIL aracılı hücre ölümüne daha duyarlı olduklarını ve ayrıca hipoksiye karşı DR5 reseptör mRNA ekspresyonlarını arttırarak cevap verdiklerini göstermiştir. Kemoterapi uygulamasının normal ve karsinom hücre hatlarında DR5 reseptör ekspresyonları üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Wu ve ark. (1997) p53 uyarıcı kemoterapik bir ajanın p53 mutant hücrelerde DR5 reseptör ekspresyonunu azalttığını bildirirken, Arts ve ark. (2004) ise kemoterapi uygulamasının yumurtalık karsinom hücrelerinde DR5 reseptör yoğunluğunu arttırdığını belirtmektedir. Reseptör yoğunluklarının farklı şekillerde etkilendiğini gösteren bu zıt sonuçların sebebinin kullanılan farklı kemoterapik ilaçların etki gösterdiği farklı sinyalizasyon yollarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bizim sonuçlarımız da, hipoksinin beyin dokusu DR4 ve DR5 mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte görsel olarak belirgin bir artışa neden olduğunu göstermektedir. Akciğer dokusunda ise hipoksinin DR4 ve DR5 mRNA ekspresyonlarında bir değişiklik oluşturmadığını tespit ettik. Yaptığımız biyoinformatik analizlerde ilk kez *Nannospalax nehringi*'ye ait DR4 reseptörünün sistein zengin alan, polipeptid-antibody bağlanma bölgeleri ve aminoasit zincirinin diğer bölgelerinde NCBI veri tabanında kayıtlı olan *Homo sapiens* ve *Macaca fascicularis* türlerinden farklı aminoasit dizilişine sahip olduğunu belirledik. Ayrıca yapılan biyoinformatik analizler sonucunda, *Nannospalax nehringi*'ye ait DR5 yem reseptörüne ait protein dizisinin, NCBI veri tabanında kayıtlı olan *Homo sapiens* ve *Mus musculus* türlerinden farklı olarak antibody-polipeptid bağlanma bölgesi, sistein zengin alan, transmembran bölgesi ve ölüm bölgelerinde aminoasit farklılıklarına sahip olduğunu belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlar bu türe ait DR4 ve DR5 reseptörlerinin aminoasit dizilişinin özgüllüğünü ortaya çıkarması açısından önemli olmakla birlikte, reseptörlerin biyolojik aktivitesinin araştırmaya muhtaç olduğunu düşünmekteyiz.

TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı direnç aynı zamanda NF- κ B'nin, anti-apoptotik etki gösteren FLIP (Kreuz ve ark. 2001) ve IAP (Mitsiades ve ark. 2002) proteinlerinin upregülasyonlarını sağlaması sonucu da şekillenebilmektedir.

Esasında, hücre içi proteolitik zimojen proteazlar olan kaspazların ön formu pro-kaspazların beklenmedik aktivasyonu hücrenin istenmeyen ölümü ile sonuçlanacağından, kaspazların kontrol altında tutulmaları büyük önem taşımaktadır. IAP'lar da hücreleri bu istenmeyen ölümlerden koruyan homeostatik unsurlardan biridir. Mantarlar, omurgalı ve omurgasız hayvanlar dahil birçok canlı türünde evrimsel olarak korunmuş homologları bulunan IAP'ların, farklı insan tümörlerinde arttığı belirlenmiştir (Dong ve ark. 2001). IAP'ların hücre içi protein miktarları ve mRNA seviyeleri arasında bir korelasyon görülmemekle birlikte (Posttranskripsiyonel bir düzenleme gösterdiği anlaşılmakla birlikte), hücre içi XIAP protein miktarı renal kanserlerde ve melanoma hücrelerinde yüksek düzeyde bulunurken merkezi sinir sistemi tümörlerinde daha düşük miktarlarda bulunmaktadır. Hücre içi cIAP-1 protein miktarları ise kolon kanserlerinde daha yüksek düzeylerde tanımlanırken melanoma hücrelerinde daha az düzeyde oldukları bulunmuştur (Tamm ve ark. 2000). Bu proteinlerin yüksek ekspresyonlarının farklı tümör hücre hatlarında TRAIL aracılı hücre ölümüne direnç oluşturduğundan yola çıkılarak, XIAP dahil diğer IAP ailesi proteinlerin downregülasyonu ile göğüs, kolon, pankreatik, servikal, melanom ve lösemide bu dirençliliğin kırılabilirdiği de bilinmektedir (Mahalingam ve ark. 2009). IAP ailesi proteinlerin ekspresyonları üzerinde aynı zamanda hipoksinin de etkili olduğu bilinmektedir. Dong ve ark. (2001) hipoksiye maruz bırakılan farklı hücre kültürlerinde cIAP-2 protein miktarının arttığını ve reoksijenasyon ile tekrar azaldığını gösterirken, diğer IAP üyeleri olan cIAP-1, XIAP ve pro-apoptotik Bax ile anti-apoptotik Bcl-2 protein miktarları üzerinde bir farklılık oluşmadığını göstermiştir. Aynı araştırmada dikkat çeken bir diğer nokta hücrelerin hipoksik koşullara uyumunu sağlayan transkripsiyon faktörü HIF-1 ile cIAP-2 arasında bir korelasyon gözlenmemiş olmasıdır. Fakat Harashima ve ark. (2017) cIAP-2 ekspresyonunun, HIF-1 α 'nın susturulmasıyla arttığını bununla birlikte HIF-2 α 'nın susturulması ile ise azaldığını göstermiştir. Bizim sonuçlarımız ise, hipoksinin kör fare beyin dokusu cIAP-2, cIAP-1 ve XIAP mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, gözlemsel olarak bir artışa neden olduğunu göstermektedir. Akciğer dokusunda ise hipoksinin cIAP-2, cIAP-1 ve XIAP mRNA seviyelerinde belirgin bir değişiklik oluşturmadığını gözlemledik. Diğer taraftan, yaptığımız biyoinformatik incelemede

NCBI veri tabanında kayıtlı olan *Homo sapiens*, *Mus musculus* ve *Xenopus tropicalis*'in cIAP-1 protein zincirlerinin peptit bağlanma bölgelerinde korunan Lizin (K) ve Lösin (L) aminoasitlerinin bulunduğu bölgede *Nannospalax nehringi*'de İzolösin (I) aminoasitlerinin bulunduğunu tespit ettik. *Nannospalax nehringi*'ye ait cIAP-2 aminoasit zinciri NCBI veri tabanında kayıtlı olan *Homo sapiens* ve *Mus musculus* ile karşılaştırıldığında bu türlerden farklı olarak Lizin (K), Alanin (A) ve Prolin (P) aminoasitlerini içerdiğini belirledik. *Nannospalax nehringi*'nin XIAP proteininin aminoasit zincirinin *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Cricetulus griseus*, *Bos taurus* ve *Canis lupus* türlerinden farklı olarak Glutamat (E) ve Glutamin (Q) aminoasitlerini içerdiğini belirledik. *Nannospalax nehringi*'ye ait anti-apoptotik IAP proteinleri üzerindeki bu aminoasit diziliş farklılıklarının hücre ölümü üzerindeki etkileri hakkında yapılacak araştırmaların; mitojenik çoğalmanın engellenmesi açısından değerli bir veri olabileceğini düşünmekteyiz.

FLIP ise (cFLIP) IAP ailesi proteinlerden farklı olarak Kaspaz-8'in negatif dominantı olarak TRAIL'in işlevsel reseptörlere bağlanması ile oluşan apoptotik şelaleyi engelleyen bir diğer unsurdur ve bazı kanser hatlarının FLIP aracılı olarak TRAIL aracılı hücre ölümünden kaçabildiği bilinmektedir (Day ve ark. 2008). Aynı zamanda FLIP'in hipoksi koşulları altındaki hücreleri apoptozdan koruduğu da bilinmektedir (Wang ve ark. 2005). Bu bakımdan FLIP downregülasyonunu sağlayan çeşitli kemoterapik ajanlar, hücrelerin TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı duyarlı hale gelmesini sağlamaktadırlar. Ayrıca yine NF- κ B aracılı olarak FLIP transkripsiyonu kontrol edilmekte olup, proteozomların inaktivasyonunu sağlayan ajanlar yardımıyla da NF- κ B baskılanarak birçok anti-apoptotik proteinle beraber FLIP'in de downregülasyona uğradığı bilinmektedir (Mahalingam ve ark. 2009). Yaptığımız çalışmada, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, hipoksi altında beyin dokusunda FLIP mRNA seviyelerinin normoksiye kıyasla artmış olduğunu bulduk. Ayrıca yapılan biyoinformatik analizler sonucunda, *Nannospalax nehringi*'ye ait FLIP proteininin NCBI veritabanından elde edilen farklı türlerdeki homolog FLIP proteinleri ile neredeyse aynı olduğunu ve spesifik olarak aminoasit farklılığı göstermediğini gördük.

Sonuç olarak, tümör dokularında yapılan patolojik ve histolojik değerlendirmeler, spesifik işlev gören mutasyonların etkileyebildiği yolların genetik ve epigenetik sonuçlarını kestirememekte ve bu sebeple tedavi stratejilerinin hedefe yönelik olmaktansa çoğunluğa yönelik olmasına neden olmaktadır. Bu yönüyle, mutant hücrelerin genetik düzeyde karakteristik özelliklerinin değerlendirilmesi ve hattın çoğunluğuna yönelik kemoterapik tedaviler uygulanırken aynı zamanda hedefe yönelik tamamlayıcı yöntemler ile birlikte sunulması önem taşımaktadır. Kanserli hücrelerin TRAIL aracılı hücre ölümüne sürüklenerek ortadan kaldırılması ise pek çok araştırmacının ilgisini çekmekte fakat farklı etmenler aracılığıyla gelişebilen dirençlilik mekanizmaları ile birçok soru işaretini de beraberinde getirmektedir. TRAIL'in pek çok araştırmacı tarafından bu denli üzerinde durulmasının sebebi elbette, TRAIL'in etkili ve kontrollü bir kemoterapik ajan adayı olarak görülmesinin yanında henüz tam olarak anlaşılamayan bu doğasının merak uyandıran özelliklerini keşfetme güdüsüdür. Farklı araştırmacıların çeşitli tümörlerde TRAIL ve reseptörlerinin yoğunluklarını ortaya çıkarmaya yönelik araştırmaları, farklı sonuçlar ortaya koyuyor olsa da, ilgili kanser hatlarının sahip oldukları mutasyon karakterleri göz önüne alınmadığından yalnızca genel bir profil sunabilmektedir. Tümörlerin kaçınılmaz kaderi olan hipoksi ise hücrelerde farklı mutasyonların birikmesine yol açabilen önemli bir unsurdur. Bu bağlamda, hipoksiye karşı dirençli canlılarda hipoksinin TRAIL aracılı hücre ölümü üzerindeki etkilerini ve evrimsel kazanımlarını takip etmek, söz konusu dirençliklerin üstesinden gelmek için farklı bir bakış açısı kazandıracaktır. Bu amaçla, yaptığımız bu çalışma ile ilk defa, *Nannospalax nehringi*'de TRAIL ve bağlandığı işlevsel (DR4 ve DR5) ve yem reseptörlerin (DcR1, DcR2 ve OPG) ve ayrıca TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı direnç oluşturabilen anti-apoptotik IAP ailesi proteinler (cIAP-1, cIAP-2 ve XIAP) ile FLIP proteininin hipoksi ve normoksi altındaki mRNA miktarlarını belirleyip, biyoinformatik araçlar yardımıyla da bu proteinlerin aminoasit dizilerinin bir kıyaslamasını sunarak bilimsel literatüre katkı sağlamış olduk. Aynı zamanda bu araştırmanın, incelenen proteinlerin fizyolojik ve biyolojik işlevleri hakkında yapılacak yeni araştırmalara bir ön değerlendirme sunmuş olduğunu ve belki de mitojenik aktivite ile apoptotik aktivite arasındaki dengenin değerlendirilmesi açısından bir basamak olabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN: Human Tumor Necrosis Factor. Production, Purification, and Characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 260(4):2345–2354, 1985.
2. Aggarwal BB: Signalling Pathways of the TNF Superfamily: a Double-edged Sword. *Nature Reviews Immunology*, 3(9):745–756, 2003.
3. Allen JE, Krigsfeld G, Patel L, Mayes PA, Dicker DT, Wu GS, El-Deiry WS: Identification of TRAIL-inducing Compounds Highlights Small Molecule ONC201/TIC10 as a Unique Anti-cancer Agent that Activates the TRAIL Pathway. *Molecular Cancer*, 14(1):99, 2015.
4. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM: The Role of p53 in Apoptosis. *Discovery Medicine*, 9(45):145–152, 2010.
5. Ar A, Arieli R, Shkolnik A: Blood-gas Properties and Function in the Fossorial Mole Rat Under Normal and Hypoxic-Hypercapnic Atmospheric Conditions. *Respiration Physiology*, 30(1-2):201–218, 1977.
6. Arieli R, Heth G, Nevo E, Hoch D: Hematocrit and Hemoglobin Concentration in Four Chromosomal Species and Some Isolated Populations of Actively Speciating Subterranean Mole Rats in Israel. *Experientia*, 42(4):441–443, 1986.
7. Arts HJG, De Jong S, Hollema H, Ten Hoor K, van der Zee AGJ, De Vries EGE: Chemotherapy Induces Death Receptor 5 in Epithelial Ovarian Carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 92(3):794–800, 2004.
8. Ashkenazi A ve Dixit VM: Apoptosis Control by Death and Decoy Receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2):255–260, 1999.
9. Ashur-Fabian O, Avivi A, Trakhtenbrot L, Adamsky K, Cohen M, Kajakaro G, Joel A, Amariglio N, Nevo E, Rechavi G: Evolution of p53 in Hypoxia-stressed *Spalax* Mimics Human Tumor Mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33):12236–12241, 2004.
10. Attardi LD, Lowe SW, Brugarolas J, Jacks T: Transcriptional Activation by p53, but not Induction of the p21 Gene, is Essential for Oncogene-mediated Apoptosis. *The EMBO Journal*, 15(14):3693, 1996.
11. Avivi A, Resnick MB, Nevo E, Joel A, Levy AP: Adaptive Hypoxic Tolerance in the Subterranean Mole Rat *Spalax ehrenbergi*: the role of Vascular Endothelial Growth Factor. *FEBS Letters*, 452(3):133–140, 1999.

12. Avivi A, Ashur-Fabian O, Amariglio N, Nevo E, Rechavi G: p53: A Key Player in Tumoral and Evolutionary Adaptation: A Lesson from the Israeli Blind Subterranean Mole Rat. *Cell Cycle*, 4(3):368–372, 2005a.
13. Avivi A, Shams I, Joel A, Lache O, Levy AP, Nevo E: Increased Blood Vessel Density Provides the Mole Rat Physiological Tolerance to its Hypoxic Subterranean Habitat. *The FASEB Journal*, 19(10):1314–1316, 2005b.
14. Avivi A, Brodsky L, Nevo E, Band MR: Differential Expression Profiling of the Blind Subterranean Mole Rat *Spalax ehrenbergi* Superspecies: Bioprospecting for Hypoxia Tolerance. *Physiol Genomics*, 27(1):54–64, 2006.
15. Avivi A, Ashur-Fabian O, Joel A, Trakhtenbrot L, Adamsky K, Goldstein I, Amariglio N, Rechavi G, Nevo E: P53 in Blind Subterranean Mole Rats Loss of Function Versus Gain of Function Activities on Newly Cloned *Spalax* Target Genes. *Oncogene*, 26(17):2507–2512, 2007.
16. Avivi A, Gerlach F, Joel A, Reuss S, Burmester T, Nevo E, Hankeln T: Neuroglobin, Cytoglobin, and Myoglobin Contribute to Hypoxia Adaptation of the Subterranean Mole Rat *Spalax*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50):21570–21575, 2010.
17. Aydın C, Şanlıoğlu AD, Karaçay B, Özbilim G, Dertsiz L, Özbudak O, Akdiş CA, Şanlıoğlu S: Decoy Receptor-2 Small Interfering RNA (siRNA) Strategy Employing Three Different siRNA Constructs in Combination Defeats Adenovirus-Transferred Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand Resistance in Lung Cancer Cells. *Human gene therapy*, 18(1):39–50, 2007.
18. Ben-Shlomo R, Nevo E, Ritte U, Steinlechner S, Klante G: 6-Sulphatoxymelatonin Secretion in Different Locomotor Activity Types of the Blind Mole Rat *Spalax ehrenbergi*. *Journal of Pineal Research*, 21(4):243–250, 1996.
19. Bernard D, Quatannens B, Vandebunder B, Abbadie C: Rel/NF- κ B Transcription Factors Protect Against Tumor Necrosis Factor (TNF)-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) Induced Apoptosis by Up-regulating the TRAIL Decoy Receptor DcR1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29):27322–27328, 2001.
20. Beurel E, Jope RS: The Paradoxical Pro-and Anti-apoptotic Actions of GSK3 in the Intrinsic and Extrinsic Apoptosis Signaling Pathways. *Progress in Neurobiology*, 79(4):173–189, 2006.

21. Bin L, Thorburn J, Thomas LR, Clark PE, Humphreys R, Thorburn A: Tumor-derived Mutations in the TRAIL Receptor DR5 Inhibit TRAIL Signaling Through the DR4 Receptor by Competing for Ligand Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38):28189–28194, 2007.
22. Bonavida B, Ng CP, Jazirehi A, Schiller G, Mizutani Y: Selectivity of TRAIL Mediated Apoptosis of Cancer Cells and Synergy with Drugs: the trail to Non-toxic Cancer Therapeutics. *International Journal of Oncology*, 15(4):793–1595, 1999.
23. Cao L, Li Y, Cheng F, Li S, Long D: Hypoxia/reoxygenation Up-regulated the Expression of Death Receptor 5 and Enhanced Apoptosis in Human Hepatocyte Line. In: *Transplantation Proceedings*. Vol 38. Elsevier, 2207–2209, 2006.
24. Carswell EA, Old LJ, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B: An Endotoxin-induced Serum Factor that Causes Necrosis of Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(9):3666–3670, 1975.
25. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR: The BCL-2 family Reunion. *Molecular cell*, 37(3):299–310, 2010.
26. Corn PG, El-Deiry WS: Derangement of Growth and Differentiation Control in Oncogenesis. *Bioessays*, 24(1):83–90, 2002.
27. Coşkun G ve Özgür H: Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 2011.
28. Coşkun Y ve Ulutürk S: Türkiye *Spalax ehrenbergi* (Spalacidae: Rodentia) Türünün Taksonomisi, Dağılışı ve Karyolojisi. TÜBİTAK Project No: TBAG2097 Project Report, 2004.
29. Cregan SP, Dawson VL, Slack RS: Role of AIF in Caspase-dependent and Caspase-independent Cell Death. *Oncogene*, 23(16):2785–2796, 2004.
30. Crottès D, Rapetti-Mauss R, Alcaraz-Perez F, Tichet M, Gariano G, Martial S, Guizouarn H, Pellissier B, Loubat A, Popa A: SIGMAR1 Regulates Membrane Electrical Activity in Response to Extracellular Matrix Stimulation to Drive Cancer Cell Invasiveness. *Cancer Research*, 76(3):607–618, 2016.
31. Çefle K: Kanser Genetiği. *Klinik Gelişim Dergisi, Klinik Fizyopatoloji*, 22(3):50-59, 2009.
32. Das D, Persaud L, Dejoie J, Happy M, Brannigan O, De Jesus D, Sauane M: Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) Activates Caspases in Human Prostate Cancer Cells Through Sigma 1 Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470(2):319–323, 2016.

33. Day TW, Huang S, Safa AR: c-FLIP Knockdown Induces Ligand-independent DR5-, FADD-, Caspase-8-, and Caspase-9-dependent Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Biochemical Pharmacology*, 76(12):1694–1704, 2008.
34. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P: Mice Lacking p21CIP1/WAF1 undergo Normal Development, but are Defective in G1 Checkpoint Control. *Cell*, 82(4):675–684, 1995.
35. Deponte M: Programmed Cell Death in Protists. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(7):1396–1405, 2008.
36. Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J, Patel Y, Saikumar P, Semenza GL, Force T, Nishiyama J: Up-regulation of Apoptosis Inhibitory Protein IAP-2 by Hypoxia Hif-1-Independent Mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22):18702–18709, 2001.
37. Dong Z, Wang JZ, Yu F, Venkatachalam MA: Apoptosis-resistance of Hypoxic Cells: Multiple Factors Involved and a Role for IAP-2. *The American Journal of Pathology*, 163(2):663–671, 2003.
38. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü): Dünya Kanser Raporu 2008 Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu, Lyon, s.194, 2008.
39. Duiker EW, Mom CH, De Jong S, Willemse PHB, Gietema JA, van der Zee AGJ, De Vries EGE: The Clinical Trail of TRAIL. *European Journal of Cancer*, 42(14):2233–2240, 2006.
40. Dunaway PB ve Lewis LL: Taxonomic Relation of Erythrocyte Count, Mean Corpuscular Volume and Body-Weight in Mammals. *Nature*, 205(4970):481–484, 1965.
41. Ellis M, Stern O, Ashur-Fabian O: The double benefit of *Spalax* p53: Surviving Underground Hypoxia While Defying Lung Cancer Cells in Vitro via Autophagy and Caspase-dependent Cell Death. *Oncotarget*, 7(39):63242-63251, 2016.
42. Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H: TRAIL Signalling: Decisions Between Life and Death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(7):1462–1475, 2007.
43. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 Proto-oncogene Can Act as a Suppressor of Transformation. *Cell*, 57(7):1083–1093, 1989.
44. Fridman JS ve Lowe SW: Control of Apoptosis by p53. *Oncogene*, 22(56):9030–9040, 2003.
45. Futuyma D: Evrim, (Eds): Kence A, Bozcuk N, Palme Yayıncılık, Ankara, s.166, 2008.
46. Gabriel J: *The Biology of Cancer*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, s.39, 2007.

47. Gasco M, Shami S, Crook T: The p53 Pathway in Breast Cancer. *Breast Cancer Research*, 4(2):70, 2002.
48. Gaur U, Aggarwal BB: Regulation of Proliferation, Survival and Apoptosis by Members of the TNF Superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 66(8):1403–1408, 2003.
49. Gobbi G, Masselli E, Micheloni C, Nouvenne A, Russo D, Santi P, Matteucci A, Cocco L, Vitale M, Mirandola P: Hypoxia-induced Down-modulation of PKC ϵ Promotes TRAIL-Mediated Apoptosis of Tumor Cells. *International Journal of Oncology*, 37(3):719–729, 2010.
50. Gorbunova V, Hine C, Tian X, Ablaeva J, Gudkov AV, Nevo E, Seluanov A: Cancer Resistance in the Blind Mole rat is Mediated by Concerted Necrotic Cell Death Mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47):19392–19396, 2012.
51. Gordeeva AV, Labas YA, Zvyagilskaya RA: Apoptosis in Unicellular Organisms: Mechanisms and Evolution. *Biochemistry (Moscow)*, 69(10):1055–1066, 2004.
52. Goswami S ve Sharma-Walia N: Osteoprotegerin Rich Tumor Microenvironment: Implications in Breast Cancer. *Oncotarget*, 7(27):42777, 2016.
53. Green DR ve Reed JC: Mitochondria and Apoptosis. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*, 281(5381):1309–1311, 1998.
54. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC: Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Research*, 54(18):4855–4878, 1994.
55. Griffith TS ve Lynch DH: TRAIL: a Molecule with Multiple Receptors and Control Mechanisms. *Current Opinion in Immunology*, 10(5):559–563, 1998.
56. Guyton A ve Hall J: *Tıbbi Fizyoloji*. (Eds): Yeğen BÇ, Alican İ, Solakoğlu Z, 13. basım, Güneş Tıp Kitabevi, 2017.
57. Hamzaoğlu O, etiler N, Yavuz CI, Çağlayan Ç: The Causes of Deaths in an Industry-dense Area: Example of Dilovası (Kocaeli). *Turkish Journal of Medical Sciences*, 41(3):369–375, 2011.
58. Hamzaoğlu O, Yavuz M, Turker G, Savli H: Air Pollution and Heavy Metal Concentration in Colostrum and Meconium in Two Different Districts of an Industrial City: A Preliminary Report. *International Medical Journal*, 21(1):77–82, 2014.
59. Hanahan D ve Weinberg RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1):57–70, 2000.

60. Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, Roesner A, Schmidt M, Weich B, Wystub S: Neuroglobin and Cytoglobin in Search of Their Role in the Vertebrate Globin Family. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(1):110–119, 2005.
61. Haplo L, Strasser A, Cory S: BH3-only Proteins in Apoptosis at a Glance. *J Cell Sci*, 125(5):1081–1087, 2012.
62. Harashima N, Takenaga K, Akimoto M, Harada M: HIF-2 α Dictates the Susceptibility of Pancreatic Cancer Cells to TRAIL by Regulating Survivin Expression. *Oncotarget*, 8(26):42887, 2017.
63. Haridas V, Darnay BG, Natarajan K, Heller R, Aggarwal BB: Overexpression of the p80 TNF Receptor Leads to TNF-dependent Apoptosis, Nuclear Factor- κ B Activation, and c-Jun Kinase Activation. *The Journal of Immunology*, 160(7):3152–3162, 1998.
64. Harris AL: Hypoxia-a Key Regulatory Factor in Tumour Growth. *Nature Reviews Cancer*, 2(1):38–47, 2002.
65. Harris CC: Structure and Function of the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 88(20):1442–1455, 1996.
66. Havel L ve Durzan DJ: Apoptosis in Plants. *Plant Biology*, 109(4):268–277, 1996.
67. Hesketh R: *The Oncogene and Tumor Suppressor Gene*, 2nd ed. Academic Press, California, s.320, 1997a.
68. Hesketh R: *The Oncogene and Tumor Suppressor Gene*, 2nd ed. Academic Press, California, s.287, 1997b.
69. Hesketh R: *The Oncogene and Tumor Suppressor Gene*, 2nd ed. Academic Press, California, s.128, 1997c.
70. Holland RAB ve Forster RE: The Effect of Size of Red Cells on the Kinetics of Their Oxygen Uptake. *The Journal of General Physiology*, 49(4):727–742, 1966.
71. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> Erişim Tarihi: 10 şubat 2017.
72. <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/781> Erişim Tarihi: 08 Aralık 2017.
73. <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/782> Erişim Tarihi: 18 Temmuz 2017.
74. <http://www.nytimes.com/2010/12/28/health/28cancer.html> Erişim tarihi: 01 Ocak 2017.
75. http://www.tuik.gov.tr/basinOdasi/haberler/2016_41_20160331.pdf Erişim Tarihi 09 Aralık 2017.
76. <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm> Erişim Tarihi: 23 Ocak 2017.

77. Iurlaro R ve Muñoz-Pinedo C: Cell Death Induced by Endoplasmic Reticulum Stress. *The FEBS Journal*, 283(14):2640–2652, 2016.
78. Jeong JK, Moon MH, Seo JS, Seol JW, Park SY, Lee YJ: Hypoxia Inducing Factor-1 α Regulates Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand Sensitivity in Tumor Cells Exposed to Hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(3):379–383, 2010.
79. Jo M, Kim T-H, Seol D-W, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC: Apoptosis Induced in Normal Human Hepatocytes by Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand. *Nature medicine*, 6(5):564–567, 2000.
80. Karnkowska A, Vacek V, Zubáčová Z, Treitli SC, Petrželková R, Eme L, Novák L, Žárský V, Barlow LD, Herman EK: A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle. *Current Biology*, 26(10):1274–1284, 2016.
81. Keinan N, Tyomkin D, Shoshan-Barmatz V: Oligomerization of the Mitochondrial Protein Voltage-dependent Anion Channel is Coupled to the Induction of Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 30(24):5698–5709, 2010.
82. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239, 1972.
83. Kim M, Park SY, Pai HS, Kim TH, Billiar TR, Seol DW: Hypoxia Inhibits Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis by Blocking Bax Translocation. *Cancer Research*, 64(12):4078–4081, 2004.
84. Kimberley FC ve Screaton GR: Following a TRAIL: Update on a Ligand and Its Five Receptors. *Cell Research*, 14(5):359–372, 2004.
85. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD: The Release of Cytochrome c from Mitochondria: a Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science*, 275(5303):1132–1136, 1997.
86. Knudson AG: Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4):820–823, 1971.
87. Koçak N, Yıldırım İH, Yıldırım SC: p53 ve p53 Gen Ailesi Üyeleri Olan p63 ve p73'ün Hücresel İşlevleri. *Dicle Medical Journal/Dicle Tıp Dergisi*, 38(4), 2011.
88. Koornstra JJ, Kleibeuker JH, van Geelen CM, Rijcken FE, Hollema H, de Vries EG, de Jong S: Expression of TRAIL (TNF-related Apoptosis-inducing ligand) and Its Receptors in Normal Colonic Mucosa, Adenomas, and Carcinomas. *The Journal of Pathology*, 200(3):327–335, 2003.

89. Koyutürk LC: Apoptoz ve Yaşlanma. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, 3(1):129-131, 2004.
90. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN: Life and Death in Peripheral T Cells. *Nature Reviews Immunology*, 7(7):532–542, 2007.
91. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H: NF- κ B Inducers Upregulate cFLIP, a Cycloheximide-sensitive Inhibitor of Death Receptor Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 21(12):3964–3973, 2001.
92. Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A: Differential Hepatocyte Toxicity of Recombinant Apo2L/TRAIL Versions. *Nat Med*, 7(4):383-385. doi:10.1038/86397, 2001.
93. Lee J-M, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA: Nrf2, a Multi-organ Protector? *The FASEB Journal*, 19(9):1061–1066, 2005.
94. Levine AJ: p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 88(3):323–331, 1997.
95. Lin WW ve Hsieh SL: Decoy Receptor 3: A Pleiotropic Immunomodulator and Biomarker for Inflammatory Diseases, Autoimmune Diseases and Cancer. *Biochemical Pharmacology*, 81(7):838–847, 2011.
96. Lluís JM, Morales A, Blasco C, Colell A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC: Critical Role of Mitochondrial Glutathione in the Survival of Hepatocytes During Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5):3224–3232, 2005.
97. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ: The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell*, 104(4):487–501, 2001.
98. Loeb LA, Bielas JH, Beckman RA: Cancers Exhibit a Mutator Phenotype: Clinical Implications. *Cancer Research*, 68(10):3551–3557, 2008.
99. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB: Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell*, 120(2):237–248, 2005.
100. Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, Samali A: TRAIL Receptor Signalling and Modulation: Are We on the Right TRAIL? *Cancer Treatment Reviews*, 35(3):280–288, 2009.

101. Mayes PA, Campbell L, Ricci MS, Plastaras JP, Dicker DT, El-Deiry WS: Modulation of TRAIL-induced Tumor Cell Apoptosis in a Hypoxic Environment. *Cancer Biology & Therapy*, 4(10):1068–1074, 2005.
102. McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S: Mitochondria: More than Just a Powerhouse. *Current Biology*, 16(14):R551–R560, 2006.
103. Metzzen E ve Ratcliffe PJ: HIF Hydroxylation and Cellular Oxygen Sensing. *Biological Chemistry*, 385(3-4):223–230, 2004.
104. Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, Shima Y, Richardson P, Schlossman R, Hideshima T, Anderson KC: TRAIL/Apo2L Ligand Selectively Induces Apoptosis and Overcomes Drug Resistance in Multiple Myeloma: Therapeutic Applications. *Blood*, 98(3):795–804, 2001.
105. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, Munshi N, Treon SP, Anderson KC: Biologic Sequelae of Nuclear Factor- κ B Blockade in Multiple Myeloma: Therapeutic Applications. *Blood*, 99(11):4079–4086, 2002.
106. Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W: Hypoxia Inhibits TRAIL-induced Tumor Cell Apoptosis: Involvement of Lysosomal Cathepsins. *Apoptosis*, 12(1):125–139, 2007.
107. Nagata S: Apoptotic DNA Fragmentation. *Experimental Cell Research*, 256(1):12–18, 2000.
108. Nevo E, Filippucci MG, Redi C, Simson S, Heth G, Beiles A: Karyotype and Genetic Evolution in Speciation of Subterranean Mole Rats of the Genus *Spalax* in Turkey. *Biological Journal of the Linnean Society*, 54(3):203–229, 1995.
109. Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ: Early Neurodegeneration After Hypoxia-ischemia in Neonatal Rat is Necrosis While Delayed Neuronal Death is Apoptosis. *Neurobiology of Disease*, 8(2):207–219, 2001.
110. Oldenhuis C, Stegehuis JH, Walenkamp AME, De Jong S, De Vries EGE: Targeting TRAIL Death Receptors. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(4):433-439, 2008.
111. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P: Regulation of Cell Death: the Calcium–apoptosis Link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7):552–565, 2003.
112. Pan G, Ni J, Wei Y-F, Yu G, Gentz R, Dixit VM: An Antagonist Decoy Receptor and a Death Domain-containing Receptor for TRAIL. *Science*, 277(5327):815–818, 1997.
113. Park JB, Yiu G, Kaneko S, Wang J, Chang J, He Z: A TNF Receptor Family Member, TROY, is a Coreceptor with Nogo Receptor in Mediating the Inhibitory Activity of Myelin Inhibitors. *Neuron*, 45(3):345–351, 2005.

114. Park SY, Billiar TR, Seol DW: Hypoxia Inhibition of Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(1):150–153, 2002.
115. Peacock AJ: Oxygen at High Altitude. *MJ: British Medical Journal* 317(7165):1063-1066, 1998.
116. Pei GT, Wu CW, Lin WW: Hypoxia-induced Decoy Receptor 2 Gene Expression is Regulated via a Hypoxia-inducible Factor 1 α -mediated Mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(2):1274–1279, 2010.
117. Pennarun B, Meijer A, de Vries EG, Kleibeuker JH, Kruyt F, de Jong S: Playing the DISC: Turning on TRAIL Death Receptor-mediated Apoptosis in Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805(2):123–140, 2010.
118. Polek TC, Talpaz M, Spivak-Kroizman T: The TNF Receptor, RELT, Binds SPAK and Uses it to Mediate p38 and JNK Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(1):125–134, 2006.
119. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM: Hypoxia Signalling in Cancer and Approaches to Enforce Tumour Regression. *Nature*, 441(7092):437–443, 2006.
120. Prives C, Manfredi JJ: The p53 Tumor Suppressor Protein: Meeting Review. *Genes & Development*, 7(4):529–534, 1993.
121. Rado R, Bronchti G, Wollberg Z, Terkel J: Sensitivity to Light of the Blind Mole Rat: Behavioral and Neuroanatomical Study. *Israel Journal of Zoology*, 38(3-4):323–331, 1992.
122. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS: Oncogenes as Inducers of Tumor Angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 14(4):263–277, 1995.
123. Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB: In the Absence of Extrinsic Signals, Nutrient Utilization by Lymphocytes is Insufficient to Maintain Either Cell Size or Viability. *Molecular Cell*, 6(3):683–692, 2000.
124. Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, Gélinas C, Fuchs EJ, Bedi A: Regulation of Death Receptor Expression and TRAIL/Apo2L-induced Apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol*, 3(4):409-416, 2001.
125. Reed JC: Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157(5):1415–1430, 2000.
126. Roth W, Isenmann S, Nakamura M, Platten M, Wick W, Kleihues P, Bähr M, Ohgaki H, Ashkenazi A, Weller M: Soluble Decoy Receptor 3 is Expressed by Malignant Gliomas and Suppresses CD95 Ligand-induced Apoptosis and Chemotaxis. *Cancer research*, 61(6):2759–2765, 2001.

- 127.** Sanyal S, Jansen HG, De Grip WJ, Nevo E, De Jong WW: The Eye of the Blind Mole Rat, *Spalax ehrenbergi*. Rudiment with Hidden Function? Investigative Ophthalmology & Visual Science, 31(7):1398–1404, 1990.
- 128.** Savitskaya MA ve Onishchenko GE: Mechanisms of Apoptosis. Biochemistry (Moscow), 80(11):1393–1405, 2015.
- 129.** Schofield CJ ve Ratcliffe PJ: Oxygen Sensing by HIF hydroxylases. Nature reviews Molecular cell biology, 5(5):343–354, 2004.
- 130.** Schülke S, Dreidax D, Malik A, Burmester T, Nevo E, Band M, Avivi A, Hankeln T: Living With Stress: Regulation of Antioxidant Defense Genes in the Subterranean, Hypoxia-tolerant Mole Rat, *Spalax*. Gene, 500(2):199–206, 2012.
- 131.** Scorrano L: Opening the Doors to Cytochrome c: Changes in Mitochondrial Shape and Apoptosis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 41(10):1875–1883, 2009.
- 132.** Seo J, Kim B, Dhanasekaran DN, Tsang BK, Song YS: Curcumin Induces Apoptosis by Inhibiting Sarco/endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase Activity in Ovarian Cancer Cells. Cancer Letters, 371(1):30–37, 2016.
- 133.** Shams I, Avivi A, Nevo E: Oxygen and Carbon Dioxide Fluctuations in Burrows of Subterranean Blind Mole Rats Indicate Tolerance to Hypoxic–hypercapnic Stresses. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 142(3):376–382, 2005a.
- 134.** Shams I, Nevo E, Avivi A: Ontogenetic Expression of Erythropoietin and Hypoxia-inducible Factor-1 Alpha Genes in Subterranean Blind Mole Rats. The FASEB journal, 19(2):307–309, 2005b.
- 135.** Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI: Control of TRAIL-induced Apoptosis by a Family of Signaling and Decoy Receptors. Science, 277(5327):818–821, 1997.
- 136.** Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S. Tissue Distribution of the Death Ligand TRAIL and Its Receptors. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 52(6):821–831, 2004.
- 137.** Stein MN, Bertino JR, Kaufman HL, Mayer T, Moss R, Silk A, Chan N, Malhotra J, Rodriguez L, Aisner J. First-in-human Clinical Trial of Oral ONC201 in Patients with Refractory Solid Tumors. Clinical Cancer Research. 2017.
- 138.** Şanlıoğlu A: Kanser Tedavisinde Apoptozu İndükleyici Deneysel Yaklaşımlar. İzmir: I. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, 217-246, 2011.

139. Şanlıoğlu AD, Köksal IT, Çiftçioğlu A, Baykara M, Lüleci G, Şanlıoğlu S: Differential Expression of TRAIL and Its Receptors in Benign and Malignant Prostate Tissues. *The Journal of Urology*, 177(1):359–364, 2007a.
140. Şanlıoğlu AD, Karaçay B, Köksal IT, Griffith TS, Şanlıoğlu S: DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and Adenovirus Delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) Break Down in Vitro Tumorigenic Potential of Prostate Carcinoma Cells. *Cancer Gene Therapy*, 14(12):976–984, 2007b.
141. Taha TA, Mullen TD, Obeid LM: A House Divided: Ceramide, Sphingosine, and Sphingosine-1-phosphate in Programmed Cell Death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(12):2027–2036, 2006.
142. Tamm I, Kornblau SM, Segall H, Krajewski S, Welsh K, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Qui YH, Monks A: Expression and Prognostic Significance of IAP-family Genes in Human Cancers and Myeloid Leukemias. *Clinical Cancer Research*, 6(5):1796–1803, 2000.
143. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB: Growth Factors can Influence Cell Growth and Survival Through Effects on Glucose Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17):5899–5912, 2001.
144. Varley JM, Evans DG, Birch JM: Li-Fraumeni Syndrome—a molecular and Clinical Review. *British Journal of Cancer*, 76(1): 1, 1997.
145. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in Cancer: Significance and Impact on Clinical Outcome. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2):225–239, 2007.
146. Vaux DL, Irving LW, Stuart KK: Prevention of Programmed Cell Death in *Caenorhabditis elegans* by Human Bcl-2. *Science-New York Then Washington*, 258:1955-1955, 1992.
147. Von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H: Exploring the TRAILs Less Travelled: TRAIL in Cancer Biology and Therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(6):352–366, 2017.
148. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T: Tumoricidal Activity of Tumor Necrosis Factor–related apoptosis–Inducing Ligand in vivo. *Nature Medicine*, 5(2):157–163, 1999.
149. Walczak H: Death Receptor–Ligand Systems in Cancer, Cell Death, and Inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5):1-18, 2013.
150. Wang M ve Kaufman RJ: The Impact of the Endoplasmic Reticulum Protein-Folding Environment on Cancer Development. *Nature Reviews Cancer*, 14(9):581–597, 2014.
151. Wang X, Wang Y, Zhang J, Kim HP, Ryter SW, Choi AM: FLIP Protects Against Hypoxia/reoxygenation-induced Endothelial Cell Apoptosis by Inhibiting Bax Activation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(11):4742–4751, 2005.

- 152.** Weidemann A ve Johnson RS: Biology of HIF-1 α . *Cell Death & Differentiation*, 15(4):621–627, 2008.
- 153.** Weinmann M, Marini P, Jendrossek V, Betsch A, Goecke B, Budach W, Belka C: Influence of Hypoxia on TRAIL-induced Apoptosis in Tumor Cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 58(2):386–396, 2004.
- 154.** Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM: Molecular Biology of Bax and Bak Activation and Action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(4):521–531, 2011.
- 155.** Widmaier EP, Raff H, Strang KT: *Vander İnsan Fizyolojisi*, 1. basım Güneş Tıp Kitabevi Ankara s.53-54, 2014a.
- 156.** Widmaier EP, Raff H, Strang KT: *Vander İnsan Fizyolojisi*, 1. basım Güneş Tıp Kitabevi Ankara s.54-55, 2014b.
- 157.** Widmer HR, Hoppeler H, Nevo E, Taylor CR, Weibel ER: Working Underground: Respiratory Adaptations in the Blind Mole Rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5):2062–2067, 1997.
- 158.** Williams TW ve Granger GA: Lymphocyte in vitro Cytotoxicity: Lymphotoxins of Several Mammalian Species. *Nature*, 219(5158):1076–1077, 1968.
- 159.** Willis SN ve Adams JM: Life in the Balance: how BH3-only Proteins Induce Apoptosis. *Current Opinion in cell Biology*, 17(6):617–625, 2005.
- 160.** Wu GS, Burns TF, McDonald ER, Jiang W, Meng R, Krantz ID, Kao G, Gan D-D, Zhou J-Y, Muschel R: KILLER/DR5 is a DNA Damage–inducible p53–regulated Death Receptor Gene. *Nature Genetics*, 17(2):141–143, 1997.
- 161.** Yadav N ve Chandra D: Mitochondrial and Postmitochondrial Survival Signaling in Cancer. *Mitochondrion*, 16:18–25, 2014.
- 162.** Yahav S, Simson S, Nevo E: Adaptive Energy Metabolism in Four Chromosomal Species of Subterranean Mole Rats. *Oecologia*, 77(4):533–536, 1988.
- 163.** Yamaguchi H ve Wang HG: CHOP is Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis by Enhancing DR5 Expression in Human Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44):45495–45502, 2004.
- 164.** Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, Wang X: Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, 275(5303):1129–1132, 1997.
- 165.** Yiğit G: *Hematoloji ve Endokrin Fizyolojisi*. 1. basım, Nobel Tıp Kitabevleri, 2011.

166. Yokuş B ve Çakır D: Kanser Biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1:7–18, 2012.
167. Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Gray CP, Hersey P: Differential Localization and Regulation of Death and Decoy Receptors for TNF-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) in Human Melanoma Cells. *The Journal of Immunology*, 164(8):3961–3970, 2000.
168. Zhao Y, Yu H, Hu W: The regulation of MDM2 Oncogene and Its Impact on Human Cancers. *Acta Biochim Biophys Sin*, 46(3):180–189, 2014.
169. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X: Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-dependent Activation of Caspase-3. *Cell*, 90(3):405–413, 1997.
170. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X: An APAF-1 Cytochrome-c Multimeric Complex is a Functional Apoptosome that Activates Procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17):11549–11556, 1999.

7. EKLER

EK 1 - Arduino UNO R3 Kartı Üzerine Yapılan Kodlamalar

```

/* -----Kütüphane Dosyaları-----*/
#include <stdlib.h>
#include <DHT.h>

/*-----DHT22 sensörü-----*/
#define DHTPIN 2
#define DHTTYPE DHT22
DHT dht(DHTPIN, DHTTYPE);

/*-----Oksijen sensörü-----*/
const float VRefer = 3.3;
const int pinAdc = A5;

/*-----ESP8266 modülü-----*/
#define SSID "*****" // SSID
#define PASS "*****" // Şifre
#define IP "*****" // IoT
String msg = "*****"; // API Anahtarı

float temp;
int hum;
int Vout;
float oxygen;
String tempC;
int error;

void setup()
{
  Serial.begin(115200);
  Serial.println("AT");
  delay(5000);
  if(Serial.find("OK")){
    connectWiFi();
  }
}

void loop()
{
  start:
  error=0;
  temp = dht.readTemperature();
  hum = dht.readHumidity();
  Vout = readO2Vout();
  oxygen = readConcentration();
  char buffer[10];
  tempC = dtostrf(temp, 4, 1, buffer);

```

EK 2 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait TNFRSF10A (DR4) Gen Sekansı

ATGCCTTCCACCGGGAACCTGAAAACCCCCAGCTTCAGTCAGGGCTTCACGATGACG
GTGATCTGCATAGTGCTCCTGCAGGTGCTCCTGCAGGCCTTGACTGTTTTTGTGACT
TACATGTACTTCAACAACGAGGTGAAACAGCTACAGGACAATTACTCCAAAATCGGA
CTAGCTTGCTTCTCAAAGAAGATGGGGATTTTTGGGACCCCAGTAATATTCTAGGT
CGAAGGCATCCCAAGAAAGTGACTAAACTGGTTAGGGTATGGCCTGGCTGCAGAAAC
CTCAGGGCATGGGTGACAGAAAGGCAGCTAGAACACAGCACCCCTCAGGCCAAAACC
CAGCCATAGACACCAGGTTTCATTGAGGGACTTGCTTTGTTCCCCAAAATGAGATC
GCTGTAGGCTTCAATGATCTAC



EK 3 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait TNFRSF10B (DR5) Gen Sekansı

ATGTA CTTAATTTTTCTTGTAGTAGTTTTGTATCATATTATTGTATTATTTATAT
TATTACTGTTAAGTACTATGTTCTCTTATTAGAAGTTGAACACAGAACCCTCTGAGAA
CACATATGCTACAAGTGTCTAACACACCTCCAGCATCCCGGATTACCTTTGTTCCCT
GAACAAGGCATAATTGGTAGGGTATGATAGGGCCTGCCTATCATCCTAACACTCCGG
TGATGGAGCCAGGAAGATCAAGAGTTCGAGGCCAGCTGGTTCACATAAGATCCCATA
TAATGTGCAGGATGGCTAAACTTGCTGAGAGCTGACTCTGTGGTCTCCTGTCCCAGA
TTCTAGCGATATTCATTACTAAGACCCTTGCTCCGCAGCCTACTGAGGGTACATCTAA
CTTGAATCTAACACACTTGAAGTGAGTTTGCTGGTTTGGACACAGAGGGAGCATTAA
GTGCTACCTGGGGTGACCCTTGAGGACCACGCCCCCTGTAAGCATTGACCATTGTG
AGAGTAAACTGAAACTCA



EK 4 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait TNFRSF10C (DcR1) Gen Sekansı

ATGTCCAGCAGGCCAGTACCTGTCCAAGGAGGATGGCTCGTGCAAAGCTTGCATAGA
TGGTGAAAACACTACACCAGCGGTCCCAACGTCCGTGTGCCTTCCTGCCTTTCCTGCAG
GGTCTGTGGTAAGGAAGATAAAGTCATAAAAAGCCGATGCGTCCTGGAAAGCTAGAA
ACACAGAGTGTGAGTGCAAACCAGGCAGCTTTGAAGATAAAGACTCGACTGAGATCT
GCCAGACATGCTCTAACTGCACTGATGGGGGGGAATCAGATGAAGTGATCCCCTGCA
CCCCAAAGGCAAACCGGAAGTGTGTCCCCAATTTAAACACTCAAATACCTCAGCATA
ACCTAGGCCTCTTAATAGGGCTCTTGGCCTCGGTCATATCA



EK 5 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait TNFRSF10D (DcR2) Gen Sekansı

ATGGAGCCTCCAGGACCCAGCACGCCACAGCCTCTGCCGCTGCCCGGGCAGATCAC
TACACCCCAGGCCTCCGGCCACTCCCGAAGCGCAGACTTCTATATAGCTTTGCGTTG
CTGCTTGCTGTGCTACAGGCTGTCTTTGTTCCAGTAACAGCTAACCAGCCCATAAT
CGTCCAGCTGGCCTACAGCGGCCGGAGGAGAGCCCATCAAGAGGACCCTGTCTAGCA
GGCCAGTACCTGTCAGAAGGGAAGTCAAGCCTTGCAGAGAGGGTATTGACTACACC
AGCCATTCCAACCTCTGGATTTCATGTATTCTCTGCACAGTCTGTAAGGAAGATAAAG
TCGTAGAAACCCGATGCAACATAACCACAAATACGGTGTGTGATGCAAACCAGGCA
CCTTTGAAGATAAAGACTCCCCTGAGATCTGCCAGTCATGCTCTAACTGCACTGACG
GGGAAGAGGAACTGACTTCA



EK 6 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait TNFRSF11B (OPG) Gen Sekansı

ATGACCCAGAAACAAGACGTCAGCTCTTGTGTGACAAAGGTGCTCCTGGCACCTACC
TAAAACAGCACTGCACAGTCAGGAGGAAGACACTGTGTGTCCCTTGCCCTGACTACT
CTTATACAGACAGGGGGCACACGAGTGATGAATGCGTGTACTGCAGCCCCGTGTGCA
AGGAACTGCAGACCGTGCCCCAGGAGTGCAACCGCACCCACAACCGAGTGTGCGAAT
GTGAGGAAGGGCGCTACCTGGAGCTCGAATTCTGCTTGAAGCACCGGAGCTGTCCCC
CAGGCTTGGGTGTGCTGCAGGCTGGGACCCCAGAGCGAAACACGGTTTGCAAAGAT
GTCCGGATGGGTCTTCTCAGGTGAGACGTCATCGAAAGCACCCCTGTAGGAAACACA
GGAActGCAGCTCACTTGGCCTCCTGCTAATTCAGAAAGGAAATGCAACACATGACA
ATGTATGTTCCGAAACAGAGAAGCAACTCAAATTTGTGGAATAGATGTCACCCTGT
GCGAAGAGGCATTCTTCA



EK 7 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait CFLAR (FLIP) Gen Sekansı

ATGATGCTGACTTCTCGTGGTTCCCGGAGCCCTGCTGAACGGATGGAGGCTGGCCCA
GAGCCTGACTTCTGCGGTTCTGAACATGGCCCTGAGCACTGTGTCTGCTGAGGTCAT
TCACCAGGTGGAGGAGTCTCTTGATGAGGATGAGAAGGAGATGATGCTCTTCTTG
TAGAGATGTGACTGAGAACCTGGCTCCACCCAACGTCAGGGACCTCCTGGATTGTTT
AAGTGAGAGAGGCCAGCTCTCCTTCGCTGCCTTAGCTGAGCTGCTGTACAGGGTGC
GCGGTTTGACCTGCTCAAGAGGATTTTGAAGACAGATAAAGCAGCGGTGGAGGACCA
TCTGTGCAGAAGCCCTCACCTTGTTTCCGATTATAGGGTGCTGCTGATGGAGATTGG
GGAGAATTTGAATCAATCTGATGTATCCTCCTTAATTTTCCTTACAAAGGATTACAC
AGGCCGAGGCAAGGTAGCCAAGGACAAGAGTTTCTTGGACCTGGTGATTGAACTGGA
GAAACTGAATTTGATTGGTTCCGATCAGTTGAATTTATTAGAAAAATGCCTGAAGAG
CATCCACAGAATAGACTTGAAGACAAAAATCCAGAAGTAC



EK 8 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait XIAP Gen Sekansı

ATGAGGACTGGGGGTTTTTTGGATGCCCCCTTCCGGCTCCGCGAGACGGCGGGACCT
TGGCGGTCCCCGAGCGGCGCGACGCTAATCGAGGGCTGCTCGGCTCGAGACCCGGC
CGGGCCCCGCCGCCAGCAGAGTTGTGTTTTTCTGATCGGGGCTCGGGCCGXCCCC
TGGGCCTCCGGGACCCTCCCCTCGGGAACCGTCGCCCGCGGCGGTTAGTTAGGACTG
GATTGCTTGGCGCGAAAAGGTGGACAAGTCGTATTTTCAAGAGAAGATGACTTTTAA
CAGTTTTGAAGGATCTAGAAGTGTGTACCTGCAGACACCAATAAGGAACAGTGAAG
AATTTGTAGAAGAGTTTAATAGATTAATAAACATTTGCTAACTTCCCAAGCAGCAGTC
AACCTGTTTCAGCATCAACATTGGCGCGAGCGGGGTTTCTCTACACTGGTGAAGGAG
ACACCGTGCAGAGGGTGTTCAGTTGTCACGCGGCAGTAGATAGATGGCAGTATGGA
GACTCAGCTGTTGGAAGACACAGGAGAATATCCCCAAATTGCAGATTTATCAATGGT
TTTTATTTTGAAAACGGTGCCACACAGTCTACATCTCCTGGCATCCAAAATGGCCAG
TACAAATCTGAAAACGTGTGTGGGAAACAGAAATCA



EK 9 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait BIRC2 (cIAP-1) Gen Sekansı

ATGCACAAAACACTACATCCCCAGAGAAAGACTTGTCCCTTCCCCTCCCTGTCATCTCA
CCATGAACATGGTTCAAGACAGCGCCTTTCTAGCCAAGCTGATGAAGAGTGCTGACA
CCTTTGAGTTGAAGTATGACTTTTCCTGTGAGCTGTACCGATTGTCCACGTATTCAG
CTTTTCCCAGGGGAGTTCCCTGTGTGTCAGAAAGGAGTCTGGCTCGTGCTGGCTTTTACT
ACACTGGTGCCAATGACAAGGTCATTTAGTGCTTCTGCTGTGGCCTGATATTGCTAG
ACAACTGGAAACAAGGGGACAGTCCCATGGAGAAGCACAGAAAGTTGTACCCCAGCT
GCAACTTTGTACAGACTTTGAATCCAGCCAACAGTCTGGAAGCTAGTCCTCGGCCTT
CTTTCCTTCCACGGCGATGAGCACCATGCCCCCTTTGAGCTGGGTGCAAGTTCTG
AGAATACTGGCTATTTTCAGTGGCTCTTACTCGAGCTTTCCCTCAGACCCTGTGAACT
TCCGAGCAAATCAAGATTGTCCTGCTTTGAGCACAAGTCCCTACCCTTTGCAATGA
ACACAGAGAAGGCCAGATTACTCACCTATGAAACATGGCCATTGCTTTTTCTGTCAC
CAGCAAAGCTGGCCAAAGCAGGCTTCTACTACATAGGACCTGGAGATAGAGTGGCCT
GCTTTGCGTGCGATGGGAAACTGAGCAACTGGGAACGTAAGGATGATGCTATGTCAG
AGCACCAGAGGCATTTCCCCAGCTGTCCGTTCTTAAAAGACTTGGGTCA

EK 10 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait BIRC3 (cIAP-2) Gen Sekansı

ATGCACAAAAC TACATCCCCAGAGAAAGACTTGTCCCTTCCCCTCCCTGTCATCTCA
CCATGAACATGGTTCAAGACAGCGCCTTTCTAGCCAAGCTGATGAAGAGTGCTGACA
CCTTTGAGTTGAAGTATGACTTTTCCCTGTGAGCTGTACCGATTGTCCACGTATTCAG
CTTTTCCCAGGGGAGTTCCTGTGTGTCAGAAAGGAGTCTAAAGGCTCGTGCCCCTGGCT
TTTACTACACTGGTGCCAATGACAAGGTCAAGTGCTTCGGGTGCTGTGGCCTGATGC
TAGACAAC TGGAAACAAGGGGACAGTCCCATGGAGAAGCACAGAAAAAAGTTGTACC
CCAGCTGCAACTTTGTACAGACTTTGAATCCAGCCAACAGTCTGGAAGCTAGTATCC
CGCCTCGGCCTTCTCTTCCTTCCACGGCGATGAGCACCATGCCTTTGAGCTTTGCAA
GTTCTGAGAATACTGGCTATTTTCAGTGGCTTTTCTTACTCGAGCTTTCCTCAGACC
CTGTGAACTTCCGAGCAAATCAAGATTGTCTGCTTTGAGCACAAGTCCCTACCACT
TTGCAATGAACACAGAGAAGGCCAGATTACTCA



EK 11 - *Nannospalax nehringi*'ye Ait TNFSF10 (TRAIL) Gen Sekansı

ATGCCTTCCACCGGGAACCTGAAGGGCCCCAGCTTCAGTCAGCACTTCACGATGACG
GTGATCTGCATAGTGCTCCTGCAGGTGCTCCTGCAGGCCTTGACTGTGGCTGTGACT
TACATGTA CTTCAACAACGAGGTGAAACAGCTACAGGACAATTACTCCAAAATCGGA
CTAGCTTGCTTCTCAAAGAAGATGGGGATTTTTGGGACTCCACTGACGAGGGGATT
TTGAACAGACCTTGCTTGCAGGAACCTGTTTCTCAAGAGGCAACTGTATCAGCTCAT
TGAAGAGGTGACTTTGAGAACCTTTGAGAAAACCATCTCTACAGTTCCAGAAAAGCA
GCTAAGCACTCCTCCCTTGCCCAGAGGTAGAAGACCCCAGAGAGTGGCAGCTCACAT
TACCGGGATCACTCGGAGAAGCAACTTAGCCTTAATTCCAATCTCCAAGGATGGAAA
GACCTTGGGCTTAACAGAAGATAGAAACCTGGGAGTCCTCTCGGAGAGGGCATTTCAT
TTCTCAACCATGTGCACTTGAGAAAACGGAGAGCTGGTGATCCAGGAGGAGGGCCTGT
ATTACATCTACTCCCAAACGTACTACCGGTTCAAGGAGGCTAAAGAAGCTTCCAAGA
CAGTCTCGAAGGACGGAGGGAGGATCAAACAGATGGTGCAGTACATCTACAAATACA
CCAGCTACCCCGATCCCATACTGCTGATGAAGAGTGCCAGAAGGCATAGCTGCTGGT
CCAGAGAAGCTGAGTACGGACTGTACTCCATCTATCAGGGGGGGCTGTTTCGAGCTCA
AAGAAAATGACAGGATTTTTGTTTTCCGTGACGAATGAGCATTGATGGACCTGGATC
AAGAAGCCAGTTTCTTTGGAGCCTTTTTAATTAAGTAGACGACCTGCAATGATCAAA
CACCCCCATAAAATACTTTCCAGTAATATTCTAGGTCTGAAGGCATCCCAAGAAAGTG
ACTAAACTGGTTAGGGTATGGCCTGGCTGCAGAAAACCTCAGGGCAGATGTGACAGAA
AGGCAGCTAGAACACAGCACCCCTCAGGCCAAAAACCCAGCCATAGACACCAGGTTTC
A

8. ÖZGEÇMİŞ

KİMLİK ve İLETİŞİM BİLGİLERİ	
Doğum Yılı:	08.12.1987
Doğum Yeri:	İstanbul
Yazışma Adresi:	Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Paşaçayırı/KARS
Telefon:	05453960147
e-Posta:	barisyildizkau@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ		
2007 - 2011	Lisans	Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
2011 - 2013	Yüksek Lisans	Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı
2013 -	Doktora	Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı