

T1857

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**AKCİĞER KANSERİNDE REKOMBİNANT +
ADENOVİRÜS ARACILI TRAIL TRANSFERİNİN
POTANSİYEL TERAPÖTİK ETKİSİ**

Çiğdem AYDIN ACAR

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Salih ŞANLIOĞLU**

**Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.
(Proje No: 2004.02.0122.011)**

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2005

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ**

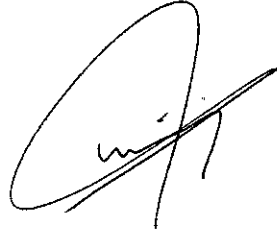
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 18/07/2005

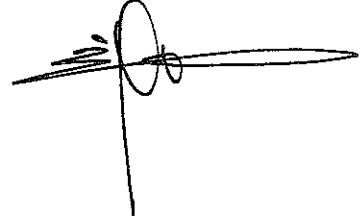
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



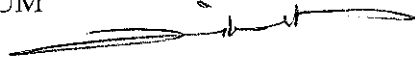
Üye: Prof. Dr. Güven LULECİ
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



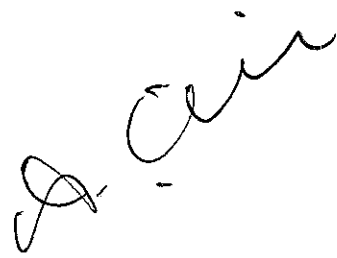
Üye: Doç. Dr. İbrahim KESER
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye: Doç. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



Üye: Doç. Dr. Aykut ÇİLLİ
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 05/08/2005 tarih ve 13/106 Sayılı kararıyla kabul edilmiştir



Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Akciğer kanseri ölüme sebebiyet veren kanserler arasında hem erkeklerde hem de kadınlarda birinci sırada yer almaktadır. Günümüzde akciğer kanserine karşı en yaygın olarak kullanılan tedavi şekilleri arasında yer alan kemoterapi ve radyoterapinin tümöre karşı etkisini gösterebilmesi, p53 tümör baskılayıcı proteininin varlığını gerektirir. Sonuç olarak, p53 proteini olmayan tümörler, hem kemoterapi hem de radyoterapiye karşı dirençlilik gösterir. TRAIL gibi ölüm ligantları kanser hücrelerinde p53'den bağımsız olarak apoptozisi indükleyebilmektedir ve bu nedenle gen tedavisi için potansiyel tedavi edici ajanlar olarak düşünülmektedir. Buna karşın, akciğer tümörünü de kapsayan bazı tümörlerde TRAIL' a karşı dirençlilik gözlenmiştir. Ayrıca, TRAIL'in dirençlilik mekanizması da anlaşılamamıştır. Şimdiye kadar kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliği ile TRAIL reseptör sentez profili arasında bir korelasyon gösterilememiştir. Aksine, böyle bir korelasyonun var olmadığına inanılmaktadır. Bu çalışmada ilk olarak, akciğer kanserli hastalar için potansiyel bir gen tedavi modeli olduğu düşünülen TRAIL'in adenovirüs aracılığı ile verilimi test edildi. A549 akciğer kanser hücre hattının TRAIL aracılı hücre ölümüne karşı tamamen dirençli olduğu belirlendi. Ayrıca, IKK inhibisyonunu (AdIKK β KA) kapsayan bütünüleyici bir gen tedavi metodu ile akciğer kanser hücreleri TRAIL' a karşı duyarlı hale getirildi. İkincil olarak, akciğer kanser hücrelerinin TRAIL reseptör kompozisyonu Real Time RT-PCR ve akış sitometrisi analizleri ile tespit edildi. A549 akciğer kanser hücre hattındaki TRAIL dirençliliği hücre yüzeyindeki TRAIL-R4 dekok reseptör senteziyle ilişkilendirildi.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, adenovirüs, gen tedavi, TRAIL, IKK inhibisyonu

ABSTRACT

Lung cancer causes the highest rate of cancer related deaths both in men and women. Currently, chemotherapy and radiotherapy are among the most commonly used treatment modalities against lung cancer. Tumor suppressor gene, p53, is required in order for both of these treatment methods to work as anti-tumor agents. As a result, tumors lacking p53 display resistance to both chemotherapy and radiotherapy. Death ligands such as TRAIL induce apoptosis regardless of p53 status of cancer cells and are considered as potential therapeutic agents for gene therapy. However, TRAIL resistance observed in tumors including those of the lung seriously challenged any gene therapy approach targeting cancer. In addition, the mechanism of TRAIL resistance is not understood. On top of that, no correlation between TRAIL receptor expression profile and TRAIL resistance has been demonstrated in cancer cells yet. In contrast, it is believed that no such correlation exists. In this study, first we have tested adenovirus delivery of TRAIL as a potential gene therapy modality for patients with lung cancer. In our experimental settings, A549 lung cancer cell line displayed complete resistance to TRAIL induced cell death. In addition, a complementary gene therapy modality involving IKK inhibition (AdIKK β KA) sensitized lung cancer cell line (A549) to TRAIL. Second, TRAIL receptor composition of lung cancer cells was revealed by novel Real Time RT-PCR and flow cytometry analysis. Intriguingly, TRAIL resistance in A549 cell line was correlated with an increase in TRAIL-R4 decoy receptor expression on cell surface.

Key Words: Lung cancer, adenovirus, gene therapy, TRAIL, IKK inhibition.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübelerinden yararlanmaktan onur duyduğum, yüksek lisans tez çalışmam süresince gerek maddi gerek manevi desteği ve yardımları ile her zaman yanımda olan danışmanım Sayın Doç. Dr. Salih Şanlıoğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman göstermiş olduğu yakın ilgisi, desteği ve yol göstericiliği için değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güven Lüleci'ye,

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan sayın hocalarım Doç.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e, Doç. Dr. İbrahim KESER'e, ve Doç.Dr. Aykut ÇİLLİ'ye,

Tez deneylerim esnasında yoğun işlerine rağmen zaman ayırarak deneyimlerimden yararlanmamı sağlayan, emeği ve özverisi tartışılmaz sevgili Dr. Ahter D. Şanlıoğlu'na,

Tez yazımı aşamasında yardımcı olan arkadaşlarım Arş. Gör. Duygu Yaşar, Arş. Gör. Ercüment Dirice ve Arş. Gör. Dr. Atıl Bişgin'e,

Tez çalışmalarım süresince göstermiş oldukları anlayış ve yardımlarından dolayı tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen aileme ve eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Akciğer Kanseri	2
2.1.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	2
2.1.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	2
2.1.2.1. Yassı Epitel Hücreli Karsinoma	3
2.1.2.2. Adenokarsinoma	3
2.1.2.3. Büyük Hücreli Akciğer Kanseri	3
2.2. Akciğer Kanserinde Genetik Değişimler	3
2.2.1. Onkogenlerin Aktivasyonu	3
2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnaktivasyonu	4
2.2.3. Akciğer Kanserindeki Diğer Genetik Değişimler	5
2.2.3.1. Kromozom Abnormaliteleri	5
2.2.3.2. Mikrosatellit Değişimler	5
2.2.3.3. Telomeraz Aktivitesi	5
2.2.3.4. Hatalı Metilasyon	6
2.3. Kanserde Ölüm Ligantlarının Kullanımı	6
2.4. TRAIL	7
2.4.1. TRAIL Geni ve Proteini	7
2.4.2. TRAIL Reseptörleri	7
2.4.3. TRAIL Sinyal Yolu	9

2.4.4. Kanserde TRAIL İndüklü Apoptozise Karşı Dirençlilik Mekanizmaları	10
2.4.4.1. TRAIL Reseptörleri ve TRAIL Dirençliliği	11
2.4.4.2. DISC Oluşumu ve TRAIL Dirençliliği	11
2.4.4.2.1. FADD	11
2.4.4.2.2. Kaspaz- 8	12
2.4.4.2.3. C-FLIP	12
2.4.4.3. NF-κB ve TRAIL Dirençliliği	12
2.4.5. TRAIL'ın Fizyolojik Rolü	14
2.5. Gen Tedavisi	16
2.5.1. Gen Tedavisinde Kullanılan Vektörler	16
2.5.1.1. Retroviral Vektörler	17
2.5.1.2. Adeno-Associated Viral Vektörler	17
2.5.1.3. Adenoviral Vektörler	17
2.6. Akciğer Kanseri ve Gen Tedavisi	20
2.7. Akciğer Kanseri ve TRAIL	22
MATERYAL ve METODLAR	24
3.1. Hücre Hattı ve Kültür Şartları	24
3.2. Besiyeri ve Kullanılan Solüsyonlar	24
3.3. Akciğer Kanseri Hücre Hattının Rekombinant Adenoviral Vektörler ile Transdüksiyonu	25
3.4. Akciğer Kanseri Hücre Hattının TRAIL'a Karşı Duyarlılığının Belirlenmesi	26
3.4.1. Virüs Transdüksiyonu	26
3.4.2. Canlı/Ölü Hücrel Canlılık Deneyi	26
3.5. Akciğer Kanseri Hücre Hattının TRAIL'a Karşı Dirençliliğinin Kırılması	27
3.5.1. Virüs Transdüksiyonu	27
3.5.2. Canlı/Ölü Hücrel Canlılık Deneyi	27
3.6. NF-κB Sinyal Yolunun Aktivasyon Durumunun Belirlenmesi	28

3.6.1. Virüs Transdüksiyonu	28
3.6.2. Hücre Lizatı Hazırlanması	29
3.6.2.1. Kullanılan Solüsyonlar	29
3.6.2.2. İşlemler	29
3.6.3. Lusiferaz Okumaları	29
3.6.4. Protein Miktar Tayini	29
3.6.4.1. Kullanılan Solüsyonlar	29
3.7. Annexin V Boyama ile Apoptozisin Belirlenmesi	30
3.7.1. Virüs Transdüksiyonu	30
3.7.2. Annexin V Boyama	30
3.7.2.1. Kullanılan Solüsyonlar	30
3.7.2.2. İşlemler	31
3.8. TRAIL Reseptör Ekspresyonlarının Belirlenmesi	31
3.8.1. Real Time RT-PCR	31
3.8.1.1. Kullanılan Solüsyonlar	31
3.8.1.2. RNA İzolasyonu	31
3.8.1.3. cDNA Eldesi	32
3.8.1.4. Real Time RT-PCR	32
3.8.2. Akış Sitometrisi Deneyi	35
3.8.2.1. Kullanılan Solüsyonlar ve Antikorlar	35
3.8.2.2. İşlemler	35
BULGULAR	
4.1. A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattının Adenoviral Vektörler ile Transdüksiyonu	37
4.2. A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattının hTRAIL ve IKK β KA Gen Transferi Sonuçları	37
4.3. IKK İnhibisyonu ile NF- κ B Yolunun Engellenmesi	38
4.4. A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattında NF- κ B Aktivasyon Durumunu	38
4.5. NF- κ B İnhibisyonu Altında Ad5hTRAIL Enfeksiyonu Sonuçları	39

4.6. A549 Akciğer Kanseri Hücre Hattında TRAIL Reseptör	
Ekspresyonları	39
TARTIŞMA ve SONUÇLAR	48
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Ad	: Adenoviral Vektör
AdCMVLacZ	: Beta Galaktosidaz Proteinini Kodlayan Adenoviral Vektör
AdEGFP	: GFP Reporter Genini Kodlayan Adenoviral Vektör
Ad5hTRAIL	: TRAIL Proteinini Kodlayan Adenoviral Vektör
AdIKKβKA	: IKK β Dominant Negatif Formunu Kodlayan Adenoviral Vektör
AdNF-κBluc	: NF- κ B Promotörlü Lusiferaz Reporter Genini Taşıyan Adenoviral Vektör
ATCC	: American Type Tissue Culture
Apo2L	: Apo2 Ligand
BSA	: Bovine Serum Albumin
CAR	: Coxsachie Adenovirus Reseptor
CaCl₂	: Kalsiyum Klorid
CDK 4	: Cyclin-Dependent Kinase 4
C-FLIP	: Cellular –FLICE Inhibitory Protein
C-FLIP_L	: Cellular –FLICE Inhibitory Protein Long Form
C-FLIP_S	: Cellular –FLICE Inhibitory Protein Short Form
CMV	: Cytomegalovirus
DAP	: Death Associated Protein
DD	: Death Domain
DED	: Death Effector Domain
DISC	: Death-Inducing Signaling Complex
dH₂O	: Distile Su
ddH₂O	: Bidistile Su
EGFP	: Enhanced Green Flourescent Protein
FACS	: Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	: Fas- Associated Death Domain
FADD-DN	: FADD Dominant Negatif
Fas-L	: Fas Ligand
FCS	: Fetal Calf Serum

FHIT	: Fragile Histidine Triad
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate
GFP	: Green Fluorescent Protein
GPI	: Glycosylphosphatidyl-Inositol
GSTP1	: Glutathione S-Transferase
HCl	: Hidroklorik asit
IKB	: I Kappa B
IKK	: I Kappa B Kinase
IFNγ	: Interferon gamma
KCl	: Potasyum Klorid
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (Small Cell Lung Cancer)
KHOAK	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (Non-Small Cell Lung Cancer)
KH₂PO₄	: Potasium Phosphate
MOI	: Multiplicity of Infection
NaCl	: Sodyum Klorid
NaHCO₃	: Sodyum Bikarbonat
NaN₃	: Sodyum Azid
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa B
NK	: Naturel Killer
OPG	: Osteoprotegerin
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PI	: Propidium Iodide
RHD	: Rel Homology Domain
PSA	: Penicillin- Streptomycin- Amphotericine B
RLU	: Relative Light Unit
RB	: Retinoblastoma
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TNFR	: Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAIL	: Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TR1	: TRAIL- R1
TR2	: TRAIL-R2

TR3 : TRAIL-R3
TR4 : TRAIL-R4
TRP : Tripsin EDTA
UMM : Universal Master Mix

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İnsan Apo2L/TRAIL geninin şematik gösterimi	7
2.2. TRAIL reseptörlerinin şematik gösterimi	8
2.3. Apo2L/TRAIL aracılığı ile ekstrinsik ve intrinsik yolların aktivasyonu	10
2.4. TRAIL sinyal yolu ve NF- κ B ilişkisi	14
2.5. Adenovirüsün yapısı	18
2.6. Adenovirüsün yaşam döngüsü	19
4.1. A549 akciğer kanser hücrelerinin AdEGFP infeksiyonu	41
4.2. A549 akciğer kanser hücrelerinin Ad5hTRAIL infeksiyonu	42
4.3. A549 akciğer kanser hücrelerinin tek başına AdIKK β KA infeksiyonu	42
4.4. A549 akciğer kanser hücrelerinin Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA ile birlikte infeksiyonu	43
4.5. NF- κ B Aktivitesi	44
4.6. Annexin V boyama ile apoptozisin gösterimi	45
4.7. TRAIL reseptörleri mRNA ekspresyon profilleri	46
4.8. TRAIL reseptörleri hücre yüzeyi ekspresyon profilleri	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. TRAIL reseptörleri ve kromozom lokalizasyonları	8
3.1. Kullanılan AdEGFP MOI değerleri	25
3.2. Kullanılan Ad5hTRAIL MOI değerleri	26
3.3. Kullanılan virüs MOI değerleri	27
3.4. Kullanılan virüs MOI değerleri	28
3.5. Kullanılan virüs MOI değerleri	30
3.6. TRAIL reseptörleri ve mRNA'ya ait primer dizileri	34

GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol oynadığı, multigenik ve multistep bir hastalıktır. Yapılan istatistiksel çalışmalar, kanserin toplumların yaklaşık üçte birinde görüldüğünü, ölümlerin ise yüzde yirmiden fazlasından sorumlu olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra gelişmiş ülkelerin toplam sağlık harcamalarının yüzde onundan fazlasının kanser tedavileri için kullanıldığı belirtilmiştir. Günümüzde en fazla ölüme neden olan kanser türü akciğer kanseridir. Dünyada her yıl yaklaşık 1 milyon kişi akciğer kanserinden ölmektedir. Akciğer kanseri için uygulanan radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi müdahale gibi tedavi metodlarına rağmen tanı konduktan sonra akciğer kanserli bireylerin ancak % 15'i 5 yıldan fazla yaşayabilmektedir. Bu nedenle akciğer kanserine karşı daha etkin bir tedavi yönteminin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) ölüm ligandı, ilk kez 1995 yılında TNF (Tumor Necrosis Factor) süper ailesinin yeni bir üyesi olarak tanımlanmıştır. TRAIL ile etkileşim kurabilen beş reseptör mevcuttur; TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 ve osteoprotegerin. TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 apoptozisi indükleyen gerçek ölüm reseptörleri olarak fonksiyon görürken, TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 apoptozisi indükleyememekte ancak yalancı (dekoy) reseptör olarak görev yapmaktadır. TRAIL'ın sadece kanser hücrelerinde apoptozisi indüklemesi, normal hücrelerde aynı etkiyi göstermemesi kanser tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir. TRAIL'ın bir diğer özelliği ise p53'den bağımsız olarak apoptozisi indükleyebilmesidir. Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan radyoterapi ve kemoterapinin tümöre karşı etkisini gösterebilmesi p53 tümör baskılayıcı proteinin varlığını gerektirmektedir. Ancak insan tümörlerinin yarısından fazlasında, tümör oluşumu sırasında p53 geninde mutasyonlar ortaya çıkmaktadır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda tümör hücrelerinin önemli bir kısmında TRAIL'a karşı dirençlilik tespit edilmiştir. Ancak ortaya çıkan bu dirençliliğin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda adenovirüs vektör sistemi kullanılarak, A549 akciğer kanser hücre hattının TRAIL'a karşı duyarlı olup olmadığını belirlemesi, bir dirençlilik söz konusu ise bu direncin kırılması için TRAIL ile birlikte NF-κB (Nuclear Factor Kappa B) inhibe edici bütünleştirici bir gen tedavi modelinin geliştirilmesi ve TRAIL dirençliliğine sebep olan moleküler mekanizmanın aydınlatılması amaçlanmaktadır. TRAIL dirençliliğine neden olan moleküler mekanizmanın aydınlatılması ise gerek akciğer kanseri gerekse diğer kanserlere karşı TRAIL aracılı etkin gen tedavi modellerinin geliştirilmesini sağlayacaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünyada hem kadınlarda hem de erkeklerde en fazla ölüme sebebiyet veren kanser türüdür. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2004 yılı verilerine göre akciğer kanserinden ölenlerin sayısı 160,440 ve yeni belirlenen vaka sayısı ise 173,770'dir (1). Dünyada her yıl yaklaşık olarak 1 milyon kişi akciğer kanserinden ölmektedir (2). Ülkemizdeki durumu bildiren en kapsamlı veri Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesinin 1997 yılında yayınlanan raporudur. Bu rapora göre akciğer kanseri günümüzde kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci en önemli ölüm nedenidir. Türkiye'deki tüm kanser çeşitleri içinde en sık görülen % 17.63 oranı ile akciğer kanseridir. Akciğer kanseri erkeklerde % 25.7 görülme oranı ile ilk sırada, kadınlarda ise %3.9 ile meme ve uterus kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır (3). GATA Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı'nın 1995-99 yılı hasta kayıtlarına göre ise görülme oranı erkeklerde %27.7 ve kadınlarda %7.2'dir (4).

Akciğer kanseri küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK) olmak üzere iki ana histolojik tipe ayrılır (5). Akciğer kanserlerinin yaklaşık % 80'inini KHOAK, %20'sini ise KHAK oluşturmaktadır (6).

2.1.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Akciğer kanserinin en agresif tipidir. Bu tümörün vasküler infiltrasyon, yoğun hiler, mediastinal ilerleme ve erken hematogen yayılma özellikleri nedeniyle hastaların beş yıl yaşama oranı % 1'den azdır. Hücreler küçüktür, yoğun olarak bir arada bulunurlar. Sarkoma veya lenfomaya benzeyen bu küçük hücreler füziform, poligonal, yulaf (lenfosit benzeyen) vb şeklindedir. Bu hücreler farklılaşmamıştır, ilgili doku hücrelerinden ve birbirinden ayrılmaları güçtür. Sigara içilmesiyle yakın ilişkisi vardır.

2.1.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin yassı epitel hücreli (epidermoid) karsinoma (%25), adenokarsinoma (%30) ve büyük hücreli karsinoma (%15) olmak üzere üç alt tipi mevcuttur (7-11).

2.1.2.1. Yassı Epitel Hücreli (Epidermoid) Karsinoma

Skuamöz hücre karsinoma adı da verilir. Erken tanı, rezeksiyon endikasyonu ve beş yıllık sağkalım oranı diğer 3 gruba göre daha yüksek olduğu gibi uzak metastaz olasılığı da en azdır. Çoğunlukla santral lokalizasyonlu olup, periferik lokalizasyona da sahiptir. Erkeklerde daha fazla görülen, sigara ile kesin ilişkisi bulunan, ülkemizde en sık rastlanan akciğer kanseri tipidir. Keratinize yassı epitel hücreleri ilgili doku hücrelerinden belirli olarak ayrılırlar, farklılaşmıştır, kolayca tanınır (7-11).

2.1.2.2. Adenokarsinoma

Adenokarsinomaların 3/4'ü akciğerde periferal lokalizasyonludur. Bu tümörün küboid ve silindirik hücreleri glandüler bir görünüm oluşturur. Kadınlarda daha sık görülen kanser tipidir.

Terminal bronşiyal ve alveolar bölgelerdeki Clara hücrelerinden veya tip II pneumositlerden kaynaklanan **bronkoalveolar karsinom**, adeno kanserin bir alt tipi olmasına rağmen klinik, radyolojik ve tedavi özellikleri bakımından farklıdır (7-11).

2.1.2.3. Büyük Hücreli Akciğer Kanseri

Epidermoid, adeno ve küçük hücreli karsinom özelliklerinden hiçbirini göstermeyip, büyük nükleuslu, iyi sınırlı ve farklılaşmamış epitelyal kökenli malign tümörler olarak tanımlanırlar. Son yıllarda bazı araştırmacılar bu tipi adenokarsinom ve skuamöz karsinomun değişik bir biçimi olarak görme eğilimindedirler. Sigara ile yakın ilişkisi vardır (7-11).

Akciğer kanserine karşı günümüzde uygulanan tedavi yöntemlerinden, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapideki gelişmelere rağmen, tanı konduktan sonra akciğer kanserli bireylerin ancak % 15'i 5 yıldan fazla yaşayabilmektedir (12). Bu nedenle, akciğer kanserine karşı acil olarak yeni ve radikal bir tedavi şekline ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. Akciğer Kanserinde Genetik Değişimler

Karsinogenez çok basamaklı bir süreçte değişik karsinojenlerin (kimyasal, fiziksel ve viral) genetik ve epigenetik etkileri ile gerçekleşir. Kanserde oluşan genetik değişiklikler kromozomal düzeyde yada tek bir nükleotid düzeyinde (tek ya da çoklu baz değişiklikleri ya da DNA promotör bölge metilasyonu) oluşabilir. Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler (onkogenler, tümör baskılayıcı genler), konakçı faktörleri (enzim polimorfizmi) ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) sonucunda tümöral kitle oluşur.

Karsinogenezdeki temel genetik olaylar şöyle sıralanabilir (13):

- I. Onkogenlerin aktivasyonu
- II. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu
- III. Hücre döngüsü kontrolünde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- IV. DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- V. Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler
- VI. Metastatik ve metastaz baskılayıcı genlerdeki değişiklikler.

2.2.1. Onkogenlerin Aktivasyonu

Protoonkogenler değişik yollarla aktive olarak onkogen haline gelirler. Genin yapısal bir bölgesinde ortaya çıkan değişiklik sonucu farklı fonksiyon gören bir protein sentezlenir. Bir başka mekanizma da, genin ekspresyonunu düzenleyen bölgede oluşan bir değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına karşın sürekli olarak uyarılma sonucu gen ürününün aşırı miktarda üretilmesidir (13).

Ras proto-onkogen ailesi (K-Ras, H-Ras ve N-Ras), plazma membran proteinlerini kodlar. Ras proteinleri, membranda bulunan Guanozin trifosfataz (GTPase) aktivitesine sahiptir ve hücre membranından nükleusa sinyal transdüksiyonunda ve hücre büyümesinde rol oynar. Ras genleri nokta mutasyonları ile akciğer kanserlerinin bir kısmında aktive edilirler. K-Ras, akciğer kanserinde en sık aktive edilen gen olup, genellikle kodon 12'deki, bazen de kodon 31 ve 61'deki mutasyonuyla aktive olur (14). K-Ras mutasyonlarına akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %20-30'unda, tüm KHOAK'lerinin %15-20'sinde, KHAK'lerinin ise çok küçük bir kısmında rastlanmaktadır (12, 14). N-Ras ve H-Ras'da mutasyonlar oldukça nadirdir ve akciğer kanserlerinin %1'inden daha azında görülür. K-Ras mutasyonu sağ kalımda azalma, erken relaps ve kötü prognozla ilişkilidir. K-Ras mutasyonu sigara içimi ile ilişkilendirilmektedir (15).

Myc proto-onkogen ailesi, hücre bölünmesinden sorumlu olan diğer genlerin transkripsiyonunu düzenlemede görevli fosfoproteinleri kodlar. Nokta mutasyonları ile aktive edilen Ras onkogenlerinin aksine myc onkogenlerinin mutasyonları nadirdir. Aktivasyon, gen amplifikasyonu veya transkripsiyonel düzenlenmedeki bozukluktan kaynaklanan proteinin aşırı ekspresyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkar. KHAK'lerinin yaklaşık %18-31, KHOAK'lerinin ise %8-20'sinde myc aktivasyonu izlenir (16).

Akciğer kanserinde ERBB1 (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü) ve HER2/neu oldukça önemlidir (16). ERBB1 bilinmeyen bir mekanizma ile aşırı eksprese edilip, akciğer kanser hücrelerinde aktive edilmektedir. Özellikle yassı hücreli akciğer kanserlerinde aşırı ekspresyonu görülür (13, 14). ERBB ailesinin diğer üyesi Her2/neu, KHOAK'lerinin (özellikle adenokarsinomalar) yaklaşık %30'unda eksprese edilmektedir (16).

Tümör hücreleri, normal hücrelerde olmayan, hücre sel harabiyet ya da DNA hasarı gibi durumlarda fizyolojik bir yanıt olan programlı hücre ölümünden kaçabilme yeteneğine sahiptirler. Normal apoptotik yolun en önemli katılımcıları Bcl-2 protoonkogeni ile p53 tümör baskılayıcı genin ürünleridir. Bcl-2 hücreleri apoptozisten korur. Çalışmalar, Bcl-2 protein ekspresyonunun KHAK'lerinde KHOAK'den çok daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bcl-2 protein ekspresyonu KHAK'lerinin %70-90'ında gösterilmiş ve uzun süreli sağkalım ile ilişkisi ortaya konmuştur (13, 14).

2.2.2. Tümör Baskılayıcı Genlerin İnaktivasyonu

p53 tümör baskılayıcı gen mutasyonları akciğer tümörigenezisinde önemli rol oynamaktadır ve KHOAK'lerinin yaklaşık %50'sinde ve KHAK'lerinin %70'inden fazlasında ortaya çıkmaktadır. Akciğer kanserlerinde tanımlanmış mutasyonların pek çoğu yanlış anlamlı mutasyonlardır. Genin 157, 248 ve 278. kodonlarda meydana gelen mutasyonlar akciğer kanseri açısından önem taşır. Akciğer kanserindeki p53 mutasyonları sigara içimi ile bağlantılıdır. Bu mutasyonların çoğu sigara dumanındaki karsinojenlerin neden olduğu düşünülen G-T transversiyonlarıdır (15, 17).

p16-siklin D1/CDK 4-6-RB yolu hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişinde önemli görevlere sahiptir. Bu yoldaki proteinlerin fonksiyon bozukluğu mitojenik aktivite ile sonlanır. Bu yoldaki proteinlerden biri olan p16 geni promotör hipermetilasyonu (%25), homozigot delesyonlar (%10) veya nokta mutasyonları (%40) ile KHOAK'de yaygın olarak değişmiştir (18). RB (retinoblastoma) protein yokluğu KHAK'lerinin hemen hemen hepsinde görülürken, KHOAK'lerinin sadece %10-30'unda görülür. Siklin D1, siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) ile fosforilasyonu uyararak RB aktivitesini baskılamaktadır; bu nedenle Siklin D1'in aşırı ekspresyonunun KHOAK hücrelerinin büyümesini kontrol eden RB'nin yıkımında alternatif bir yol olduğu düşünülmektedir. Siklin D1 KHOAK hücrelerinin %27-47'sinde aşırı eksprese edilir ve bazı olgularda kötü prognozun göstergesidir (16).

FHIT (Frajil Histidin Triad) geni 3p14.2 kromozom bölgesinde lokalizedir. Akciğer kanserinde bu bölgenin hemizigot bazen de homozigot olarak delesyona uğradığı gösterilmiştir. FHIT gen anomalileri KHAK'lerinin %80'inde, KHOAK'lerinin ise %42'sinde gösterilmiştir. FHIT allel kaybının sigara içimi ve kötü prognozla ilişkili olduğu da gösterilmiştir (19, 20).

2.2.3. Akciğer Kanserindeki Diğer Genetik Değişimler

2.2.3.1. Kromozom Abnormaliteleri

Kromozom 1p, 1q, 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 11p, 11q, 14q, 17q, 18q, ve 22q tümör baskılayıcı genlerin sıklıkla lokalize oldukları bölgelerdir. Bu bölgelerdeki homozigot delesyonlar ile tümör baskılayıcı genler inaktive olmaktadır. Akciğer kanserinde sık görülen kromozom değişiklikleri 1p, 3p, 9p ve 17p'dedir. Tümör hücre kültürlerinde ve KHAK'de en sık görülen mutasyon şekli kromozom 3'ün her iki kısa kolunda meydana gelen kayıplardır. 3p delesyonuna KHAK'lerinin %100'ünde, KHOAK'lerinin ise %50'sinde görülmektedir. 3p ve 9p kayıpları erken dönemde oluşurken; 2q, 18q ve 22q kayıpları geç dönemde görülür. Yassı hücreli kanserlerde 4q, 9q, 21q bölgelerindeki kayıplar siktir (13).

2.2.3.2. Mikrosatellit Değişimler

Akciğer kanserinde mikrosatellit değişiminin sıklığı KHAK'lerin yaklaşık %35'inde, KHOAK'lerinin %22'sinde bildirilmektedir. Mikrosatellit değişimlerinin daha çok genç yaşla, azalmış sağkalımla ve ileri tümör evresi ile birlikte olduğu belirtilmektedir (14).

2.2.3.3. Telomeraz Aktivitesi

İnsan telomerleri kromozomların uçlarında yerleşmiş TTAGGG dizi tekrarlarından oluşan spesifik yapılardır. Normal bir hücre bölünmesinde telomeraz yoktur ve bu sayede telomerler hızla kısalır ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşir. Bu mekanizma hücre ömrünü belirleyen bir saat gibidir. Ancak kanser hücresinde telomeraz aktivitesi nedeniyle kısalan telomerlerin hemen heksamerik yapılarla tamamlandığı görülür. Bu durum hücreyi ölümsüz kılar. Tüm KHAK'lerinde ve KHOAK'lerinin %80-90'ında artmış telomeraz aktivitesi mevcuttur. Bu durum hücre bölünme hızında artış ve ileri evre ile ilişkilidir (15, 21).

2.2.3.4. Hatalı Metilasyon

DNA metilasyonu, gen ekspresyonunu düzenlemede önemli rol oynamaktadır. DNA metilasyon anormallikleri insan neoplazmalarında sürekli işe karışan bir mekanizmadır. 5' CpG adacıklarında promotör bölgenin hipermetilasyonu transkripsiyonel olarak sessizleşebilir ve böylece RB, p16 gibi tümör baskılayıcı genler inaktif hale gelebilir. KHOAK'lerinde p16'nın hipermetilasyonu, p16 ekspresyonunun baskılanmasını sağlar ve bu akciğer kanserinin gelişiminin erken döneminde olur. Akciğer kanserinde bir seri genin metilasyona gittiği görülmüştür. Bu durum normal akciğerde yoktur. Yirmi iki hastayı içeren küçük bir seride, normal akciğer dokusunda olmayıp KHOAK'de olduğu gözlenen metilasyon oranları p16'da %41, DAP kinazda %23, glutatyon S transferaz'da (GSTP1) %9, MGMT'de %27'dir. Akciğer kanserinde hipermetilasyonun diğer bölgesel yerleşimleri de bulunmuştur. Bunlar 3p, 4q34, 10q24 ve 17p13'dedir. Ancak bu bölgelerdeki tam gen hedefleri belirlenememiştir (14, 15).

2.3. Kanserde Ölüm Ligantlarının Kullanımı

Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Embriyonik dönemden başlayarak tüm yaşam boyunca programlı hücre ölümü vardır. Apoptozisin kontrolündeki herhangi bir bozukluk kanser başta olmak üzere pek çok hastalığın gelişimine neden olmaktadır (22, 23).

Günümüzde kansere karşı en sık kullanılan tedavi şekilleri kemoterapi ve radyoterapidir. Bu iki tedavi metodunun da tümöre karşı etkisini gösterebilmesi, p53 tümör baskılayıcı proteininin varlığını gerektirmektedir (24). Ancak, akciğer kanserlerinde % 80 oranında p53 geninde mutasyonlara rastlanmaktadır (25). Sonuç olarak, p53 proteini olmayan tümörler, hem kemoterapi hem de radyoterapiye karşı direnç göstermektedir (26). Ancak, ölüm ligantlarının apoptozisi p53'ten bağımsız olarak indüklediği gösterilmiştir (27). Ölüm ligantları, TNFalfa, FasL/CD96/Apo1L, TRAIL/Apo2L ve TWEAK/DR3/Apo3L'den oluşan Tümör Nekrozis Faktör (TNF) ailesi üyeleridir. Bu ligantlar ölümü indükleyici membran reseptörlerine bağlanarak kaspaz-8 veya 10'un aktivasyonu aracılığıyla apoptozisi indükleme yeteneğindedirler. Test edilmiş ölüm ligantlarından TNF (28) ve FasL (Fas Ligand)'ın (29) kanser hücrelerinde etkili bir şekilde apoptozisi indükledikleri gösterilmiştir. Fakat, sistemik toksisiteye neden olmalarından dolayı bu ligantların kanser gen tedavisinde kullanımı sınırlıdır.

2.4. TRAIL

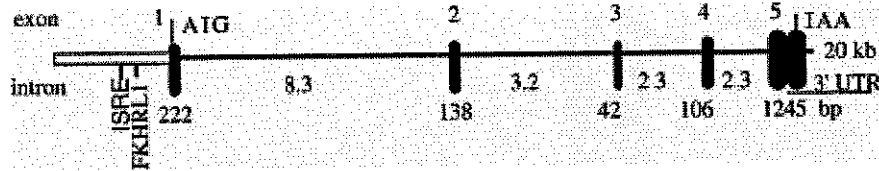
Direkt olarak apoptotik sinyali başlatabilme yeteneğinde olan TRAIL, ilk kez 1995 yılında TNF ailesinin yeni bir üyesi olarak tanımlandı (30). Bu protein, bağımsız olarak bir diğer grup araştırmacı tarafından da keşfedildi ve Apo2 Ligand (Apo2L) olarak isimlendirildi (31).

TRAIL'in iki önemli özelliği mevcuttur. Bu özelliklerinden ilki TRAIL'in tümörojenik veya transforme olmuş hücrelerde seçici olarak apoptozisi indüklemesi, buna karşın normal hücrelerde apoptozisi indüklememesidir. TRAIL'in bu özelliği, kanser tedavisinde uygulanmasına olanak sağlamaktadır. İkinci özelliği ise, TNF ailesi üyelerinin aksine, aktive edilmiş hücrelerde sıklıkla sadece geçici olarak eksprese edilmesidir (32).

2.4.1. TRAIL Geni ve Proteini

TRAIL geni yaklaşık olarak 20 kb uzunluğundadır ve beş ekzondan oluşur (Şekil 2.1) (33). İnsanda 3q26 kromozom bölgesinde lokalizedir (34).

TRAIL yada diğer adıyla Apo2L sitoplazmik membran içinde integre olarak bulunan 281 aminoasitten oluşan sitotoksik bir ligandır. TRAIL bir tip II transmembran proteini ve C-terminal ekstrasellular domaini diğer TNF süperailisi üyelerine yapısal ve fonksiyonel özellikler bakımından açık bir şekilde homoloji göstermektedir. (34, 35). TRAIL mRNA' sı dalak, akciğer ve prostat gibi insan vücudunun pek çok dokusunda eksprese edilmesine rağmen, beyin, testis ve karaciğerde eksprese edilmemektedir (36).



Şekil 2.1. İnsan Apo2L/TRAIL geninin şematik gösterimi (33).

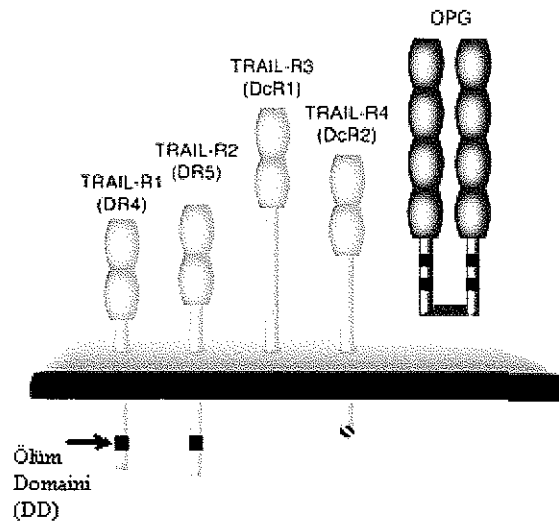
2.4.2. TRAIL Reseptörleri

Şimdiye kadar TRAIL ile etkileşim kurabilen beş farklı reseptör tanımlanmıştır; TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 ve Osteoprotegerin (OPG) (Şekil 2.2) (37). Bu reseptörlerden üçü TRAIL-R1, TRAIL-R2 ve TRAIL-R4 TNF reseptör (TNFR) ailesinin diğer üyelerine homolog, klasik tip I transmembran proteinleridir. Ölüm reseptörleri olarak adlandırılan TRAIL-R1 (38) ve TRAIL-R2 (39) intrasellular bölgelerinde sahip oldukları ölüm domaini sayesinde apoptozis için sinyal geçişine izin vermektedirler. Aksine, TRAIL-R4 (40) tam olmayan bir ölüm domaini içermektedir ve bu yüzden bir ölüm sinyali oluşturma yeteneğinde değildir. Benzer şekilde, TRAIL-R3 (39), sitoplazmik domainden yoksundur ve bir glikozil-

fosfatidil inozitol (GPI) ankor aracılığı ile hücre yüzeyine bağlıdır, bu bağlanma apoptozise aracılık etmez (33). TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 yalancı (dekoy) reseptörler olarak da adlandırılmaktadır (41). TRAIL'ın beşinci reseptörü bir yalancı reseptör olarak hareket edebilen ve apoptozisi indükleyemeyen osteoprotegrindir (42). OPG fizyolojik sıcaklıkta TRAIL'a karşı oldukça düşük bir affiniteye sahiptir. Çizelge 2.1'de TRAIL/Apo2L'nin reseptörleri ve kromozom lokalizasyonları özetlenmiştir (33).

Çizelge 2.1. TRAIL reseptörleri ve kromozom lokalizasyonları (33).

TRAIL Reseptörleri	İnsan Genomunda Kromozomal Lokalizasyonları
DR4, TRAIL-R1, TNFRSF10A	8p21
DR5, Apo2, TRAIL-R2, KILLER/DR5, TRICK2, TNFRSF10B	8p22-p21
DcR1, TRAIL-R3, TRID, TNFRSF10C	8p22-p21
DcR2, TRAIL-R4, TRUNDD, TNFRSF10D	8p21
OPG, OCIF, TNFRSF11B	8q24



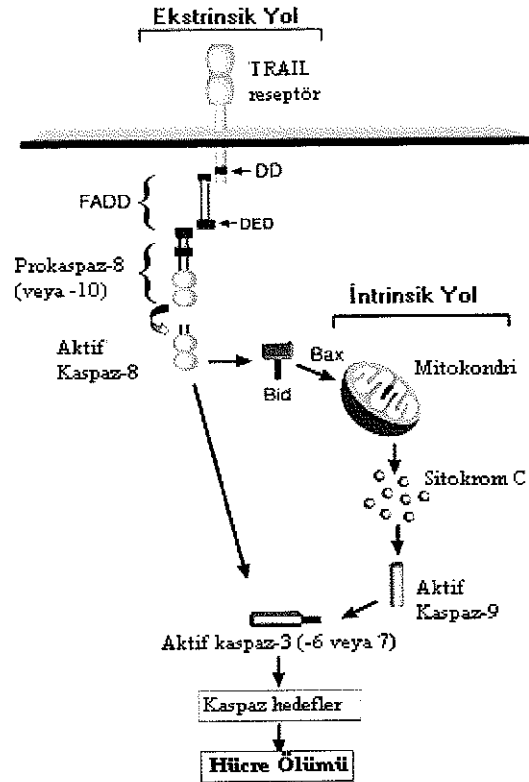
Şekil 2.2. TRAIL reseptörlerinin şematik gösterimi (43).

2.4.3. TRAIL Sinyal Yolu

Memeli hücrelerinde apoptotik programı başlatan iki ana sinyal yol tanımlanmıştır. Bunlar intrinsik ve ekstrinsik sinyal yollarıdır (Şekil 2.3)

Hücrede ekstrinsik yol TNF süper ailesinin üyeleri tarafından başlatılmaktadır. TNF süper ailesinin bir üyesi olan TRAIL'ın TRAIL-R1/DR4 ve TRAIL-R2/DR5 reseptörleri birer ölüm domainine sahiptir. TRAIL ligandı ile bu ölüm reseptörlerinin ilişkisi reseptör trimerizasyonu ve ardından FADD (Fas-associated death domain) olarak adlandırılan adaptör proteinin çağırılması ile sonuçlanır. FADD, biri ölüm domaini (DD) ve diğeri ölüm efektör domaini (DED) olmak üzere iki protein interaksiyon domaininden oluşur. FADD, ölüm domainleri arasındaki etkileşimler aracılığı ile reseptöre, ölüm efektör domaini etkileşimleri ile de pro-kaspaz 8 veya pro-kaspaz-10'a bağlanır. Sonuç olarak, ölümü- indükleyici sinyal kompleksi (DISC) olarak adlandırılan bir reseptör kompleksi oluşur. Aktif hale gelen kaspaz-8 veya kaspaz-10 hücreyi apoptozise götüren kaspaz-3 gibi efektör kaspazları aktive eder. Bu durum hücrenin geri dönüşümsüz olarak apoptozise gidişi ile sonuçlanır.

Hücrede intrinsik yol, DNA hasarı, hücre döngüsü kontrol noktası defektleri, yaşamsal faktörlerin kaybı veya diğere hücrestreslere karşı yanıtta apoptozisi başlatılmaktadır. Bu yol, Bcl-2 geni süper ailesinin pro-apoptotik kolunun aktivasyonunu kapsar. Intrinsik yolda kritik bir adım, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesi olan Bax'ın aktivasyonu ve mitokondriye translokasyonudur. Bax'ın mitokondriye translokasyonu mitokondriyal transmembran potansiyelinin dağılımına ve sitozole sitokrom c'nin salınımına yol açar. Sitozolda, sitokrom c adaptör Apaf-1'e bağlanarak apoptozom'un oluşumunu sağlar. Oluşan apoptozom, başlatıcı bir kaspaz olan kaspaz 9'u aktive eder. Kaspaz 9, derhal efektör kaspazlar -3, -6 ve -7'yi aktive eder. Effektör kaspazların aktivasyonu ise hücrenin geri dönüşümsüz olarak apoptozise gidişi ile sonuçlanır. Üç Bcl-2 homoloji domaini içeren (BH1-3) Bax veya onun homoloğu Bak gibi Bcl-2 ailesinin multi-domainli pro-apoptotik üyeleri, Bcl-2 veya ilave bir BH-4 domaini içeren Bcl-XL ile engellenebilmektedir. Bcl-2 ailesinden, Bid, Bik, Bim, NOXA ve PUMA gibi proteinler sadece BH-3 domainine sahiptir. Bu proteinler aktivitelerini artırmak için pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri ile ilişkiye girer. Kaspaz 8 tarafından Bid bir kez kırıldığında, Bid mitokondriye transloke olur, Bax ve Bak'ı aktive eder. Böylece ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yollar arasındaki çapraz geçiş için bir mekanizma sağlanmış olur (33, 41, 44).



Şekil 2.3. Apo2L/TRAIL aracılığı ile ekstrinsik ve intrinsik yolların aktivasyonu (43)

2.4.4. Kanserde TRAIL İndüklü Apoptosise Karşı Dirençlilik Mekanizmaları

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, pek çok insan tümör hücre hattının TRAIL tarafından indüklenen apoptozise karşı duyarlı, fakat normal hücrelerin pek çoğunun dirençli olduğunu göstermiştir. Ancak normal hücreler ve belirli tümör hücrelerindeki dirençliliğin nedeni tam olarak açıklanamamıştır. Bu dirençlilikle ilişkili potansiyel mekanizmalar düşünülmektedir.

2.4.4.1. TRAIL Reseptörleri ve TRAIL Dirençliliği

Şimdiye kadar beş farklı TRAIL reseptörü tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi agonistik TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 ölüm reseptörleri ve diğer üçü antagonistik yalancı reseptörler TRAIL-R3, TRAIL-R4 ve osteoprotegrindir. TRAIL-R1 ve TRAIL-R2, TRAIL'in bağlanmasını sağlayan ekstrasellular domainlerinden başka TRAIL'in bağlanması ile birlikte apoptotik sinyali başlatabilen intrasellular ölüm domainlerini içermektedir. Diğer taraftan TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 ölüm domaininden yoksun olmaları veya fonksiyonel olarak tam olmayan bir ölüm domainine sahip olmaları nedeniyle apoptotik sinyalin geçişine izin vermezler. Üçüncü dekoky reseptör Osteoprotegrin, TRAIL'in çözülebilir bir antagonistik reseptörüdür. Osteoprotegrinin, TRAIL aracılı apoptozis sinyal yolundaki fonksiyonunun anlaşılabilmesi için daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır (44).

İnsanlarda, dekoky reseptörler çeşitli dokularda yaygın olarak eksprese edilmektedir. TRAIL-R4 mRNA ekspresyonu periferik kan lökositleri, ovaryum, prostat, timus, dalak, kolon ve ince bağırsağı da kapsayan tüm dokularda

bulunmasına rağmen, TRAIL-R3 mRNA'sı periferik kan lökositleri, ovaryum, testis, prostat, timus, dalak, karaciğer, akciğer, plasenta, kalp, böbrek ve kemik iliğinde belirlenmiştir. Test edilen insan dokularının pek çoğunun aynı zamanda TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 agonistik ölüm reseptörlerindeki ekspresyonu belirlenmiştir. Yabancı reseptörleri ve ölüm reseptörlerini birlikte ekspresyon eden normal dokuların hemen hepsi TRAIL-indüklü apoptozise karşı dirençli olarak bulunmuştur. Bazı kanser hücre hatlarında da TRAIL-R3 veya TRAIL-R4'ün ektopik ekspresyonu nedeni ile de TRAIL-indüklü apoptozise karşı duyarlılığın azaldığı gözlemlenmiştir. Bu yüzden TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 ekspresyonunun TRAIL-indüklü apoptozisten normal hücreler ve dokuları koruyabileceği düşünülmektedir. Ancak, şimdiye kadar çalışılmış kanserlerde TRAIL dirençliliği ve dekok reseptör ekspresyonu arasında herhangi bir bağlantı kurulamamıştır. Bir çalışmada, TRAIL dirençli melanoma hücre hattı WM3211'in TRAIL-R2 mRNA ekspresyonu belirlenmesine rağmen, TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 bulunamamıştır. Aksine, üç TRAIL-duyarlı melanoma hücre hattında (WM9, WM793 ve WM1205) TRAIL-R3, TRAIL-R4 veya her ikisinin birden ekspresyon edildiği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise, test edilmiş 18 nöroblastoma hücre hattının sadece beşi TRAIL'a karşı duyarlı olmasına karşın bu beş hücre hattının hepsinin TRAIL-R3, TRAIL-R4 veya her ikisini birden ekspresyon ettiği belirlenmiştir. Bu bulgular kanserde, TRAIL dirençliliğine neden olan dekok reseptörlerden başka bazı mekanizmalarında var olduğunu düşündürmektedir (44, 45).

2.4.4.2. DISC Oluşumu ve TRAIL Dirençliliği

DISC'in oluşumu, TRAIL indüklü apoptozisin sinyal yolunda erken dönemde gerçekleşen moleküler bir olaydır. TRAIL, TRAIL ölüm reseptörleri, FADD, kaspaz-8 veya kaspaz-10 ve c-FLIP'i içeren birkaç molekül DISC oluşumuna katılmaktadır. DISC'in pek çok bileşeni TRAIL indüklü apoptozis için temeldir ve bu DISC bileşenlerinin herhangi birinde fonksiyon bozukluğunun TRAIL dirençliliğine yol açabileceği düşünülmektedir (45).

2.4.4.2.1. FADD

FADD, hem ölüm domaini hem de ölüm efektör domaini içeren bir adaptör moleküldür. FADD'ın ölüm sinyal transduksiyonundaki rolü ilk kez FasL-indüklü apoptoziste tanımlanmıştır. TRAIL sinyalleşmesinde FADD'ın önemi bir hayli karmaşıktır. Farklı gruplar tarafından TRAIL-duyarlı hücre hatlarına FADD dominant negatif yapı (FADD-DN) verildiğinde, FADD bağımlı ve diğerleri FADD bağımsız TRAIL ile aktive edilmiş apoptozis aktivasyonunu göstermeleri nedeniyle birbirine zıt sonuçlar elde edilmiştir. FADD yoksun hücre hatları kullanılarak yapılmış bir çalışma, homozigot olarak FADD yoksun (FADD^{-/-}) fare embriyonik fibroblastlara geçici transfeksiyon ile TRAIL-R1'in aşırı ekspresyonunun bu hücrelerde apoptozisi indüklediğini göstermiştir. Çalışmanın sonucuna bağlı olarak yazarlar FADD'ın TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 aracılı apoptozis için gerekli olmadığını belirtmişlerdir. TRAIL duyarlı hücre hatlarında geçici transfeksiyon yoluyla TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin aşırı ekspresyonunun sağlanmasının TRAIL ligandından bağımsız olarak apoptozise yol açabildiği daha önce gösterilmiştir. Fakat bir başka çalışmada FADD^{-/-} embriyonik fibroblastlar fare ve insan TRAIL ölüm reseptörleri ile transfekte edildiğinde TRAIL-indüklü hücre ölümüne karşı dirençli olduğu, fakat

retroviral bir yapı ile yeniden FADD oluşturulan FADD -/- fibroblastlar fare TRAIL ölüm reseptörleri ile transfekte edildiğinde ise TRAIL-indüklü apoptozise karşı tamamen duyarlı hale geldiği gözlenmiştir. Bu çalışmada ise sonuç olarak FADD'ın TRAIL- indüklü apoptoziste temel olduğu ve onun fonksiyon kaybının TRAIL dirençliliğine sebep olabileceği belirtilmiştir (45).

2.4.4.2.2. Kaspaz- 8

Kaspaz-8 ekspresyon kaybının TRAIL dirençliliğine yol açabileceği düşünülmektedir. Bununla ilgili ilk kanıt, Jurkat hücrelerin, yabancı tipinde TRAIL' a duyarlı olmasına karşın, kaspaz-8 yoksun halde TRAIL' a karşı tamamen dirençli olduğunun gösterilmesidir. İkinci olarak, spesifik kaspaz -8 inhibitör Z-IETD-FMK pek çok TRAIL-duyarlı hücre hattında TRAIL indüklü apoptozisi inhibe etmiştir. Buna karşın, Z-IETD-FMK özellikle yüksek dozlarda diğer kaspazları inhibe edebildiğinden dolayı siRNA gibi daha özgün bir yaklaşımın kullanımının gerekli olduğu düşünülmektedir. Bir başka örnek çalışma ise, Ewing's tümör, nöroblastoma, beyin tümörleri, melanoma ve küçük hücreli akciğer kanserini kapsayan birkaç kanser hücre hattında gerçekleştirilmiştir. Bu hücre hatlarında TRAIL-indüklü apoptozise dirençlilik, kaspaz-8 ekspresyonunun yokluğu ile ilişkili olarak gösterilmiştir. Ayrıca, bu dirençli hücrelerde kaspaz-8 ekspresyonunun düzeltilmesi onları TRAIL' a karşı duyarlı hale çevirmiştir (44, 45).

2.4.4.2.3. C-FLIP

c-FLIP (cellular-FLICE inhibitory protein), kaspaz-8 ve kaspaz-10'a homoloji gösteren, ancak proteaz aktivitesinden yoksun bir proteindir (38). c-FLIP bir uzun (c-FLIP_L) ve bir kısa (c-FLIP_S) splice varyanttan oluşur ve her ikisinde ölüm-reseptör indüklü apoptozisten hücreleri koruma yeteneğindedir (32). c-FLIP_L , iki DED ve bir kaspaz- benzeri domain içerir. Fakat, katalitik aktivite için temel olan sistein dizisinden yoksun domaini nedeniyle kaspaz yolunu aktive edemez. c-FLIP_S'de iki DED domain içerir, fakat kaspaz-benzeri domainin hemen hemen tümünden yoksundur. Hem c-FLIP_L hemde c-FLIP_S, DED-DED interaksyonları aracılığı ile ya FADD ya da kaspaz-8'e bağlandıkları yer olan DISC'e çağrılabilirler. Bu da kaspaz-8 aktivasyonunun inhibisyonu ve buna bağlı olarak apoptozisin inhibisyonu ile sonuçlanır (45). Melanomalarda yapılan çalışmalarda, TRAIL dirençli melanomalarda FLIP ekspresyonu bir hayli yüksek olarak belirlenmesine rağmen, TRAIL duyarlı melanomalarda ekspresyonu çok düşük olarak belirlenmiş ya da hiç belirlenmemiştir. Üstelik, TRAIL dirençli melanomalara aktinomisin-D'nin verilmesi, TRAIL duyarlılığının etkinliği ile korele olan FLIP'in hücre içi konsantrasyonlarında azalma ile sonuçlanmıştır (44).

2.4.4.3. NF-κB ve TRAIL Dirençliliği

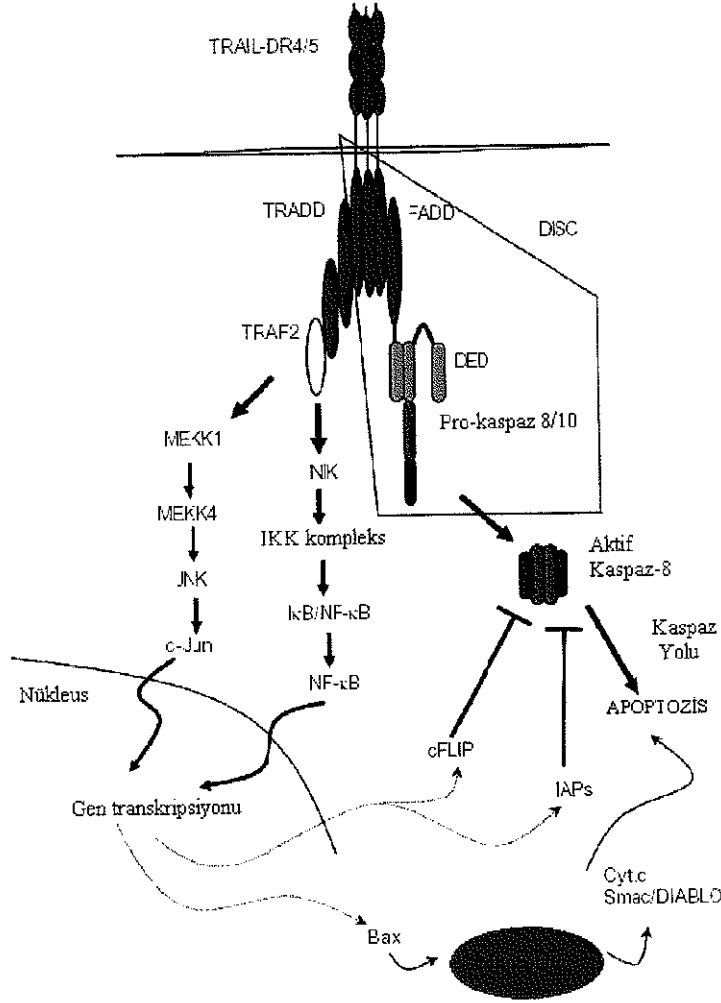
Rel veya NF-κB, ilk kez mürin B lenfositlerde kappa hafif zincir geninin ekspresyonunun bir regülatörü olarak tanımlanmış, fakat hemen arkasından pek çok farklı hücrede de belirlenmiştir (46). NF-κB, immün düzenlemenin kontrolü, inflamatuvar yanıtlar, hücre büyümesi ve apoptozise katılan bir transkripsiyon faktörüdür (47). NF-κB farklı alt ünitelerin homo- veya heterodimerlerinden oluşmaktadır. Bu alt üniteler yapısal olarak birbirleriyle ilişkili bir protein ailesinin (Rel/ NF-κB proteinleri) üyeleridir. Şimdiye kadar beş farklı Rel/ NF-κB

proteini tanımlanmıştır; NF- κ B1/p50, NF- κ B2/p52, cRelA/p65, RelB ve cRel. Bu proteinlerin tümü Rel Homoloji Domaini (RHD) olarak ta adlandırılan korunmuş bir N-terminal bölgesi içerir (48, 49). RHD, DNA bağlanması, dimerizasyon ve NF- κ B'nin intrasellular inhibitörü olan I κ B ile interaksyonundan sorumludur. RelA, RelB ve c-Rel NF- κ B-aracılı gen transaktivasyonu için önemli olan bir transaktive edici domain içerir. P50 ve p52'nin öncül molekülleri p105 ve p100'ün C-terminali I κ B ailesi üyelerinde bulunan ankrin tekrarlarının çoklu kopyalarını içerir (50).

Genellikle NF- κ B'nin aktive olmuş formu bir p65 ve bir de p50 altünitesinden oluşan bir heterodimerdir. Diğer altüniteler ise yine aktive olmuş NF- κ B'nin bir parçası olabilir ve NF- κ B'nin bu formları farklı hedef genleri aktive edebilir (46, 51). Uyarılmamış hücrelerde, NF- κ B proteinleri sitoplazmada I κ B (I κ B) olarak bilinen inhibitör bir protein ailesi ile ilişkilidir. Şimdiye kadar yedi I κ B tanımlanmıştır; I κ B-alfa, I κ B-beta, I κ B-gama, I κ B-epsilon, Bcl-3, p100 ve p105 (48). I κ B proteinler, I κ B'nin fosforilasyonu ve ardından ubiquitinasyonu için hedef olan bir N-terminal domaini, NF- κ B ile ilişkiye giren bir merkezi ankrin tekrar domaini ve protein düzeyinin devamlı korunmasından sorumlu bir C-terminal PEST domaini olmak üzere birkaç farklı domain içerir (52). Uyarılmamış hücrelerde, NF- κ B sitoplazmada I κ B α ve I κ B β 'ya bağlı olarak bulunmaktadır. NF- κ B yolunun aktivasyonu ile aktif hale gelen spesifik kinazlar I κ B kinaz (IKK) inhibitör proteinler I κ B'leri fosforile eder. Bu fosforilasyon N-terminal sinyal yanıt bölgesindeki Ser³² ve Ser³⁶ dan gerçekleşir. Fosforile edilmiş I κ B α , pI κ B α -ubiquitin E₃ ligaz tarafından poliubiquitinlenir ve hızlı bir şekilde proteosom tarafından parçalanır. I κ B'lerin parçalanması NF- κ B'nin serbest kalmasına yol açar (53, 54). Daha sonra NF- κ B bir transkripsiyon faktörü olarak hareket edeceği yer olan nükleusa transloke olur ve bir anti-apoptotik faktör olarak fonksiyon görür (Şekil 3.4) (55, 56).

TRAIL sinyalleşmesi üzerine NF- κ B'nin etkileri, NF- κ B aktivasyonunun hücreleri TRAIL aracılı apoptozisten koruduğunu gösteren ve buna zıt olarak NF- κ B'nin apoptozisi desteklediğini gösteren çalışmalar nedeniyle tartışmalıdır. Bu farklılıkların, NF- κ B altünitelerinin fonksiyon farklılıkları ve rölatif miktarlarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, cRelA altünitesinin aşırı ekspresyonu TRAIL muamelesi sonrası kaspaz-8, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 ekspresyonunu inhibe etmekte ve IAP1 ve IAP2 ekspresyonunu artırmaktadır. Diğer taraftan, cRel'in overekspresyonu TRAIL muamelesi sonrası TRAIL-R1, TRAIL-R2 ve Bcl-X_s ekspresyonunu artırmakta ve cIAP1 ve IAP2 ekspresyonunu inhibe etmektedir. Aktive olmuş NF- κ B moleküllerinde cRel ve cRelA'nın rölatif miktarlarının NF- κ B'nin apoptozisi mi yoksa canlılığı mı tercih edeceğini belirlediği gözlenmiştir. Bu yüzden, farklı NF- κ B alt ünitesinin ekspresyonlarının kontrolünün kanser tedavisi için bir strateji olabileceği düşünülmektedir (45). Diğer taraftan, TRAIL NF- κ B yolunu aktive edebilmekte ve NF- κ B'nin aktivasyonu ile TRAIL'in apoptozisi indüklemeye kabiliyeti sınırlanmaktadır. Bu yüzden, NF- κ B yolunun inhibisyonunun TRAIL-aracılı apoptozise karşı tümör hücrelerinin duyarlılığını arttırabileceği düşünülmektedir. NF- κ B yolunun aktivasyonu özel kinazlar (IKK) tarafından inhibitör proteinlerin fosforilasyonuna bağlıdır. IKK β , kinaz IKK'in

katalitik domainlerinden biridir ve NF- κ B'nin aktivasyonu ve in vivo apoptozisten koruma için temeldir. IKK β 'nin bu kritik rolü terapötik yaklaşımlar için potansiyel bir hedef oluşturmaktadır (57).



Şekil 2.4. TRAIL sinyal yolu ve NF- κ B ilişkisi (58)

2.4.5. TRAIL'ın Fizyolojik Rolü

Pek çok dokuda yaygın olarak sentez edilen TRAIL'ın biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır, fakat ligandın transforme olmuş hücre hatlarının bir kısmında apoptozisi başlatma yeteneği, onun tümör hücre apoptozisinin fizyolojik bir modülatörü olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda TRAIL mRNA'sı fetal akciğer, karaciğer ve böbrek, yetişkinlerde dalak, prostat, timus, ovaryum; ince bağırsak, kolon, periferik kan lökositleri, kalp, plasenta, akciğer, iskelet kası ve böbreği de kapsayan pek çok insan dokusunda belirlenmiştir.

Var olan bilgiler, bu apoptozisi indükleyici ligandın, onkojenik transformasyon ve viral olarak enfekte edilmiş hücrelere karşı immün cevapta önemli bir oyuncu olabileceğini düşündürmektedir. Sitotoksik CD4⁺ T hücreler ve NK (Natural Killer) hücreler ile hedefi-öldürmede TRAIL'ın da dahil olduğuna dair bilgiler mevcuttur. TRAIL geni knockout fareler ile yapılan çalışmalar, NK hücreler tarafından sağlanan antitümör etkide özellikle tümör oluşumu ve metastaza karşı konakçı savunmasında TRAIL'ın rolünü doğrulamaktadır. Ayrıca, TRAIL'ın, viral enfeksiyona karşı IFN (Interferon)-bağımlı konakçı savunmasının erken evresinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. (59, 60, 61).

2.5. Gen Tedavisi

Gen tedavisinin temel amacı, hücrelerin hastalığa yol açan eksik ya da kusurlu genleri yerine, sağlıklı kopyalarının hücreye yerleştirilmesidir (62). Gen tedavisi ilk kez 1970'li yılların başında, bilim adamlarının hatalı genlerden kaynaklanan kalıtsal hastalıkların tedavisi için "gen cerrahisi" fikrini öne sürmesi ile gündeme gelmiş ve bu tarihten itibaren gen tedavi fikri günümüze kadar gelişerek ulaşmıştır (63). İlk zamanlarda genetik hastalıkların tedavisi amacıyla planlanan gen tedavisi artık, kanser, AIDS gibi diğer pek çok hastalığın tedavisi için de kullanılmaya başlanmıştır.

2.5.1. Gen Tedavisinde Kullanılan Vektörler

Gen tedavisinde en önemli nokta genlerin etkili bir şekilde hücrelere aktarılabilmesidir. İdeal bir vektörün sahip olması gereken özellikler:

- Etkili olması ve kolay üretilmesi,
- Güvenli olması yani toksik veya immunojenik olmaması,
- Sürdürülebilir, düzenlenebilir ve tahmin edilebilir bir transgen ekspresyonu sağlaması,
- Hücre tipine göre vektörün hedeflenebilmesi,
- Bölünen ve bölünemeyen hücreleri enfeksiyona uğratabilmesi,
- Bölgeye özgül olarak entegrasyon sağlamasıdır (64, 65).

Kanser gen tedavisinde tümör hücrelerine gen aktarımında kullanılan iki ana tip vektör söz konusudur ki bunlar; viral vektörler ve fiziksel (viral olmayan) vektörlerdir. Viral olmayan vektörler çıplak DNA, polikationik polimerler ve lipozomları kapsamaktadır. Bu vektörler enjeksiyon yada partikül bombardımanı (gen silahı) aracılığı ile dokulara verilebilir. Hücrelerarası boşluğa ulaştıklarında, endositoz veya membranın geçici olarak delinmesi yoluyla sitoplazmaya hareket ederler. Füzyon proteinler veya hedefleyici elementlerin eklenmesi ile transdüksiyon etkileri geliştirilebilir. Nükleusa DNA'yı sokabilmek için, çeşitli proteinler ve nüklear lokalizasyon sinyalleri kullanılabılır. Stabilitiyi geliştirmek için ise viral elementler eklenebilir. Fakat, tüm bu avantajlara rağmen, viral olmayan vektörler, in vivo kullanımı sınırlandıran oldukça yüksek transdüksiyon etkileri nedeniyle sıkıntı oluşturmaktadırlar.

Gen tedavide kullanılan bir diğer grup vektörler viral vektörler yani virüslerdir. Milyarlarca yıllık evrim sonucunda virüsler, hedefledikleri hücrelere kendi genetik materyallerini aktarmak için etkili yöntemler geliştirmişlerdir, ne yazık ki bu işlem duyarlı organizmalarda hastalıkla sonuçlanmaktadır. Gen tedavide kullanılan viral vektörler, virüslerin hastalığa yol açan bu gen parçalarının çıkarılarak yerine, hastalıkları iyileştirmek amacıyla rekombinant genlerin yerleştirilmesi ile oluşturulmaktadır. En çok kullanılan viral vektörler, retrovirüsler, adenovirüsler, adeno-ilişkili virüsler (AAV) ve herpes virüslerdir (64, 66, 67).

2.5.1.1. Retroviral Vektörler

Retrovirüsler, revers transkriptaz genini içeren RNA genomuna sahip virüslerdir. Hücrelerin pek çoğunu enfeksiyona uğratabilirler fakat, nüklear membranı geçemediklerinden dolayı, sadece hücre bölündüğü zaman konakçı genomuna entegre olabilmektedirler. Tüm retrovirüsler, gag, pol ve env olmak üzere 3 temel protein içerir. Gag, kapsid, matriks ve integras oluşumunu sağlayan yapısal virion proteinleri, env ise yüzeyi üzerinde mevcut bulunan viral glikoproteinleri kodlamaktadır. İnsan gen tedavi çalışmalarında kullanılan retroviral vektörlerin pek çoğu MLV (Moloney Murine Virüs) kökenlidir. Sadece uzun terminal tekrarlar (LTR) ve paketleyici sinyal bırakılarak, protein kodlayıcı dizilerin tümü virüsten çıkarılabilmekte ve ilgili transgen yerleştirilebilmektedir. Retrovirüsler uzun süreli ekspresyon avantajlarının yanı sıra, düşük miktarda üretilebilmeleri, sadece bölünen hücreleri enfeksiyona uğratabilmeleri ve 9 kb'lik DNA taşıyabilme kapasitesine sahip olmaları nedeniyle bazı dezavantajları da taşımaktadırlar (64, 67, 68).

2.5.1.2. Adeno-Associated Viral Vektörler

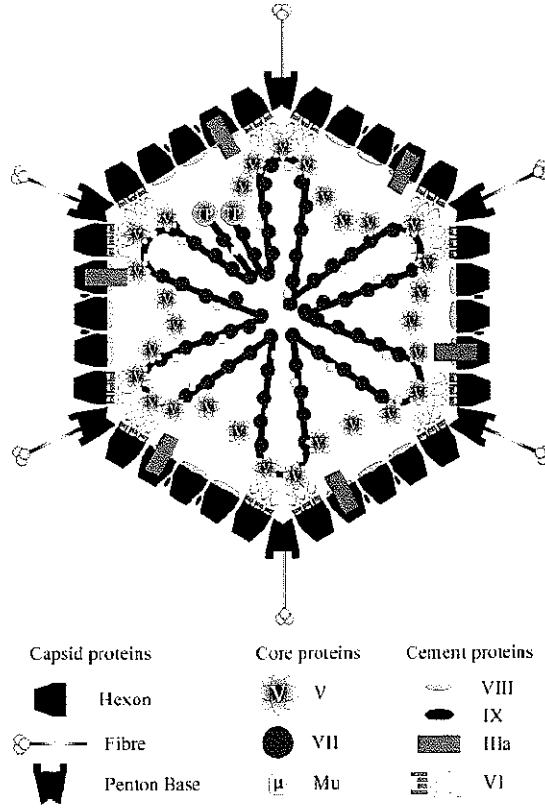
Adeno-Associated virüsler, zarfsız ikozahedral protein kapsidlerinden oluşan tek zincirli DNA virüsleridir (69). Sadece iki genden oluşan, 4,7 kb'lik genoma sahiptirler. Oluşturulan rekombinant vektör herhangi bir viral geni kodlamaz, bu nedenle yaygın olarak kullanılan diğer viral vektörlere göre daha az immünojeniktirler. Sahip olduğu genlerden Rep, replikasyon ve genomun korunması ile ilişkili yapısal olmayan bir proteini, Cap ise ikozahedral kapsid proteinini kodlar. Adeno-ilişkili virüslerin hem bölünen hemde bölünmeyen hücreleri enfeksiyona uğratabilmesi ve hastalık yapıcı olmaması avantajları arasında sayılırken, az miktarda üretilebilmesi ve DNA taşıyabilme kapasitesinin az olması dezavantajları arasındadır (70, 71).

2.5.1.3. Adenoviral Vektörler

Adenoviral vektörler, gen tedavide en yaygın olarak kullanılan viral vektörlerdir. Adenovirüsler düz çift zincirli DNA'ya sahip zarfsız virüslerdir. Bugüne kadar çok sayıda farklı türden 43 tanesi insandan olmak üzere 100'den fazla serotipi izole edilmiştir ve 6 alt grupta toplanmıştır. Gen transfer vektörlerinin üretiminde en fazla C alt grubunun 2 veya 5 nolu serotipleri kullanılmaktadır (72). Adenovirüsler, hekzon, penton baz ve fiber olmak üzere 3 major protein ile birlikte minör proteinler VI, VIII, IX, IIIa ve IVa2'dan oluşan ikozahedral bir kapsid ile karakteristik bir morfolojiye sahiptirler (73). (Şekil 2.5)

Adenovirüs genomu yaklaşık olarak 36 kb'dir. Genomunda regülatör fonksiyonlara sahip olan 4 erken transkripsiyonel bölge (E1, E2, E3 ve E4) ve yapısal proteinleri kodlayan bir geç transkript mevcuttur. Nükleusa girdikten sonra, erken bölge 1 (E1a ve E1b)'deki genler hızlı bir şekilde transkribe olur. Üretilen bu proteinler, viral replikasyon için gereklidir (73, 74).

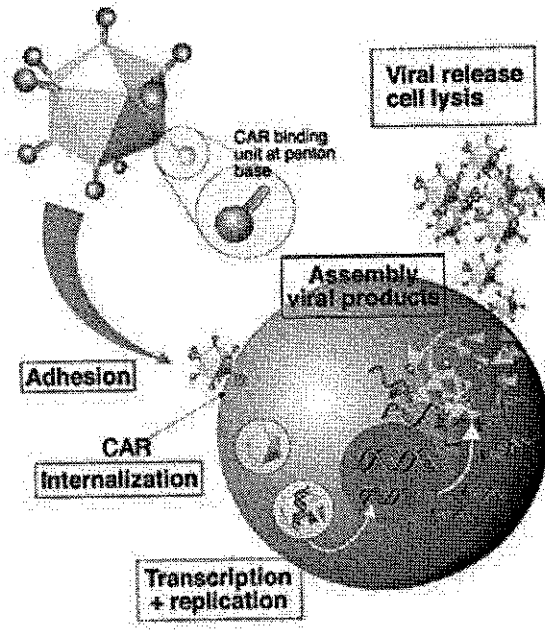
Adenovirüsler için yüzey reseptörü olarak üç tip hücre yüzey molekülü tanımlanmıştır: Cocksackie/Adenovirus Reseptör (CAR), MHC-I α 2 altünitesi ve glikoproteinler üzerindeki sialik asit sakkaritler (73, 67).



Şekil 2.5. Adenovirüsün yapısı (73)

Adenovirüsün yaşam döngüsü; Adenovirüse ait fiber ile hücre yüzey reseptörü arasındaki etkileşim, penton baz proteininin ikinci bir hücre reseptöre bağlanmasını ve buna bağlı olarak reseptör aracılı endositoz yoluyla adenoviral partikülün hücre içine alınmasını sağlar. Virüs hücre içine girdiğinde dış kapsid proteinleri ayrışır ve endozomdan kaçarak sitoplazmaya girer. Ardından virüs partikülleri nükleer por kompleksine girer ve viral DNA viral gen ekspresyonunu başlatmak için nükleusa salınır. Enfeksiyondan yaklaşık 7 saat sonra DNA replikasyonu başlar, 20-24 saat sonra virüs oluşumu tamamlanır ve hücrenin 2-3 gün içerisinde lizise uğramasıyla virüs partikülleri açığa çıkar (75). (Şekil 2.6)

Adenovirüsler, stabilite ve infektivite gibi özelliklerini yitirmeksizin yaklaşık olarak 2 kb büyüklüğünde yabancı DNA'yı alabilme kapasitesine sahiptir. Viral genomun bir kısmının çıkarılması ile yabancı DNA alabilme kapasitesi 7,5 kb'ye kadar çıkarılabilir. Viral genomda yapılan değişikliklere bağlı olarak birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyon olarak isimlendirilen üç tip adenoviral vektör geliştirilebilir. Kanserde adenovirüs aracılı gen tedavide kullanılan vektörler birinci jenerasyon adenoviral vektörlerdir ve bu vektörler E1 ve/veya E3 bölgelerinin çıkartılmasıyla oluşturulurlar (75).



Şekil 2.6. Adenovirüsün yaşam döngüsü (76)

Adenovirüslerin gen tedavi yaklaşımlarında tercih edilme nedenleri;

- 1- Basit, hızlı bir şekilde ve herhangi özel bir ekipman gerektirmeksizin hücre içine verilebilmeleri,
- 2- Yüksek miktarlarda kolaylıkla üretilebilmeleri,
- 3- Bölünen veya bölünemeyen hücreleri enfeksiyona uğratabilmeleri,
- 4- Konakçı genomuna entegre olmamaları,
- 5- İnsanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olmamalarıdır.

Adenovirüslerin gen tedavisinde kullanımını sınırlandıran nedenler;

- 1- En fazla 7,5 kb'lik yabancı DNA alabilme kapasitesine sahip olmaları,
- 2- Geçici ekspresyon sağlaması,
- 3- CAR gibi adenoviral reseptörlere sahip olmayan tümör hücrelerinin etkin bir şekilde enfeksiyona uğratılamamasıdır (76, 77, 78, 79).

2.6. Akciğer Kanseri ve Gen Tedavisi

Akciğer kanserinin tedavisinde uygulanan yöntemler hastaların sağ kalımını ve yaşam kalitesini arttırmada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle akciğer kanserine karşı, gen tedavisi gibi yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır.

Kanserde gen tedavisi birkaç hedefe yönelik olarak uygulanabilmektedir. Bu hedefler tümör baskılayıcı genler, onkogenler, hücre döngüsü düzenleyicileri veya DNA tamir mekanizmaları olabilir. Bu hedefler esas alınarak en çok kullanılan yöntemlerden biri "gen mutasyonunu düzelterek hücreye apoptozis kararını verdirecek mekanizmanın düzgün şekilde harekete geçirilmesi" uygulamasıdır. Daha açık bir ifadeyle burada yapılan iş kanser hücresinde anormal onkogenin etkinliğinin normale çevrilmesi veya engellenmesi ya da tümör baskılayıcı genin etkinliğini artırmak ve bu yolla yeniden apoptozis aleyhine bozulan dengenin düzeltilmesini sağlamaktır (80). Akciğer kanserinde gen tedaviye yönelik üzerinde en fazla çalışılmış olan gen p53'tür. Akciğer kanserlerine bakıldığında % 50'sinden fazlasında bu genin mutasyonlarına rastlanması ve bir anti-onkogen olarak rolünün doğrulanması nedeniyle prelinik çalışmalar için etkili bir hedef olarak düşünülmüştür. Klinik öncesi çalışmalarda hem in vivo hemde in vitro olarak, p53 gen transferinin anti-tümör aktivitesi gösterilmiştir (81). 1996 yılında, Roth ve arkadaşları KHOAK'nde p53 verilimi ile ilgili ilk klinik çalışma sonuçlarını yayınlamışlardır. Yabancıl tip p53 geni taşıyan retroviral vektörlerin, ileri evre KHOAK'li 9 hastanın tümörlerine enjeksiyonu yapılmıştır. Değerlendirilebilen 7 hastanın 3'ünde tümörlerde gerileme gösterilmiş, ayrıca tekrarlayan enjeksiyonlara rağmen önemli bir toksisite kaydedilmemiştir (77). Nemunaitis ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen Faz I çalışmasında ise konvansiyonel tedavilere yanıt vermemiş ileri evre KHOAK'li hastalarda, adenoviral aracılı olarak p53 gen transferi ile birlikte Cisplatin uygulaması gerçekleştirilmiştir. 24 hastaya 6 ay boyunca p53'ün yanı sıra enjeksiyonların 3 gün öncesinde Cisplatin uygulaması yapılmıştır. 2 hastada kısmi yanıt ve 4 hastada ilerleme gözlenirken, 17 hastada ise ilerleme gözlenmemiştir (82).

Bcl-2 bilindiği gibi hücreleri apoptozisten korumaktadır ve Bcl-2 protein ekspresyonu KHAK'lerinde oldukça yüksektir. Bcl-2 mRNA'sını hedefleyen, anti-sense oligonükleotidler kullanılarak KHAK hücre hatlarında yapılmış çalışmalarda Bcl-2 düzeylerinin azaldığı ve apoptozis ile hücrelerin öldüğü gösterilmiştir (14). Honda ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada N-terminal olarak kesilmiş Bax (DeltaNBax)'ı eksprese eden adenovirüsler oluşturulmuş ve farede oluşturulan tümöre enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bax N-terminal olarak kesildiği için Bcl-2 veya Bcl-xL tarafından bloklanmamıştır ve böylece hücrelerin apoptozise gitmesi engellenmemiştir. Bu çalışmada kontrol gruba (Bax) göre tümör büyümesinin önemli derecede baskılandığı gösterilmiştir (83).

Hücre döngüsünde, malignant fenotip gelişiminden hücreleri koruyan kontrol noktaları mevcuttur. Burada siklin bağımlı kinaz inhibitörler p16, p21 ve p27, G1-S geçişini negatif yönde düzenlemeden sorumlu elemanlardır. Bu genlerde mutasyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Craig ve arkadaşlarının hücre hatlarına

adenoviral aracılı p16 aktarımı ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada kanser büyümesinin inhibe edildiği gösterilmiştir. Benzer in vitro ve in vivo sonuçlar p21 ve p27 ile yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir (77). Retinoblastoma ile in vitro olarak yapılmış çalışmalarda yabancı tip RB'nin tümör hücrelerine verilmesinin KHAK'nin gelişimini baskıladığı gösterilmiştir (16).

Akciğer kanserinde mutasyonlarının yaygın olması nedeniyle araştırmacılar onkogenler içerisinde öncelikle K-ras onkogeni üzerine odaklanmışlardır. Aktif Ras'ın fonksiyonunu inhibe edebilmek için 2 yaklaşım uygulanabilmektedir. Bunlardan ilki antisense yapıların kullanımınıdır. K-ras'ın antisense yapıları mutant K-ras'ı eksprese eden KHOAK hücre hatlarına verildiğinde hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. İkinci bir yaklaşım ise anti-K-ras ribozim adenoviral vektörlerin üretilmesidir. Akciğer kanser ksenograftlarının büyümesi bu vektör aracılığı ile inhibe edilebilmiştir. Retroviral vektörler ile anti-sense K-ras'ın kullanımına yönelik henüz klinik bir çalışma bulunmamaktadır (84).

Primer ve metastatik tümörler, gelişebilmek için yeni kan damarları oluşturmak yani "angiogenezis" yapmak zorundadırlar. Angiogenezis inhibitörlerinin bir kısmının (örn; anjiostatin, endostatin gibi) tümörde yeni damar oluşumunun inhibisyonu yoluyla klinik öncesi modellerde tümör gerilemesini indüklediği gösterilmiştir. Bunun üzerine yapılan in vivo bir çalışmada akciğer kanseri oluşturulmuş fareye mutant Raf geni taşıyan hedeflenmiş lipozomların sistemik enjeksiyonu gerçekleştirilmiş ve tümör gerilemesi kaydedilmiştir (85).

Başka bir yöntem de "intihar gen tedavisi" uygulamasıdır. Bu yöntemde klasik kemoterapinin en büyük eksikliği olan kanser hücresine karşı özgüllük sağlanması ana amaçtır. Bu tedavide, normal olarak toksik olmayan bir ajanın toksik bir maddeye değişimini katalizleyen enzimi kodlayan gen tümör hücrelerine aktarılmaktadır. Bu enzimin etkisi ile ortaya çıkan toksik madde daha sonra tümör hücrelerini ortadan kaldırmaktadır. Bu yöntemin immünoterapi ile birlikte uygulandığı çalışmalar mevcuttur (80). En yaygın kullanılan strateji Herpes Simplex Virus Timidin Kinaz (HSVtk) geninin memeli hücrelerine verilmesidir. Bu enzim toksik olmayan nükleosid analogu gansikloviri (GCV) toksik formuna dönüştürür. HSVtk gansiklovir yaklaşımının başarısı "by-stander effect" in varlığıyla önemli derecede desteklenir. By-stander effekt transdüksiyona uğramış hücrelerden transdüksiyona uğramamış hücrelere gap junctionlar aracılığıyla toksik metabolitlerin transferini kapsar. Başarılı klinik öncesi çalışmaların ardından Serman ve arkadaşları tarafından daha önce tedavi almamış 21 hastaya adenoviral aracılı HSVtk/GCV sistemi uygulanmıştır. Toksisite gözlenmemiş ve 20 hastanın 11'inde gen transferi gösterilmiştir. Uygulamadan 4,5 yıl sonra sağ kalım ile ilişkili tam tümör gerilemesi 2 kişide gösterilmiştir. Bu teknolojinin daha etkin bir şekilde uygulanabilmesi için daha etkin verici sistemlere ihtiyaç olduğu düşünülmektedir (77).

2.7. Akciğer Kanseri ve TRAIL

TRAIL, tümörojenik veya transforme olmuş hücrelerde seçici olarak apoptozisi indüklemesi, buna karşın normal hücrelere zarar vermemesi ve p53 mutasyonları nedeniyle kemoterapik ajanlara veya iyonize radyasyona karşı dirençli çeşitli kanser hücre hatlarında apoptozisi indükleyebilmesi nedeniyle kanserin tedavisi için potansiyel bir aday olarak görülmektedir.

TRAIL ile yapılmış çalışmalarda test edilmiş tümör hücre hatlarının yaklaşık %50'sinin TRAIL aracılı apoptozise karşı dirençli olduğu saptanmıştır. NF-kB aktivasyonunun ise TRAIL'a karşı dirençlilikte olası bir mekanizma olduğu düşünülmüş ve yapılan çalışmalarda TRAIL'ın reseptörleri aracılığıyla NF-kB'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Lee ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada, bir Çin bitkisinden (*Tripterygium wilfordii*) elde edilen Triptolide kullanılmış, A549 ve NCI-H1299 akciğer kanser hücre hatlarının NF-kB aktivitesinin inhibisyonu yoluyla TRAIL aracılı apoptozise karşı duyarlı hale getirildiği gösterilmiştir. Triptolide NF-kB aktivasyonunda anahtar bir rol oynayan p65'in transaktivasyonunu bloklamaktadır (86).

Jang ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada ise, TRAIL ve p53'ün birlikte insan akciğer kanser hücre hatlarında apoptozis üzerine etkileri araştırılmıştır. KHOAK hücre hatlarına (NCI-H157, NCI-H358, NCI-H460 ve A549) p53 ve TRAIL'ın rekombinant vektörler ile verilmesi, A549 hücrelerinde DR4 ve NCI-H157'de DR4 ve DR5 ölüm reseptörlerinin ekspresyonlarında artış ile sonuçlanmıştır. Bu çalışma ile tümör hücre apoptozisinde p53 ve TRAIL ilişkisinin önemli olduğu gösterilmiştir (87).

Seol ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışma ise, TRAIL'ın adenovirüs aracılı transferinin by-stander efekt ile sonuçlandığını göstermiştir. TRAIL'ın bu özelliği de tedavi edici değerini arttırmaktadır (88).

2004 yılında yapılan bir çalışmada, akciğer kanseri ve diğer epitelyal malignansilerde koruyucu ve terapötik aktiviteye sahip, bir siklooksijenaz 2 inhibitörü olan Celecoxib ile birlikte TRAIL'ın etkisi KHOAK hücre hatlarında araştırılmıştır. Celecoxib muamelesinin hücre sağ kalımını azalttığı, kaspaz aktivitesini ve ölüm reseptörlerinin ekspresyonunu (özellikle de DR5) indüklediği gözlenmiştir (89).

TRAIL ligandının, kemoterapi ile birlikte akciğer kanseri üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla, Jin ve arkadaşları NCI-H460 KHOAK hücre kökenli ksenograft fare modellerinde çalışmışlardır. Grubun in vitro olarak yaptığı çalışmada Taxol'ün kaspaz aktivasyonunu ve TRAIL aracılı apoptozisi arttırdığı belirlenmiştir. İn vivo olarak ise TRAIL veya Taxol ile birlikte carboplatin kemoterapinin tek başına tümör ksenograftın gelişimini kısmi olarak geciktirdiği, buna karşın ikisinin birlikte uygulanmasının tümör gerilemesi ve tümör gelişiminde daha uzun süreli bir gecikmeye neden olduğu gösterilmiştir (90).

Shi ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış olduğu çalışmada, TRAIL'in ekstrasellular domainini kodlayan rAAV2/5 vektör (rekombinant adeno-associated virüs 2/5) ile A549 hücre hattının enfeksiyonu, TRAIL'in üretilmesi ve bu hücrelerde apoptozisin indüksiyonu ile sonuçlanmıştır. Aynı vektörün tümör xenograft nude fare'ye transdüksiyonu, tümör büyümesinde önemli derecede gerileme ve tümör taşıyan hayvanların sağ kalımında artış ile sonuçlanmıştır (91).

Rekombinant insan TRAIL ligandının ve apoptozisi indükleyici reseptörleri DR4 ve DR5'in III. evre KHOAK'li hastaların tümörlerinde ekspresyonunu belirlemek amacıyla Spierings ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş çalışmada DR4, DR5 ve TRAIL sırasıyla tümörlerin %99, %82 ve %91'in eksprese edildiği belirlenmiştir (92).

MATERYAL VE METODLAR

3.1. Hücre Hattı ve Kültür Şartları

Bu çalışmada küçük hücreli olmayan (adenokarsinoma) akciğer kanseri hücre hattı A549 kullanıldı. A549 hücre hattı American Type Tissue Culture Collection'dan (ATCC) temin edildi.

Uygun şartlar altında gelen hücreler %1 Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B (PSA), %1 L-glutamin ve %10 Fetal Calf Serum (FCS) ile desteklenmiş RPMI 1640 besiyerinde kültüre alındı. 37 °C'de %5 CO₂ varlığında üretildi. İverted mikroskopta her gün kontrolleri yapıldı. Pasaj işlemi yapılarak çoğaltılan hücreler daha sonra yapılacak çalışmalarda kullanılmak üzere, %5 DMSO (Dimetil Sülfoksit)'lu besiyeri ile kriyojenik tüpler içine alınarak -150 °C'de saklandı.

Hücre kültürünü kapsayan tüm çalışmalar steril kabin içerisinde ve steril malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2. Besiyeri ve Kullanılan Solüsyonlar

RPMI 1640 Besiyeri Hazırlanması

RPMI-1640 Powder Medium (Sigma)	10,3 g
L-Glutamin (Biological Industries)	10,25 ml
Penisilin-Streptomycin-Amfoterisin B (Biological Industries)	10 ml
% 7,5 NaHCO ₃	26,7 ml
Bidistile su	960 ml

Bir şişe toz RPMI-1640 besiyeri (10,3 g/L) 960 ml bidistile suda (ddH₂O) çözdürüldü. Toz besiyeri tamamen çözüldükten sonra HCl yardımı ile pH'sı 4 olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklav edilerek steril hale getirildi. Besiyeri soğuduktan sonra yukarıda belirtilen miktarlarda sırasıyla, L-Glutamin, Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B ve % 7,5 NaHCO₃ ilave edilerek karıştırıldı. 100'er ml'lik steril cam şişelere bölünerek +4 °C'de saklandı. Yapılan çalışmaya uygun olarak bu besiyerine ilavesi ile %10 ve %20 FCS'li besiyerleri hazırlandı.

% 7,5 NaHCO₃ (Sodyum Bikarbonat) (Sigma)

100 ml distile suda (dH₂O) 7,5 g NaHCO₃ çözdürüldü ve 0.20 µm'lik enjektör filtresinden geçirilerek, -20 °C'de saklandı.

1XPBS

8 g NaCl (Riedel-de Haën), 0,2 g KCl (Merck), 1,44 g Na₂HPO₄.12H₂O (Riedel-de Haën) ve 0,24 g KH₂PO₄ (Merck) tartularak 1000 ml ddH₂O'da çözdürüldü. pH 7.4' e ayarlandı ve 121 °C'de 15 dakika otoklav edildi. +4 °C'de saklandı.

3.3. Akciğer Kanser Hücre Hattının Rekombinant Adenoviral Vektörler ile Transdüksiyonu

A549 akciğer kanser hücreleri, TRAIL transferi gerçekleştirilmeden önce, GFP reporter genini eksprese eden adenoviral vektörler (Ad.EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein) ile 100 MOI'den 20.000 MOI'e kadar artan dozlarda (MOI: partikül/hücre) transdüksiyona uğratıldı.

100 mm'lik petri kabı yüzeyini kaplayan A549 hücre miktarı yaklaşık olarak %90-95' e ulaştığında sayım işlemine geçildi. 1XPBS ile yıkama sonrası Tripsin EDTA 2X (Biological Industries) ile tripsinizasyon yapılarak hücreler santrifüj tüpüne toplandı. Hücre sayımı için Thoma lam kullanıldı ve sayım işlemi steril olmayan koşullarda gerçekleştirildi.

Sayım işlemi sonrasında santrifüj tüpündeki hücre süspansiyonuna %10 FCS'li RPMI 1640 besiyeri eklenerek 24 kuyucuklu kültür kabının ilk 12 kuyucuğuna her bir kuyucuğa 2'şer ml olacak şekilde pipetaj yapılarak aktarıldı. 37 °C ve %5 CO₂' li etüve kaldırıldı.

Bir gecelik inkübasyon sonrası inverted mikroskopta hücreler incelenerek Ad.EGFP virüs transdüksiyon aşamasına geçildi. Çizelge 3.1'de Ad.EGFP virüs transdüksiyonunda kuyucuklara verilen virüs MOI değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Kuyucuklara verilen Ad.EGFP MOI değerleri

Kuyucuk no	1	2	3	4	5	6
Ad.EGFP	0	100	500	1000	5000	10000
Kuyucuk no	7	8	9	10	11	12
Ad.EGFP	100	500	1000	5000	10000	20000

Kuyucuklara verilecek virüs MOI değerlerine uygun olarak Ad.EGFP virüs solüsyonu serumuz RPMI 1640 besiyeri ile belirli oranlarda seyreltilerek, buz üzerinde tutuldu. Kuyucuklardan pastör pipeti yardımıyla besiyeri uzaklaştırıldı ve 1XPBS ile yüzeyin yıkanması sağlandıktan sonra hazırlanmış Ad.EGFP virüs solüsyonları kuyucuklara aktararak virüs transdüksiyonu gerçekleştirildi. Transdüksiyon sonrası hücreler 37 °C ve %5 CO₂' li etüve kaldırıldı. Doku kültürü ortamındaki serum konsantrasyonu, enfeksiyondan iki saat sonra aynı miktarda (1 ml), % 20 FCS içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerek %10'a çıkarıldı. 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂' li etüve 48 saatlik inkübasyon için kaldırıldı.

Enfeksiyonu takiben 48. saatin sonunda dijital fotoğraf makineli Olympus (CKX41) marka floresan mikroskop altında hücreler fotoğraflandı.

Fotoğraflama işlemi sonrası hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak flow tüplerine aktarıldı ve BD FACS Calibur akış sitometri cihazında okunarak GFP (+) hücrelerin oranı tespit edildi.

3.4. Akciğer Kanser Hücre Hattının TRAIL' a Karşı Duyarlılığının Belirlenmesi

Akciğer kanser hücrelerinin TRAIL'a karşı duyarlılığını belirlemek amacıyla, A549 akciğer kanser hücreleri hTRAIL kodlayan adenoviral vektörler (Ad5.hTRAIL) ile transdüksiyona uğratıldı. Negatif kontrol olarak ise beta galaktosidaz proteinini kodlayan adenoviral vektörler (AdCMVLacZ) (5000 MOI) kullanıldı.

3.4.1. Virüs Transdüksiyonu

100 mm'lik petri kabı yüzeyini kaplayan A549 hücre miktarı yaklaşık olarak %90-95' e ulaştığında hücre sayımı yapıldı ve ardından hücreler 24 kuyucuklu doku kültürü kabına aktarıldı. 37 °C ve %5 CO₂' li etüve kaldırıldı.

Bir gecelik inkübasyon sonrası inverted mikroskofta hücreler incelenerek Ad.TRAIL virüs transdüksiyon aşamasına geçildi. Çizelge 3.2'de kuyucuklara verilen virüs MOI değerleri gösterilmiştir.

Çizelge.3.2: Kuyucuklara verilen Ad5 hTRAIL MOI değerleri

Kuyucuk no	1	2	3	4	5	6
Ad5.hTRAIL	0	100	500	1000	5000	10000
Kuyucuk no	7	8	9	10	11	12
Ad5.hTRAIL	0	100	500	1000	5000	10000

Kuyucuklara verilecek virüs MOI değerlerine uygun olarak Ad5.hTRAIL ve AdCMVLacZ virüs solüsyonları serumsuz RPMI 1640 besiyeri ile belirli oranlarda seyreltilerek, buz üzerinde tutuldu. Kuyucuklardan pastör pipeti yardımıyla besiyeri uzaklaştırıldı ve 1XPBS ile yüzeyin yıkanması sağlandıktan sonra hazırlanmış Ad5.hTRAIL ve AdCMVLacZ virüs solüsyonları kuyucuklara aktararak virüs transdüksiyonu gerçekleştirildi. Transdüksiyon sonrası hücreler 37 °C ve %5 CO₂' li etüve kaldırıldı. Doku kültürü ortamındaki serum konsantrasyonu, enfeksiyondan iki saat sonra aynı miktarda (1 ml), % 20 FCS içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerek %10'a çıkarıldı. 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂' li etüve 48 saatlik inkübasyon için kaldırıldı.

3.4.2. Canlı/Ölü Hücresel Canlılık Deneyi

Transdüksiyon sonrası canlı kalan hücreleri ölü hücrelerden ayırmak için, Molecular Probes'un (Eugene, OR) Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit'i kullanıldı.

Virüs transdüksiyonunu takiben 48. saatin sonunda kuyucuklardaki medium pastör pipeti yardımıyla çekildi ve her bir kuyucuğa 1'er ml 1XPBS kondu. Yüzeyin yıkanması sağlandıktan sonra yine pastör pipeti yardımıyla 1XPBS uzaklaştırıldı. 50 ml'lik kapaklı santrifüj tüpüne 16 ml 1XPBS ve 4 µl CalseinAM konarak karıştırıldı. Hazırlanan CalseinAM-1XPBS karışımından her bir kuyucuğa 1'er ml kondu ve 40 dakika oda ısısında bekletildi.

Süre sonunda dijital fotoğraf makineli Olympus (CKX41) marka floresan mikroskop altında her bir kuyucuktaki canlı ve ölü hücreler fotoğraflandı.

3.5. Akciğer Kanser Hücre Hattının TRAIL' a Karşı Dirençliliğinin Kırılması
Akciğer kanser hücrelerinin TRAIL'a karşı dirençliliğinin kırılması amacıyla IKK β 'nın dominant negatif mutant formunu kodlayan adenoviral vektörler (AdIKK β KA) ile A549 akciğer kanser hücre hattı transdüksiyona uğrattıldı. Negatif kontrol olarak AdCMVLacZ (5000 MOI) kullanıldı.

3.5.1. Virüs Transdüksiyonu

A549 hücreleri petri kabı yüzeyini %90-95 civarında kapladıklarında hücre sayımı yapıldı ve ardından hücreler 24 kuyucuklu doku kültürü kabına aktarıldı. 37 °C ve %5 CO₂' li etüve kaldırıldı.

Bir gecelik inkübasyon sonrası inverted mikroskopta hücreler incelenerek virüs transdüksiyonu aşamasına geçildi. Çizelge 3.3'de kuyucuklara verilen virüs MOI değerleri gösterilmiştir.

Kuyucuklara verilecek virüs MOI değerlerine uygun olarak Ad5.hTRAIL ve Ad.IKK β KA virüs solüsyonları serumsuz RPMI 1640 besiyeri ile belirli oranlarda seyreltilerek, buz üzerinde tutuldu. Kuyucuklardan pastör pipeti yardımıyla besiyeri uzaklaştırıldı ve 1XPBS ile yüzeyin yıkanması sağlandıktan sonra hazırlanmış Ad5.hTRAIL ve Ad.IKK β KA virüs solüsyonları kuyucuklara aktarılarak virüs transdüksiyonu gerçekleştirildi. Transdüksiyon sonrası hücreler 37 °C ve %5 CO₂' li etüve kaldırıldı. Doku kültürü ortamındaki serum konsantrasyonu, enfeksiyondan iki saat sonra aynı miktarda (1 ml), % 20 FCS içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerek %10'a çıkarıldı. 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂' li etüve 48 saatlik inkübasyon için kaldırıldı.

Çizelge 3.3: Kuyucuklara verilen virüs MOI değerleri

Kuyucuk no	1	2	3	4	5	6
Ad5.hTRAIL	0	100	500	1000	5000	10000
Kuyucuk no	7	8	9	10	11	12
Ad.IKK β KA	0	100	500	1000	5000	10000
Kuyucuk no	13	14	15	16	17	18
Ad5.hTRAIL/ Ad.IKK β KA	0	1000	1000	1000	1000	1000
		100	500	1000	5000	10000
Kuyucuk no	19	20	21	22	23	24
Ad5.hTRAIL/ Ad.IKK β KA	0	5000	5000	5000	5000	5000
		100	500	1000	5000	10000

3.5.2. Canlı/Ölü Hücresel Canlılık Deneyi

Transdüksiyon sonrası canlı kalan hücreleri ölü hücrelerden ayırmak için, Molecular Probes'un (Eugene, OR) Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit'i kullanıldı.

Virüs transdüksiyonunu takiben 48. saatin sonunda kuyucuklardaki medium pastör pipeti yardımıyla çekildi ve her bir kuyucuğa 1'er ml 1XPBS kondu. Yüzeyin yıkanması sağlandıktan sonra yine pastör pipeti yardımıyla 1XPBS uzaklaştırıldı. 50 ml'lik kapaklı santrifüj tüpüne 25 ml 1XPBS ve 12,5 µl CalseinAM konarak karıştırıldı. Hazırlanan CalseinAM-1XPBS karışımından herbir kuyucuğa 1'er ml kondu ve 40 dakika oda ısısında bekletildi.

Süre sonunda dijital fotoğraf makineli Olympus (CKX41) marka floresan mikroskop altında her bir kuyucuktaki canlı ve ölü hücreler fotoğraflandı.

3.6. NF-κB Sinyal Yolunun Aktivasyon Durumunun Belirlenmesi (Lusiferaz Deneyi)

A549 akciğer kanser hücre hattının TRAIL muamelesi öncesi ve sonrasında NF-κB aracılı transkripsiyonel indüksiyonu ölçmek amacıyla hücreler Ad.NF-κBluc, Ad5.hTRAIL, Ad.IKKβKA adenoviral vektörleri ile transdüksiyona uğratıldı. Negatif kontrol olarak AdCMVLacZ kullanıldı. Lusiferaz aktivitesine yönelik tüm ölçümler (rölatif ışık birimleri), protein konsantrasyonuna normalize edildi. AdNF-κBluc vektörü HSVTK geninin TATA benzeri promotörü ile birlikte ortak NF-κB bağlanma dizisinin dört tandem kopyasını taşımaktadır.

3.6.1. Virüs Transdüksiyonu

A549 hücreleri 100 mm'lik petri kabı yüzeyini %95-100 oranında kapladıklarında 11 adet 35 mm'lik kültür kabına pasaj yapıldı. Bir gecelik inkübasyon sonrası hücreler petri kaplarının yüzeylerini tamamen kapladıklarında virüs transdüksiyonu için bir adet 35 mm'lik kültür kabından hücre sayımı yapıldı.

Hücre sayımını takiben virüs transdüksiyon aşamasına geçildi. Çizelge 3.4'de petri kaplarına verilen virüs MOI değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.4: Petri kaplarına aktarılan virüs MOI değerleri

Petri kabı no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ad.NFκBluc	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
Ad5.hTRAIL	-	1000	1000	1000	1000	-	5000	5000	5000	5000
Ad.IKKβKA	-	-	1000	5000	10.000	-	-	1000	5000	10.000

Doku kültürü petri kaplarına verilecek virüs MOI değerlerine uygun olarak Ad5.hTRAIL, Ad.IKKβKA ve Ad.NFκBluc virüs solüsyonları serumsuz RPMI 1640 besiyeri ile belirli oranlarda seyreltilerek, buz üzerinde tutuldu. Petri kaplarından pastör pipeti yardımıyla besiyeri uzaklaştırıldı ve 1XPBS ile yüzeyin yıkanması sağlandıktan sonra hazırlanmış virüs solüsyonları aktararak virüs transdüksiyonu gerçekleştirildi. Transdüksiyon sonrası hücreler 37 °C ve %5 CO₂' li etüve kaldırıldı.

Doku kültürü ortamındaki serum konsantrasyonu, enfeksiyondan iki saat sonra aynı miktarda (1 ml), % 20 FCS içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerek %10'a çıkarıldı. 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂' li etüve 30 saatlik inkübasyon için kaldırıldı.

3.6.2. Hücre Lizatı Hazırlanması

3.6.2.1. Kullanılan Solüsyonlar

1XReporter Lizis Tampon (Promega)

4 ml steril bidistile su ve 1 ml 5X Reporter Lizis Tampon karıştırılarak oda sıcaklığına getirildi.

3.6.2.2. İşlemler

30. saatin sonunda petri kapları içerisindeki besiyerleri pastör pipeti yardımıyla uzaklaştırıldı ve her birine 0,5 ml 1XPBS eklendi. Hücrelerin yıkanması sağlandıktan sonra 1XPBS uzaklaştırıldı. Her bir petri kabına 0,5 ml 1X Reporter Lizis Tampon konularak, petri kapları 10 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda tutuldu. Hücrelerin tamamen kalkması sağlandı. Yapışık hücreler pipet ucu yardımıyla kaldırıldı. Hücre lizatları toplanarak 1,5 ml'lik ependorflara alındı. Ependorflara alınan hücreler 13.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Dökeltile yeni ependorflara alınarak, lusiferaz okumaları yapılabilmek için -80 °C'de saklandı.

3.6.3. Lusiferaz Okumaları

-80 °C'den çıkarılan örnekler oda sıcaklığında eritildi. 350 µl distile su, 50 µl örnek ve 100 µl Lusiferin cihaza ait tüp içerisinde karıştırıldı. Aynı şekilde hazırlanan tüm örneklerin, Luminescence Spectrometer (LS50B-Perkinelmer)'da kullanım talimatına uygun olarak okumaları yapıldı.

3.6.4. Protein Miktar Tayini

3.6.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

Stok Bovine Serum Albumin (BSA)(10 mg/ml) (Sigma)

0,1 g BSA tartılıp, son hacim 10 ml olacak şekilde bidistile su ile hazırlandı. 1 ml'lik ependorflara bölünerek, -20° C'de saklandı.

Protein miktar tayini, BSA (Bovine Serum Albumin) ile hazırlanan standart grafik kullanılarak yapıldı. Miktar tayini için Bio-Rad marka Protein Assay Kit kullanıldı. Multiskan spectrum (Thermo Electron Corporation) 'da 595 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri okundu. Standart grafik, elde edilen değerlere göre X eksenini protein miktarını (µg/ µl) ve Y eksenini absorbans değerlerini gösterecek şekilde hazırlandı.

-80 °C'den çıkarılan hücre lizatları oda sıcaklığında çözüldü. Her bir örnekten 20 µl alınarak 96 kuyucuklu petri kabının ikinci sırasına koyuldu. Örneklerin bulunduğu her bir kuyucuğa 40 µl Protein Assay Kit ve 140 µl bidistile su eklenerek 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda Multiskan spectrum' da 595 nm

dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Örnekler içerisindeki protein miktarı hesaplandı. Standart grafikte örneğin verdiği absorbans değerine karşılık gelen $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cinsinden BSA miktarı örneğin içerdiği protein miktarını vermektedir.

3.7. Anneksin V Boyama ile Apoptozisin Belirlenmesi

3.7.1. Virüs Transdüksiyonu

A549 hücreleri 100 mm'lik petri kabı yüzeyini %95-100 oranında kapladıklarında 10 adet 35 mm'lik kültür kabına pasaj yapıldı. Bir gecelik inkübasyon sonrası hücreler petri kaplarının yüzeylerini tamamen kapladıklarında virüs transdüksiyonu için bir adet 35 mm'lik kültür kabından hücre sayımı yapıldı.

Hücre sayımını takiben virüs transdüksiyon aşamasına geçildi. Çizelge 3.4'de petri kaplarına verilen virüs MOI değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.5: Petri kaplarına verilen virüs MOI değerleri

Petri kabı no	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ad5.hTRAIL/ Ad.IKK β KA	0 0 (Boyanmamış Kontrol)	0 0 (izotip Kontrol)	5000 0	5000 0	5000 200	5000 1000	5000 5000	5000 10000	5000 20000

Doku kültürü petri kaplarına verilecek virüs MOI değerlerine uygun olarak Ad5 hTRAIL ve Ad.IKK β KA virüs solüsyonları serumsuz RPMI 1640 besiyeri ile belirli oranlarda seyreltilerek, buz üzerinde tutuldu. Petri kaplarından pastör pipeti yardımıyla besiyeri uzaklaştırıldı ve 1XPBS ile yüzeyin yıkanması sağlandıktan sonra hazırlanmış virüs solüsyonları aktararak virüs transdüksiyonu gerçekleştirildi. Transdüksiyon sonrası hücreler 37 °C ve %5 CO₂' li etüve kaldırıldı. Doku kültürü ortamındaki serum konsantrasyonu, enfeksiyondan iki saat sonra aynı miktarda (1 ml), % 20 FCS içeren RPMI 1640 besiyeri eklenerek %10'a çıkarıldı. 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂' li etüve 48 saatlik inkübasyon için kaldırıldı.

3.7.2. Anneksin V Boyama

3.7.2.1. Kullanılan Solüsyonlar

Anneksin V Bağlanma Tamponu

NaCl (1M) (Riedel-de Haën)	14 ml
CaCl ₂ (1M) (Sigma)	0.25 ml
HEPES/NaOH, pH 7.4 (1M) (Amresco)	1 ml
dH ₂ O	85 ml

1'er Molar olarak hazırlanmış NaCl, CaCl₂ ve HEPES/NaOH'dan yukarıda belirtilen miktarlarda alınarak, dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı.

Propidium Iodide (PI) (Sigma)

Propidium Iodide'den 1 mg tartılarak 1 ml 1XPBS'de çözdürüldü. Hazırlanan 1 mg/ml'lik stok solusyondan 20 µl alınarak 980 µl 1XPBS'de sulandırıldı (20µg/ml). +4 °C'de saklandı.

3.7.2.2. İşlemler

48 saat önce enfeksiyona uğratılmış hücrelerin bulunduğu 35 mm'lik petri kaplarından besiyerleri buz üzerindeki numaralandırılmış tüplere aktarıldı. Kültür kaplarına 1'er ml 1XPBS kondu. Yüzeyin yıkanması sağlandıktan sonra pastör pipeti yardımıyla 1XPBS uzaklaştırıldı. 1'er ml 2XTRP ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler petri kaplarından toplanarak numaralandırılmış tüplerdeki besiyerlerinin üzerlerine aktarıldı. Tüpler 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Dökeltiiler uzaklaştırıldı ve çökeltiiler üzerine 2'şer ml 1XPBS eklenerek numaralandırılmış flow tüplerine pipet yardımıyla aktarıldı. Tüpler 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Dökeltiiler uzaklaştırıldı. Çökeltiilerin üzerlerine 195 µl Anneksin V bağlanma tamponu ve 5 µl Anneksin-FITC (Alexis) eklendi. 1 nolu kontrol tüpüne (boyanmamış) Anneksin-FITC eklenmedi. 15 dakika buz üzerinde karanlıkta bekletildi. Süre sonunda tüplere 2'şer ml 1XPBS eklenerek 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Dökeltiiler uzaklaştırılarak, çökeltiilerin üzerlerine 490 µl Anneksin V bağlanma tamponu eklenerek hafifçe karıştırıldı. Bu aşamada FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) analizi için tüpler buz üzerinde cihaza götürüldü. Ölçümlerden hemen önce, 1 nolu kontrol tüpü hariç tüm tüplere 20 µg/µl PI (Propidium Iodide)'den 10'ar µl eklendi. Örnekler BD FACS calibur cihazında kullanım talimatına uygun olarak analiz edildi.

3.8. TRAIL Reseptör Ekspresyonlarının Belirlenmesi

3.8.1. Real Time RT-PCR

3.8.1.1. Kullanılan Solüsyonlar

- TRIZol Reagent (Sigma)
- Kloroform (Sigma)
- İzopropanol (Sigma)
- % 75'lik Etanol
- dH₂O (nükleaz içermeyen)

3.8.1.2. RNA İzolasyonu

Hücreler çözdürüldükten sonra 3. pasajı kadar çoğaltıldı. 3. pasajda hücreler petri kabı yüzeyini (100 mm) %80-90 civarında kapladıklarında örnek hazırlama aşamasına geçildi. Petri kabından besiyeri uzaklaştırıldı ve 5 ml 1XPBS ile yıkandı. 1 ml TRIZol reagent petri kabına kondu. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Pipet yardımıyla petri kabının yüzeyi yıkanarak lizat 1,5 ml'lik ependorfa toplandı. Oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi. Üzerine 0.2 ml kloroform eklenerek ağzı sıkıca

kapatıldı. 15 saniye boyunca şiddetli bir şekilde havada sallandı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 13.000 rpm'de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası oluşan 3 fazdan (en altta protein, ortada DNA ve en üstte RNA) RNA'yı içeren sıvı faz temiz bir ependorfa alındı. Üzerine 0.5 ml izopropanol eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 13.000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dökelti uzaklaştırılarak, çökelti üzerine 1 ml %75'lik etanol eklendi ve hafifçe karıştırıldı. 13.000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Dökelti otomatik pipetle tamamen uzaklaştırıldı ve 10-15 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. RNA, kurutulduktan sonra üzerine 200 µl dH₂O (nükleaz içermeyen) ilave edilerek çözdürüldü. Ependorfun ağzı parafilmle kapatılarak 56 °C'lik su banyosunda 15 dakika tutuldu. Spektrofotometrede OD₂₆₀/OD₂₈₀ değeri ölçüldü ve konsantrasyonu belirlendi.

3.8.1.3. cDNA Eldesi

PCR İçeriği

10X RT (Reverse Transkriptaz) tampon	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	11 µl
dNTPs (10 mM, herbiri 25 mM, dTTP'li)	2 µl
10X Random Hekzamer (50 mM)	5 µl
RNase inhibitör (20 u/µl)	3 µl
Multiscribe RT (50 u/µl)	1,25 µl
dH ₂ O (nükleaz içermeyen)	21 µl
RNA	1,7 µl

	50 µl

PCR Protokolü

25 °C 10 dakika
48 °C 60 dakika

Yukarıda sunulan içeriklerde hazırlanan PCR reaksiyonu belirtilen süre ve derecelerde Techne Genius marka PCR cihazında gerçekleştirildi.

3.8.1.4. Real Time RT-PCR

Reaksiyon için herbir reseptöre (TR-1, TR-2, TR-3 ve TR-4) karşılık bir Real Time RT PCR tüpü içinde aşağıda belirtilen miktarlarda reaksiyon hazırlandı.

Kontrol olarak kullanılan 5. tüpe RNA örneği konmadı. Ayrıca kontrol tüpüne TR-2 reseptörüne ait primerler ve Taq probu eklendi (çalışılan reseptörlerden herhangi biri seçilebilir). Reaksiyonda iç kontrol olarak, ikinci bir flöresan boya bağlı olan rRNA primer ve probları kullanıldı. Böylece rRNA'nın aynı reaksiyon içinde analizi sağlandı.

PCR İçeriği

2X UMM (Universal Master Mix)	12,5 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Taq Probe	1 µl
dH ₂ O (nükleaz içermeyen)	4,5 µl
cDNA	5 µl

	20 µl

Her bir TRAIL reseptörü için yukarıda sunulan içeriklerde ayrı birer reaksiyon tüpü hazırlandı. Çizelge 3.6'da TRAIL reseptörlerine ve internal kontrol olarak kullanılan ribozomal RNA'ya (PE Applied Biosystems) ait primer dizileri verilmiştir.

PCR Programı

50 °C	2 dakika	} 40 döngü
95 °C	10 dakika	
95 °C	15 saniye	
60 °C	1 dakika	

Yukarıda sunulan içeriklerde hazırlanan reaksiyon Applied Biosystems marka 7500 Real Time PCR cihazında, belirtilen süre ve derecelerde gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6: TRAIL reseptörleri ve rRNA'ya ait primer dizileri

TRAIL-R1 5'	5'- TGT ACG CCC TGG AGT GAC AT - 3'
TRAIL-R1 3'- Rev	5'- CAC CAA CAG CAA CGG AAC AA -3'
TRAIL-R1 Prob	5' 6-FAM- TGT CCA CAA AGA ATC AGG CAA TGG ACA TAA T-TAMRA-3'
TRAIL-R2 5'	5'- CAC TCA CTG GAA TGA CCT CCT TT-3'
TRAIL-R2 3'- Rev	5'- CTG CAG GGA CTT AGC TCC ACT T- 3'
TRAIL-R2 Prob	5' 6-FAM- TCA CAC CTG GTG CAG CGC AAG CAG - TAMRA- 3'
TRAIL-R3 5'	5'- CCC TAA AGT TCG TCG TCG TCA T- 3'
TRAIL-R3 3'- Rev	5'- GGG CAG TGG TGG CAG AGT A-3'
TRAIL-R3 Prob	5'- 6-FAM-TCC CGG TCC TGC TGC CAG TCC TAG C- TAMRA- 3'
TRAIL-R4 5'	5'- ACA GAG GCG CAG CCT CAA - 3'
TRAIL-R4 3'- Rev	5'- ACG GGT TAC AGG CTC CAG TAT ATT- 3'
TRAIL-R4 Prob	5'- 6-FAM-AGG AGG AGT GTC CAG CAG GAT CTC ATA GAT C-TAMRA-3'
rRNA-Forward Primer	5'- CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
rRNA-Reverse Primer	3'- GCTCGTACTGCATGTCCCCT-3'
rRNA-probe	5'-FAM-TGGACTACCTATTGGGTCTCTTCGAGCCA- TAMRA-3'

Analiz aşamasında kullanılacak standart eğrinin oluşturulması için, ribozomal RNA'dan türeyen klonlanmış cDNA fragmenti kullanıldı. TRAIL reseptörlerinin oranları, $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak hesaplandı.

3.8.2. Akış Sitometrisi Deneyi

3.8.2.1. Kullanılan Solüsyonlar ve Antikorlar

1XFACS Tamponu

0,18 g Sodyum bikarbonat (Sigma), 0,5 g BSA (Sigma) 0,5 g Sodyum azid (NaN_3) (Sigma) tartıldı ve 500 ml 1XPBS içinde çözdürülerek hazırlandı.

Antikorlar

Primer Antikorlar; Mab to TRAIL-R1 (human) (HS101) (Alexis)
Mab to TRAIL-R2 (human) (HS201) (Alexis)
Mab to TRAIL-R3 (human) (HS301) (Alexis)
Mab to TRAIL-R4 (human) (HS402) (Alexis)

Sekonder Antikor; Pab to Mouse IgG1 (Biotin) (Alexis)

Üçüncül Antikor; Streptavidin/R-PE (Alexis)

İsotip için (Kontrol); Pab to Mouse IgG1 (R-PE) (Alexis)

3.8.2.2. İşlemler

Hücreler çözdürüldükten sonra gelişimleri takip edilerek 2 kez pasaj yapıldı. Son pasajın üstünden 48 saat geçtikten sonra A549 hücreleri 100 mm'lik petri kabını %80-90 oranında kapladığında deneye başlandı. Hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı. 5 ml 1XPBS ile yıkama işlemi yapılarak 2 ml 2XTRP ile tripsinizasyon yapıldı. Hücreler 2 ml %10 serumlu besiyeri ile toplandı ve 50 ml'lik kapaklı santrifüj tüpüne aktarıldı. +4°C'de, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Dökelti uzaklaştırılarak çökelti üzerine 620 µl 1X FACS tampon konarak karıştırıldı. Buz üzerine kondu. Hücre sayımı için santrifüj tüpünden 5 µl alınarak sulandırma katsayısı 20 olacak şekilde 95 µl dH₂O ile 100 µl'ye tamamlandı ve Thoma Lam'da hücre sayımı yapıldı. Ortalama hücre sayısı 35 olarak bulundu.

A549 hücre sayısı: $35 \times 20 \times 10^4$: ~7.000.000 hücre/ml (Her bir tüp için en az 1.000.000 hücre olmalı)

6 adet flow tüpü hazırlandı. Tüpler İzotip, boyanmamış, TR1, TR2, TR3 ve TR4 olarak adlandırıldı. İzotipi ve boyanmamış örneği içeren tüpler, kontrol grupları olarak kullanıldı. Her bir tüpe 100 µl örnek ve 100 µl 1XFACS tampon kondu. TR1, TR2, TR3 ve TR4 tüplerine 5'er µl Alexis marka primer antikorlar eklendi (her bir tüpe kendine özgü primer eklendi). Antikorlar eklendikten sonra tüpler hafifçe karıştırıldı. Aynı şekilde izotip tüpüne 5 µl Mouse IgG1(R-PE) (Alexis) eklendi. Boyanmamış örneği içeren tüpe ise antikor eklenmedi. Tüpler buz üzerinde 30

dakika bekletildi. Süre sonunda tüm tüplere 2'şer ml 1XFACS tampon eklendi ve hafifçe karıştırıldı. +4°C'de, 2000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dökelti tamamen uzaklaştırıldı. Çökeltilerin üzerlerine 100'er µl 1XFACS tampon eklendi ve çökelti hafifçe vurularak karıştırıldı. Üzerlerine 2'şer µl Alexis marka sekonder antikor kondu. Sadece boyanmamış örneği içeren tüpe antikor eklenmedi. Tüpler buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Süre sonunda tüm tüplere 2'şer ml 1XFACS tampon eklendi. Tüpler hafifçe vurularak karıştırıldı. +4°C'de, 2000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda dökelti tamamen uzaklaştırıldı. Tüm tüplere 100'er µl 1XFACS tampon eklendi. Boyanmamış tüp hariç tüm tüplere 2'şer µl Ancell marka üçüncül antikor (Streptavidin-R-PE) eklendi. Tüm tüpler hafifçe karıştırılarak buz üzerinde karanlıkta 20 dakika bekletildi. Süre sonunda tüplere 2'şer ml 1XFACS tampon eklendi. +4°C'de, 2000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Tüplerdeki dökelti tamamen uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine 500'er µl 1XFACS tampon eklendi ve hafifçe karıştırıldı.

Örnekler BD FACS calibur cihazında kullanım talimatına uygun olarak analiz edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada, küçük hücreli olmayan adenokarsinoma tipi A549 hücre hattı kullanılarak, akciğer kanserinde rekombinant adenovirüs aracılı TRAIL transferinin potansiyel terapötik etkisi araştırılmıştır.

4.1. A549 Akciğer Kanser Hücre Hattının Adenoviral Vektörler ile Transdüksiyonu

A549 akciğer kanser hücre hattına TRAIL transferi gerçekleştirilmeden önce, bu hücre hattının adenovirüslerle transdüksiyona uğratılıp uğratılmayacağını ve gen transferinde kullanılacak optimum dozu belirlemek üzere, GFP reporter genini kodlayan adenovirüsler AdEGFP ile transdüksiyon gerçekleştirildi. Akciğer kanser hücreleri AdEGFP ile artan dozlarda enfeksiyona uğratıldıktan 48 saat sonra floresan mikroskop altında görüntülendi. Virüs transdüksiyonu gerçekleşmiş hücreler floresan mikroskop altında yeşil floresan renk vermektedir. Hürelere ait görüntüler Şekil 4.1, Panel A'da verilmiştir.

Virüs enfeksiyonlarının etkisi floresan mikroskop altında takip edilmesine karşın, transdüksiyon sonuçları kantitatif olarak yine enfeksiyonu takiben 48. saatte akış sitometrisi kullanılarak analiz edilmiştir. FACS analiz sonuçları grafik halinde Şekil 4.1, Panel B'de verilmiştir.

Tüm bu sonuçlar hücrelerin hemen hemen %100'ünün 5,000 DNA partikül/hücre MOI'de AdEGFP ile etkili bir şekilde transdüksiyona uğratıldığını göstermiştir.

4.2. A549 Akciğer Kanser Hücre Hattının hTRAIL ve IKK β KA Gen Transferi Sonuçları

A549 akciğer kanser hücre hattının TRAIL'a karşı dirençli olup olmadığını belirlemek üzere, A549 akciğer kanser hücre hattı hTRAIL genini kodlayan adenovirüsler (Ad5hTRAIL) ile artan dozlarda enfekte edildi. Enfeksiyonu takiben 48. saatte canlı hücrelerin miktarını belirlemek amacıyla Molecular Probe'un Canlı/Ölü Hücresel Canlılık ve Toksikite kiti kullanıldı ve floresan mikroskop altında hücreler görüntülendi. Bu kit içerisinde mevcut olan Calsein AM, intrasellüler kalsein esteraz için bir florojenik substrattır. Canlı hücrelerde bu enzim aracılığıyla Calsein AM yeşil bir floresan bileşik olan Calseine hidroliz edilmektedir. Yalnızca sağlam membranı olan canlı hücreler aktif esteraz içerdiğinden, Calseinin florometrik metodlarla belirlenmesi, canlı hücrelerin varlığına işaret etmektedir. Hürelere ait görüntüler Şekil 4.2'de verilmiştir. A549 akciğer kanser hücre hattı, Ad5hTRAIL'ın oldukça yüksek dozları (10,000 DNA partikül/hücre MOI) kullanılmasına rağmen hTRAIL'ın sitotoksik etkilerine karşı tamamen dirençli olarak bulundu. AdCMVLacZ enfeksiyonu (kontrol) tek başına canlı hücre miktarında herhangi bir azalmaya neden olmadı.

Daha önceleri yapılan çalışmalarda artmış IKK aktivitesi (93, 94) ve/veya NF- κ B aktivitesinin (95) çeşitli tümörlerde ölüm ligandı ile indüklenmiş sitotoksiteye karşı en önemli engel olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, hücre canlılığı üzerinde IKK ve NF- κ B inhibisyonunun etkisi, IKK β 'nin dominant negatif mutant formunu kodlayan adenovirüsler (AdIKK β KA) ile A549 akciğer kanser hücrelerinin enfeksiyonu yoluyla test edildi. Enfeksiyonu takiben 48. saatte canlı hücrelerin miktarını belirlemek amacıyla Molecular Probe'un Canlı/Ölü Hücresel Canlılık ve Toksikite kiti kullanıldı. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi, AdIKK β KA vektörünün 10,000 MOI dozunda bile (10,000 DNA partikül/hücre MOI) hücre canlılığında herhangi bir azalma gözlenmedi. Bu sonuçlar, tek başına IKK inhibisyonunun A549 akciğer kanser hücrelerinin canlılığını azaltmadığını ispatladı.

4.3. IKK İnhibisyonu ile NF- κ B Yolunun Engellenmesi

A549 akciğer kanser hücre hattının, daha önce yapılmış bir çalışmada, IKK β (AdIKK β KA) veya I κ B α (AdI κ B α SR)'nin dominant negatif mutantlarının adenovirüs aracılı transferi ile TNF ölüm ligandına karşı duyarlı hale getirildiği gösterilmiştir (96, 97). A549 akciğer kanser hücre hattı TRAIL aracılı apoptozise karşı dirençli olduğundan dolayı, burada A549 akciğer karsinoma hücre hattının TRAIL'a karşı duyarlılığını sağlamak amacıyla NF- κ B yolunu hedefleyen IKK inhibi edici stratejiler kullanıldı. Bu nedenle, A549 akciğer kanser hücreleri Ad5hTRAIL vektörü sabit olmak üzere (5,000 DNA partikül/hücre MOI), AdIKK β KA vektörünün artan dozları ile birlikte enfekte edildi. Enfeksiyonu takiben 48. saatte canlı hücre miktarı Molecular Probe'un Canlı/Ölü Hücresel Canlılık ve Toksikite kiti kullanılarak belirlendi. A549 akciğer kanser hücreleri AdhTRAIL ve AdIKK β KA'nın 5,000 DNA partikül/hücre MOI dozunda birlikte enfekte edildiği zaman yaklaşık %75 oranında hücre ölümü meydana geldiği gözlemlendi. AdIKK β KA virüs miktarı 10,000 DNA partikül/hücre MOI'e arttırıldığı zaman ölüm oranı yaklaşık %90'a ulaştı. Buna karşın, AdIKK β KA yerine AdCMVLacZ enfeksiyonu A549 akciğer kanser hücrelerini TRAIL'a karşı duyarlılığı arttırmadı. Tüm bu bulgular, A549 akciğer kanser hücrelerinde gözlenen TRAIL dirençliliğinin adenoviral vektörler aracılığıyla oluşturulan IKK β KA ekspresyonu ile kırıldığını gösterdi. Hücrelere ait görüntüler Şekil 4.4'de verilmiştir.

4.4. A549 Akciğer Kanser Hücrelerinde NF- κ B Aktivasyon Durumu

Hücrelerin intrasellular NF- κ B aktivasyon durumu iki farklı nedenle kritiktir. Birincisi, yüksek NF- κ B aktivitesinin (95) kanser hücrelerinde ölüm ligandı aracılı apoptozise karşı dirençlilik sağladığının düşünülmesi ile ilişkilidir. İkincisi ise hem TRAIL ölüm reseptörleri TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 (98, 99) hemde TRAIL yalancı reseptör TRAIL-R4'ün (100) NF- κ B aktivitesini uyarmasıdır. Tedavi öncesi kanser hücrelerinin hem endojen hemde TRAIL aracılı NF- κ B aktivitesi bulundurması, TRAIL'ı da kapsayan herhangi bir gen tedavisi için oldukça önemlidir. Bu nedenle NF- κ B aktivasyonunun boyutunu belirlemek için, A549 akciğer kanser hücreleri NF- κ B promotörlü Lusiferaz reporter genini taşıyan bir rekombinant adenovirüs vektörü (AdNF- κ B α Luc) ve Ad5hTRAIL vektörü ile birlikte enfekte edildi. Lusiferaz testleri enfeksiyonu takiben 30. saatte gerçekleştirildi. Şekil 4.5' de görüldüğü gibi, NF- κ B aktivasyon oranı açık bir şekilde Ad5hTRAIL'ın 5,000 DNA partikül/hücre MOI'de

enfeksiyonunun bir sonucu olarak elde edildi. AdIKK β KA enfeksiyonunun NF- κ B aktivasyonunu azaltıp azaltmadığını kontrol etmek için, A549 akciğer kanser hücrelerinde AdNF- κ BLuc, Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA'yı içeren üçlü bir enfeksiyon deneyi uygulandı. İlginç bir şekilde, TRAIL indüklü NF- κ B aktivitesi AdIKK β KA vektörü ile enfekte edilmiş A549 akciğer kanser hücrelerinde oldukça azaldı. Diğer taraftan, AdCMVLacZ virüs enfeksiyonu, A549 akciğer kanser hücrelerinde ne TRAIL aracılı ne de endojen NF- κ B aktivitesini inhibe etmedi (Şekil 4.5).

4.5. NF- κ B İnhibisyonu Altında Ad5hTRAIL Enfeksiyonu Sonuçları

A549 akciğer kanser hücre hattı IKK inhibisyonu ile sağlanan TRAIL-indüklü sitotoksitenin mekanizması olan apoptozisi açıklamak amacıyla; akış sitometrisi öncesi Annexin V boyaması yapıldı. Annexinler, kalsiyum varlığında fosfolipidlere bağlanan bir grup homolog proteinlerdir. Bu çalışmada kullanılan Annexin V-FITC ise yine kalsiyum varlığında fosfatidilserine bağlanan floresan bir probdur. Apoptozise uğrayan hücrelerde bir takım hücrel değişimler olmaktadır ve bu değişimlerden birisi de apoptozisin erken evrelerinde fosfolipid asimetrisinin kaybıdır. Canlı hücrelerde fosfatidilserin, Mg-ATP bağımlı enzim aminofosfolipid translokaz aracılığı ile lipid tabakanın iç yüzüne transport edilir. Apoptozis başladığında, normal olarak plazma membranının iç kısmında bulunan fosfatidilserin membranın dış kısmına geçmektedir. Membranın dış kısmına geçen fosfatidilserine kalsiyumun varlığında Annexin V-FITC bağlanabilmektedir. Propidium iodide (C₂₇H₃₄I₂ N₄) ise nüklear bir floresan boyadır. Erken apoptozisi tanımlamada Annexin V-FITC ve Propidium iodide (PI) birlikte kullanılmaktadır. Annexin V-FITC pozitif, PI negatif erken apoptotik hücreleri, Annexin V-FITC negatif, PI negatif canlı hücreleri ve Annexin V-FITC pozitif, PI pozitif geç apoptozisi yada ölü hücreleri tanımlamaktadır.

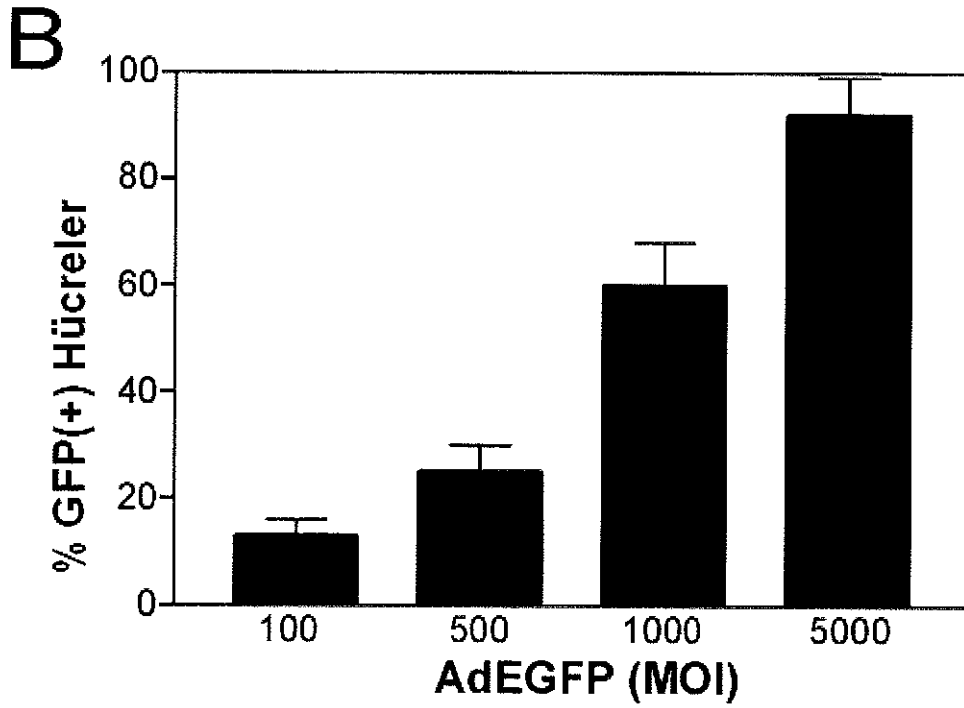
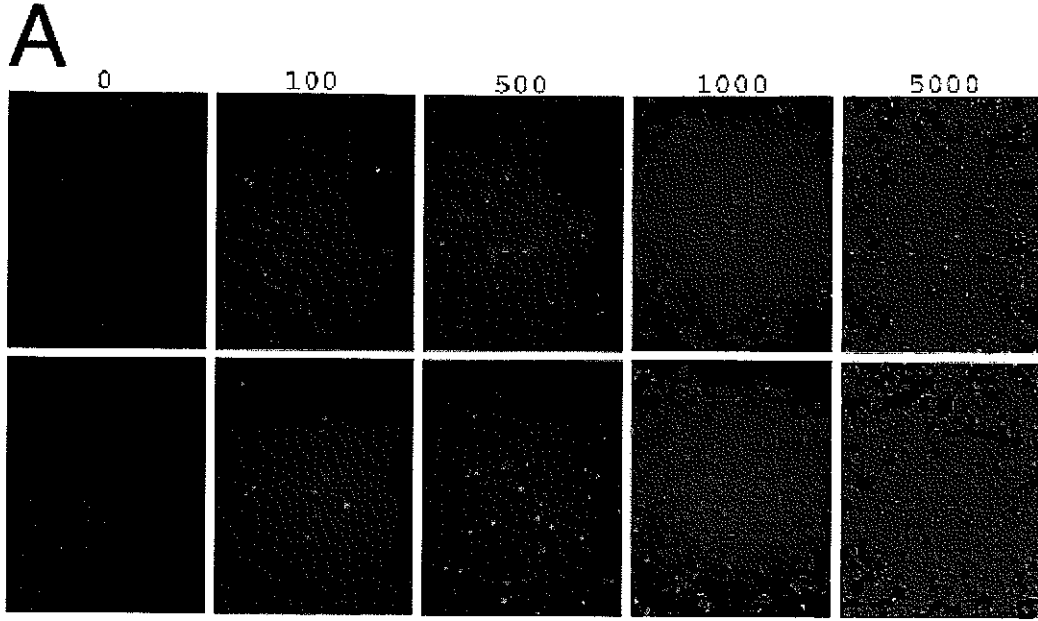
Materyal ve Metod bölümünde de belirtildiği şekilde, boyama işleminden önce A549 hücreleri, Ad5hTRAIL veya AdIKK β KA vektörleri tek başına ya da birlikte olacak şekilde enfekte edildi. Apoptotik hücre ölümleri enfeksiyonu takiben 48.saatte Annexin-V-FITC boyama kiti kullanılarak akış sitometrisinde belirlendi. Şekil 4.6, Panel A'da görüldüğü gibi sadece Ad5hTRAIL ve sadece AdIKK β KA ile enfekte edilmiş hücrelerde Annexin V ile minimum hücre boyaması belirlendi. Ad5hTRAIL ve AdIKK β KA'nın birlikte A549 hücrelerine enfeksiyonu yüksek miktarda apoptotik hücre ölümü meydana getirmesine karşın (Şekil 4.6, Panel B), diğer taraftan Ad5hTRAIL ve AdCMVLacZ (negatif kontrol)'nin birlikte enfeksiyonu hücrelerde böyle bir etki meydana getirmedi. Sonuç olarak, sadece IKK inhibisyonunun sağlanması ile birlikte Ad5hTRAIL enfeksiyonu A549 akciğer kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü meydana getirdi.

4.6. A549 Akciğer Kanser Hücre Hattında TRAIL Reseptör Ekspresyonları

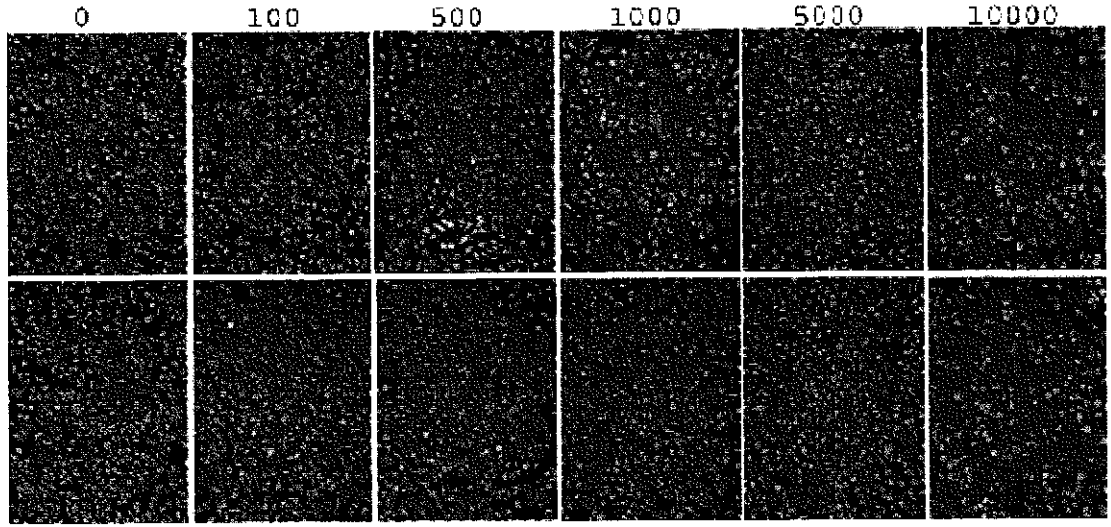
Daha önceki yıllarda kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğinin mekanizmasını açıklamak için büyük bir uğraşı verilmesine rağmen, kanser hücrelerinde TRAIL reseptörlerinin ekspresyon profilleriyle TRAIL duyarlılığı arasında bir bağlantı kurulamamıştır (101). Çalışmamızda her bir TRAIL reseptörüne özgül olarak dizayn edilmiş primer-prob setleri kullanılarak A549

akciğer kanser hücrelerinde Real Time RT-PCR yapılmıştır. Hücre içi TRAIL reseptörleri mRNA ekspresyonları Şekil 4.7'de görülmektedir. A549 akciğer kanser hücrelerinde, TRAIL'a ait dört TRAIL reseptöründe gen ekspresyonunun mevcut olduğu belirlenmesine karşın, bu reseptörler arasında TRAIL-R2 ölüm reseptörünün gen ekspresyonu en yüksek olarak gözlemlendi. A549 akciğer kanser hücrelerinde TRAIL-R1 ve TRAIL-R4 reseptör gen ekspresyonları benzer oranlarda iken, TRAIL-R3 yalancı reseptör gen ekspresyonu ise diğer üç reseptör ile karşılaştırıldığında en düşük olarak bulundu.

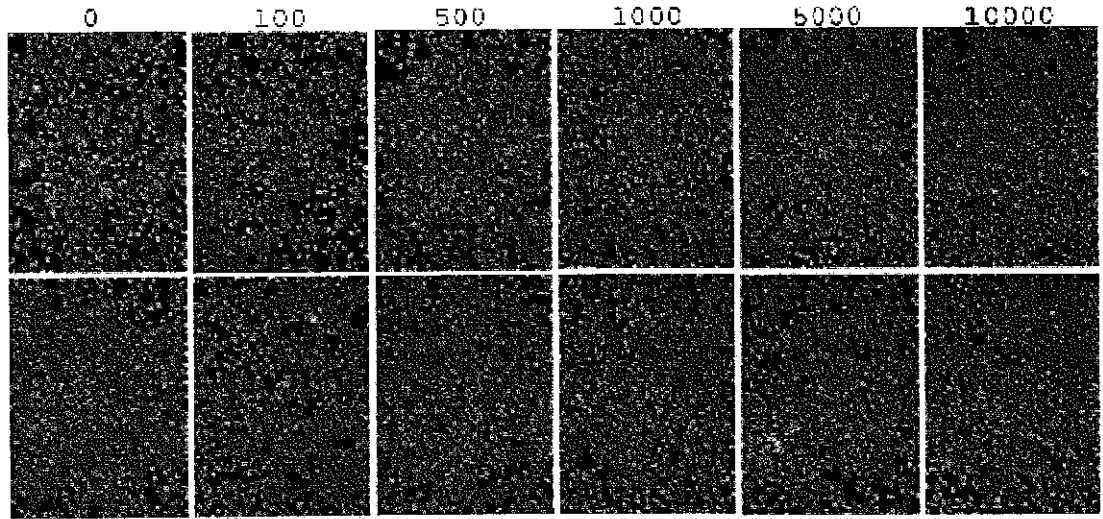
Hücre içi gen ekspresyonu, hücre yüzeyi protein ekspresyonu ile her zaman aynı olamayabileceği için, hücre yüzeyi gen ekspresyonunu belirlemek amacıyla her bir TRAIL reseptör alt tipi için spesifik antikorlar kullanılarak akış sitometrisi analizleri gerçekleştirildi. Bu deney dört TRAIL reseptöründe A549 akciğer kanser hücrelerinin yüzeyinde ekspresyon edildiğini gösterdi (Şekil 4.8). Real Time RT-PCR sonuçlarına göre TRAIL-R2 mRNA oranı TRAIL-R1 mRNA'sından çok daha yüksekti, akış sitometrisi sonuçlarına göre ise A549 akciğer kanser hücrelerinin hücre yüzeyinde bu iki reseptör arasında protein ekspresyonu oranları çok farklı değildi (Şekil 4.8, Panel A). Buna karşın, A549 akciğer kanser hücrelerinin yüzeyinde yüksek miktarda TRAIL-R4 yalancı reseptör protein ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.8, Panel B). TRAIL-R3 dekok reseptör protein ekspresyonu dört reseptör arasında en düşük düzeyde olmasına rağmen, hala hücre yüzeyinde belirlenebilmekteydi.



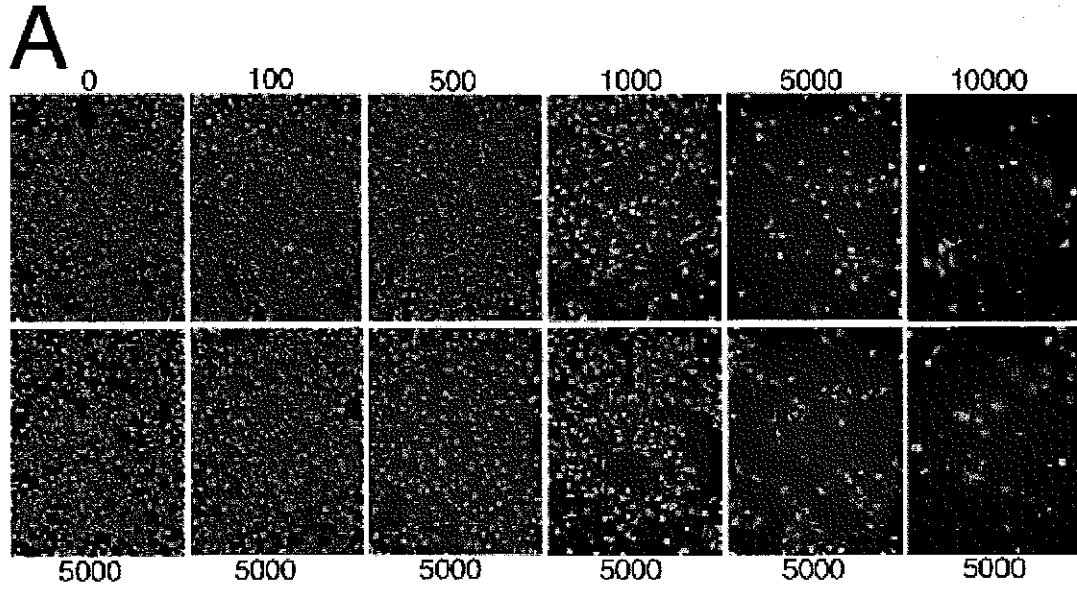
Şekil 4.1. A549 akciğer kanser hücreleri birinci jenerasyon rekombinant adenoviral vektörler ile etkili bir şekilde transdüksiyona uğratıldı. Panel A, Floresan mikroskop altında görüntülenmiş EGFP pozitif hücreleri, Panel B ise akış sitometrisi analiz sonuçlarını vermektedir. DNA partikül/hücre MOI değerleri olarak uygulanmış viral dozlar panellerin üzerinde belirtilmiştir. Her bir enfeksiyon iki kez tekrarlanmıştır.



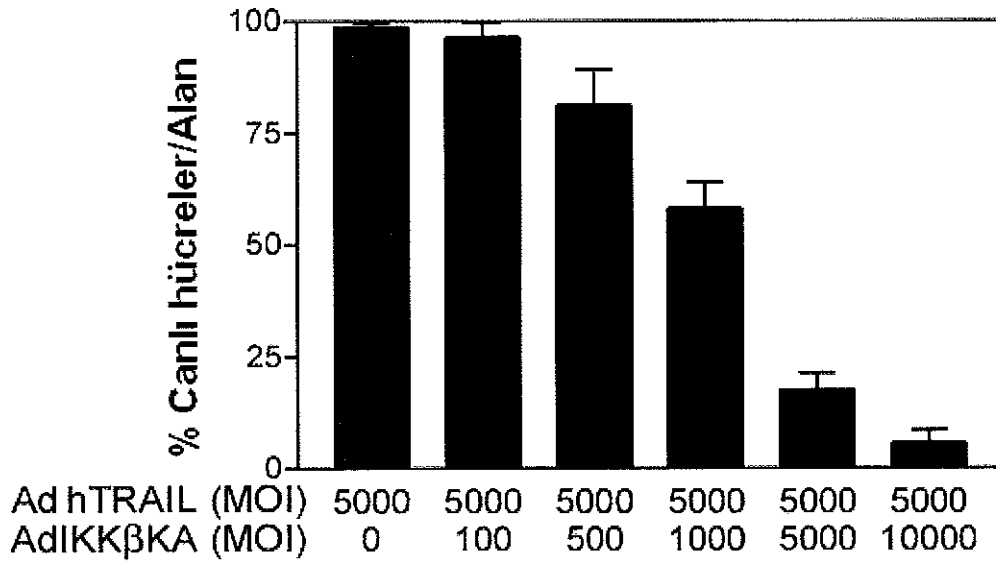
Şekil 4.2. Tek başına Ad5hTRAIL enfeksiyonu A549 akciğer kanser hücrelerinin canlılığını etkilemedi. DNA partikül/hücre MOI değerleri olarak uygulanmış viral dozlar panellerin üzerinde belirtilmiştir. Her bir enfeksiyon iki kez tekrarlanmıştır.



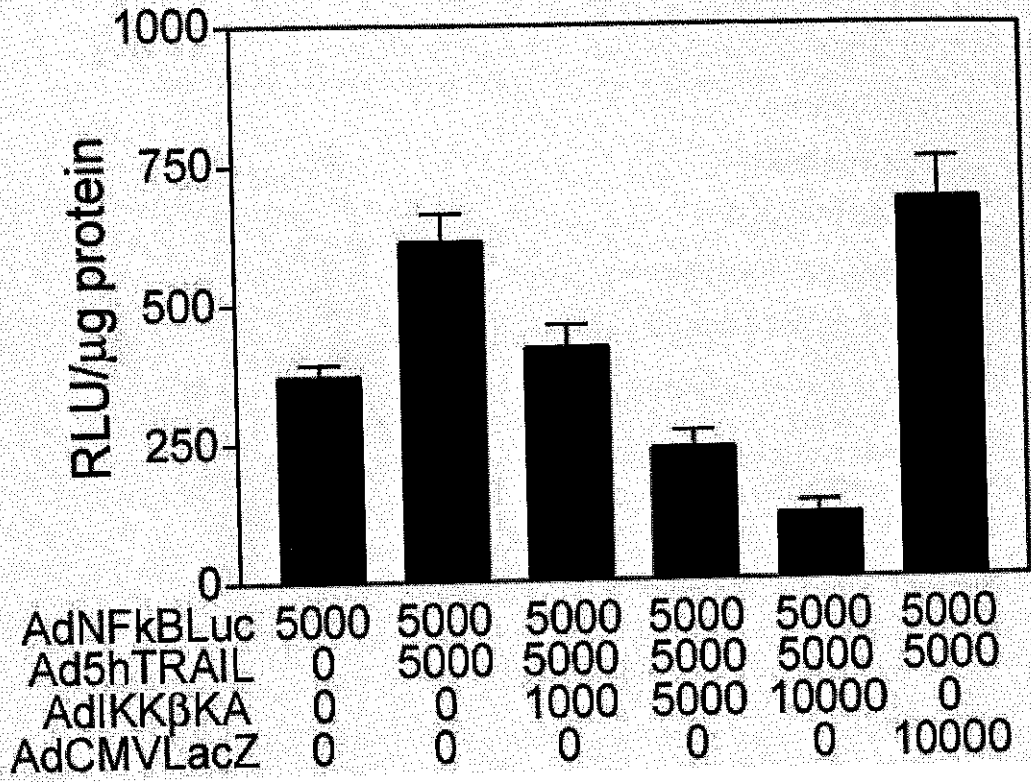
Şekil 4.3. Tek başına AdIKK β KA enfeksiyonu A549 akciğer kanser hücrelerinin canlılığını etkilemedi. DNA partikül/hücre MOI değerleri olarak uygulanmış viral dozlar panellerin üzerinde belirtilmiştir. Her bir enfeksiyon iki kez tekrarlanmıştır.



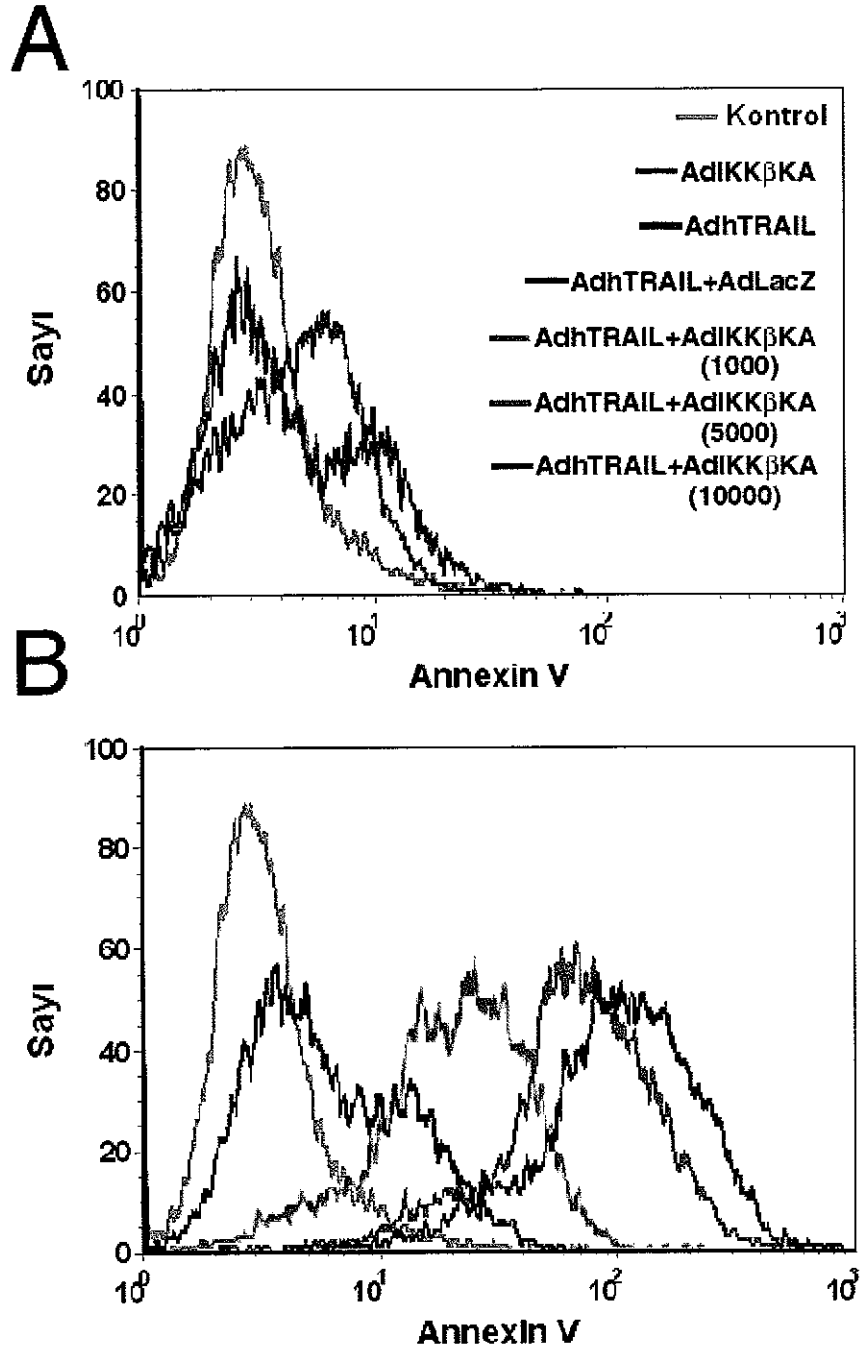
B



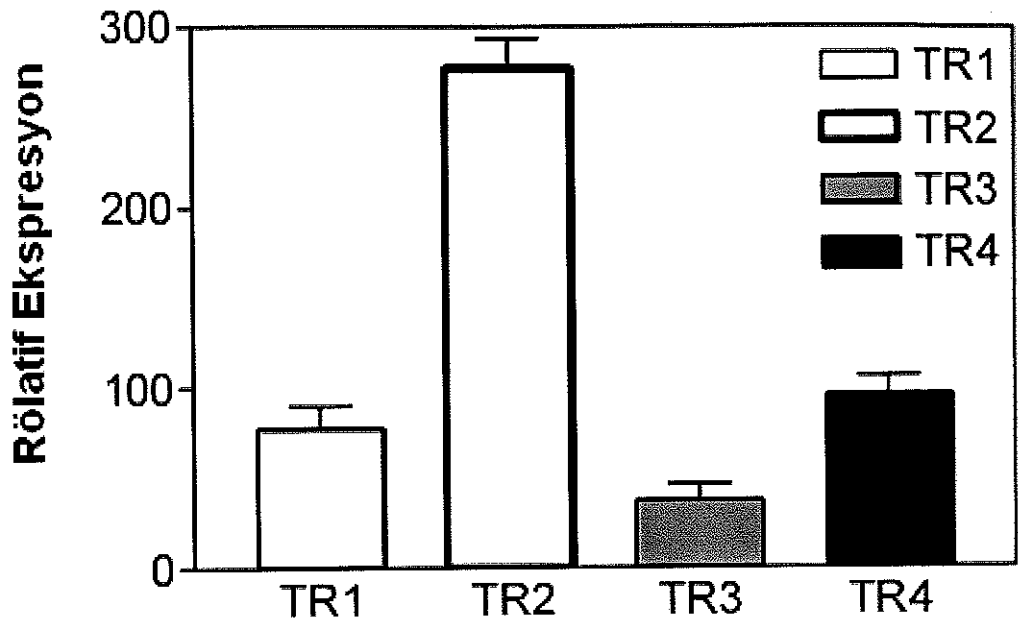
Şekil 4.4. AdIKKβKA virüs enfeksiyonu A549 akciğer kanser hücrelerini TRAIL aracılı apoptozise karşı duyarlı kıldı. Kullanılan viral dozlar her bir panelde gösterilmiştir. Panel A enfeksiyonun floresan mikroskop görüntülerini, Panel B ise hücre canlılığının kantitatif olarak değerlendirmesini vermektedir. Değerler, üç farklı deneyin sonuçlarının ortalamasını göstermektedir.



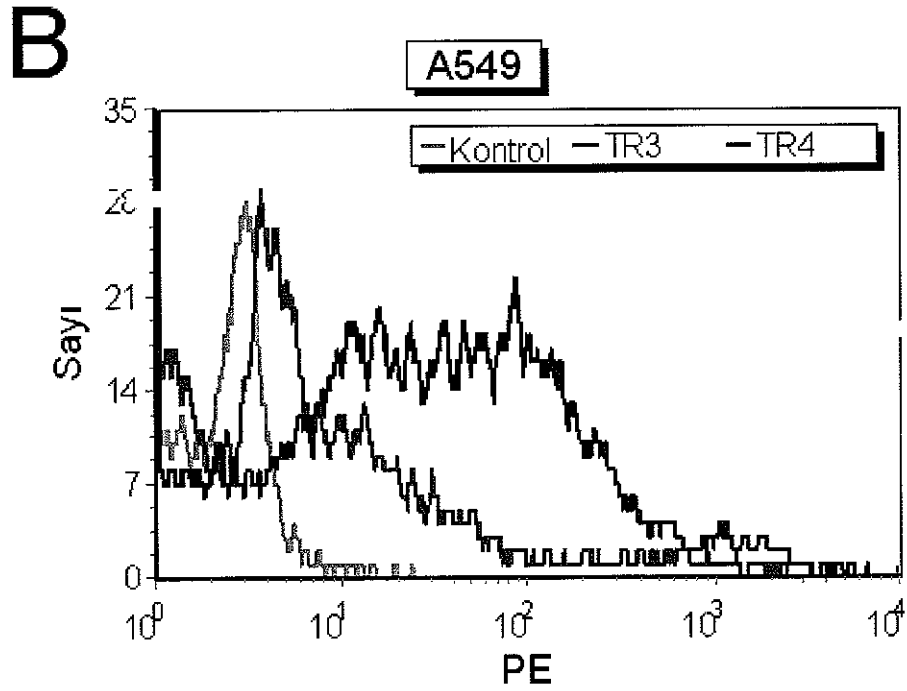
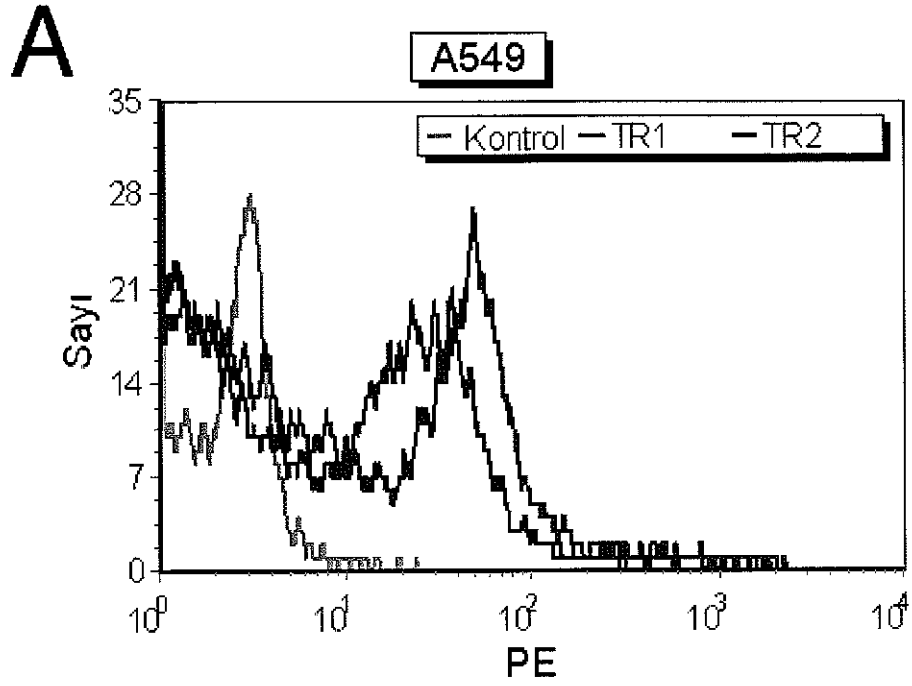
Şekil 4.5. A549 hücrelerinde Ad5hTRAIL enfeksiyonu ile NF-κB aktivitesi artırılmasına karşın AdIKKβKA enfeksiyonu ile azaltıldı. X ekseninde enfeksiyonda kullanılan viral vektörleri ve DNA partikül/hücre olarak verilmiş MOI değerlerini, Y ekseninde ise her bir mikrogram (μg) protein başına düşen Rölatif Işık Miktarı (RLU) olarak ifade edilmiş Lusiferaz aktivitesini göstermektedir. Değerler altı bağımsız verinin ortalamasını ifade etmektedir.



Şekil 4.6. Panel A içerisinde Anneksin V-FITC boyaması ve akış sitometrisi öncesi A549 akciğer kanser hücrelerine uygulanan adenoviral vektörlerin çeşitli kombinasyonları verilmiştir. Her bir histogram için değerlendirme 10^4 A549 akciğer kanser hücresi ile sınırlandırılmıştır. Histogramlar anlaşılır olması amacıyla iki farklı panelde gösterilmiştir. AdIKKβKA ve AdhTRAIL vektörleri şekil üzerinde aksi belirtilmediği sürece 5000 DNA partikül/hücre MOI olarak kullanılmıştır. Enfekte edilmemiş fakat FITC-Anneksin V ve PI ile boyanmış A549 akciğer kanser hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.7. A549 akciğer kanser hücrelerinde mRNA oranlarına dayalı TRAIL reseptör profili Ribozomal RNA primerleri ve probları her bir reaksiyonda internal kontrol olarak kullanıldı. Rölatif ekspresyon/25 pgs rRNA oranları Y ekseninde gösterilmektedir.



Şekil 4.8. A549 akciğer kanser hücrelerinde TRAIL reseptörlerinin yüzey ekspresyon profili Her bir histogram için değerlendirme 10^4 A549 akciğer kanser hücresi ile sınırlandırılmıştır Histogramlar anlaşılır olması amacıyla iki farklı panelde gösterilmiştir

TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Akciğer kanseri, dünyada hem kadınlarda hem de erkeklerde en fazla ölüme sebebiyet veren kanser türüdür. Günümüzde kemoterapi ve radyoterapi, pek çok kanserde olduğu gibi akciğer kanserinde de en yaygın tedavi yöntemleri arasındadır. Ancak, bu iki tedavi metodunun da tümöre karşı etkisini gösterebilmesi, p53 tümör baskılayıcı proteinin varlığını gerektirmektedir (24). Akciğer kanserlerinde ise % 80 oranında p53 geninde mutasyonlara rastlanmaktadır (25). Sonuç olarak, p53 proteini olmayan tümörler, hem kemoterapi hem de radyoterapiye karşı direnç göstermektedir (26). Ancak, ölüm ligantlarının apoptozisi p53'ten bağımsız olarak indüklediğinin gösterilmesi ölüm ligantlarının potansiyel kanser tedavi edici ajanlar olarak değerlendirilmesini sağlamıştır (27). Ölüm ligantlarından biri olan TRAIL'in normal hücrelere zarar vermemesi ve sadece kanser hücrelerinde apoptozisi seçici olarak indükleyebilmesi, TRAIL'in sistemik olarak da kullanılabilmesi olasılığını gündeme getirmiştir (102).

Adenovirüsler, düz çift zincirli DNA'ya sahip zarfsız virüslerdir. Normal şartlar altında insanlarda ciddi enfeksiyonlara sebebiyet vermemeleri, bölünen veya bölünemeyen hücreleri enfekte edebilmeleri, konakçı genomuna entegre olmamaları ve çok miktarda üretilibilmeleri gibi özellikleri nedeni ile gen tedavisinde sıklıkla tercih edilen viral vektörlerdir (75). Daha önce yapılan çalışmalarda, tamamen farklılaşmış ve polarize olmuş hücrelerde solunum yolu epitel hücrelerine adenovirüs aracılı gen transferinin düşük etkisi hücrelerin apikal yüzeyinde mevcut bulunan Coxsachie adenovirüs reseptörünün (CAR) düşük ekspresyonuna bağlanmıştır. Sonuç olarak, düşük oranda CAR ekspresyonuna sahip hücrelere adenovirüs aracılı gen transferi yapmak oldukça güçtür. (103) Çalışmamızda kullandığımız A549 hücre hattının ise yüksek oranda CAR reseptör ekspresyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (104). Bu nedenle, adenovirüs aracılı TRAIL transferi için bu hücre hattı tercih edilmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak, A549 akciğer kanser hücrelerine, transgenleri aktarabilmemiz için gerekli optimum adenovirüs dozunu belirlemek amacıyla yeşil floresan proteinini kodlayan adenoviral vektörler ile transdüksiyon gerçekleştirilmiştir. Virüs enfeksiyonunu takiben 48. saatte transdüksiyonun etkisi hem floresan mikroskop altında hem de kantitatif olarak akış sitometrisi analizleri ile değerlendirilmiştir. A549 akciğer kanser hücrelerine hücre başına 5,000 adenovirüs verildiğinde bu hücrelerin % 90-95 oranında etkin bir şekilde transdüksiyona uğratıldığı saptanmıştır (Şekil 4.1). Bu sonuç, A549 akciğer kanser hücrelerinin adenovirüslerle etkin bir şekilde transdüksiyona uğratılabileceğini ve bu etkin dozun 5000 MOI olduğunu göstermiştir. Akciğer kanser hücrelerinin TRAIL'a karşı duyarlılığını belirlemek amacıyla A549 akciğer kanser hücreleri artan dozlarda TRAIL genini kodlayan adenoviral vektörler ile transdüksiyona uğratılmıştır. A549 akciğer kanser hücreleri, Ad5hTRAIL'in oldukça yüksek dozları (10,000 DNA partikül/hücre MOI) kullanılmasına rağmen TRAIL'in sitotoksik etkilerine karşı tamamen dirençli olarak bulunmuştur (Şekil 4.2). Lee ve arkadaşları tarafından

yapılan bir çalışmada, TRAIL'ın A549 akciğer kanser hücrelerinde NF- κ B yolunu aktive ettiği gösterilmiştir (86). Ayrıca Şanlıoğlu ve arkadaşları tarafından elde edilen bulgulardan da yola çıkarak TRAIL'a karşı dirençliliğin gelişiminden sorumlu ana sinyal yollardan birinin NF- κ B sinyalleşmesi olabileceği düşünülmüştür (105). Daha önce de değinildiği gibi, uyarılmamış hücrelerde NF- κ B sitoplazmada I κ B α ve I κ B β 'ya bağlı olarak bulunmaktadır. NF- κ B yolunun aktivasyonu ile aktif hale gelen spesifik kinazlar (IKK), inhibitör proteinleri (I κ B'ler) fosforile etmekte ve fosforile edilmiş proteinler poliubiquitinlenerek hızlı bir şekilde proteozom tarafından parçalanmaktadır. I κ B'lerin parçalanması NF- κ B'nin serbest kalmasına yol açmakta, serbest kalan NF- κ B nükleusa hareket ederek, bir anti-apoptotik faktör olarak fonksiyon görmektedir (53-56). Çalışmamızda IKK inhibisyonu sağlanarak NF- κ B yolağının engellenmesi yoluna gidilmiştir. Tek başına IKK β 'nin dominant negatif formunu kodlayan adenovirüsler ile artan dozlarda yapılan enfeksiyon sonucunda, A549 akciğer kanser hücrelerinin canlılığında herhangi bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 4.3). Fakat, Ad5.hTRAIL miktarı sabit tutularak artan dozda AdIKK β KA vektörü verildiğinde ise, hücrelerin TRAIL'a duyarlı hale geldiği gözlenmiştir (Şekil 4.4). Duyarlılık enfeksiyonda kullanılan AdIKK β KA'nın dozuna bağlı olarak bulunmuştur. TRAIL ekspresyonundaki artış NF- κ B aktivitesini uyarmasına karşın, IKK β KA ekspresyonunda artış Lusiferaz gen testlerinde gösterildiği gibi TRAIL indüklü NF- κ B aktivitesini azaltmıştır (Şekil 4.5). Cevaplanması gereken bir başka soru ise bu hücrelerin gerçekten apoptozis nedeniyle mi yoksa başka bir sebepten dolayı mı öldüğüdür. Apoptozisin varlığını göstermek amacıyla Anneksin V ile boyama yapılmıştır. Anneksin V boyama akış sitometrisi sonuçları (Şekil 4.6) NF- κ B aktivitesinin baskılanmasına yol açan IKK inhibisyonunun, TRAIL aracılı apoptozisin indüksiyonu ile sonuçlandığını göstermiştir. Bu sonuçlar, NF- κ B aktivasyon yolunun, A549 hücrelerinde TRAIL aracılı apoptozisi engelleyici bir etkiye sahip olduğunu ve bu yolun engellenmesinin TRAIL aracılı apoptozise karşı akciğer kanser hücrelerini duyarlı hale getirmede önemli olduğunu göstermiştir.

İnsan tümörlerinin en az % 50'sinin TRAIL'a karşı dirençlilik gösterdiği rapor edilmiştir (102). Şimdiye kadar TRAIL dirençliliğini açıklamak için iki farklı hipotez ileri sürülmüştür. İlk hipotez, TRAIL'a bağlanmak için apoptozisi indükleyici TRAIL reseptörleri ile rekabete giren yalancı reseptörlerin varlığıdır. Bu hipotez, yalancı reseptörlerin ölüm reseptörlerine bağlanabilecek TRAIL ligantlarının sayısını azaltarak (TRAIL-R3 gibi), veya hücrelere anti-apoptotik sinyaller göndererek (TRAIL-R4 gibi) fonksiyon gördüklerini savunmaktadır (106-108). Fakat, RNase koruma testleri ile akciğer kanser hücre hatlarında TRAIL duyarlılığı ve TRAIL-R1, TRAIL-R2 ve TRAIL-R3'ün ekspresyonları arasında herhangi bir bağlantı gösterilememiştir. Yine bu çalışma da A549 akciğer kanser hücrelerinin TRAIL aracılı gen tedavi yaklaşımına dirençli olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, her nedense A549 hücre hattında TRAIL-R4 ekspresyonu incelenmemiştir (109). İkinci hipotez ise, TRAIL aracılı apoptozisi engelleyici apoptozis inhibe edici moleküllerin varlığıdır (110). Örneğin bir kaspaz 8 homoloğu olan c-FLIP'in ekspresyon oranı daha önceleri kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğinden sorumlu tutuluyordu (111). Fakat, Western Blot ile KHOAK hücre hatlarında yapılan tarama sonucu TRAIL dirençliliği ve c-FLIP'in ekspresyonu arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır (112). Beklenenin aksine, TRAIL

dirençli hücre hatlarında (A549, Calu1 ve SkLu1) c-FLIP'in düşük oranları gözlenmesine karşın, TRAIL duyarlı hücre hatlarında (NCI-H358) c-FLIP'in daha yüksek oranlarda eksprese edildiği gözlenmiştir. Bundan dolayı, KHOAK'lerinde TRAIL dirençliliğinden c-FLIP ekspresyon düzeyinden başka mekanizmalarında sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır. TRAIL dirençliliğinin gelişiminden sorumlu ana sinyal yollardan birinin NF-κB sinyalleşmesi olabileceği düşünülmektedir (105). Buna uygun olarak, TRAIL'ın kendi başına A549 akciğer kanser hücrelerinde NF-κB yolunu aktive ettiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise, artmış AKT aktivitesi KHOAK hücre hatlarının bir kısmında gözlenmiş TRAIL dirençliliğinden sorumlu tutulmuştur (113).

Şimdiye kadar, TRAIL dirençliliğinin moleküler mekanizmasını açıklayabilmek amacıyla yapılan pek çok çalışmaya rağmen, TRAIL reseptörlerinin ekspresyonları ve TRAIL dirençliliği arasında herhangi bir ilişki rapor edilmemiştir (109). Çalışmamızda A549 akciğer kanser hücrelerinde TRAIL reseptör gen ekspresyon profilini belirlemek amacıyla, her bir reseptöre özgü primer-prob setleri kullanılarak kantitatif Real Time RT-PCR yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar A549 akciğer kanser hücrelerinde, TRAIL reseptörlerinden dördünün de eksprese edildiğini göstermiştir ve bu dört reseptörden TRAIL-R2 ölüm reseptörünün ekspresyon oranı en yüksek olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Bilindiği gibi hücre içerisindeki mRNA oranlarına dayalı gen ekspresyonu, TRAIL duyarlılığı ile daha çok ilgili olan hücre yüzeyi protein ekspresyonu ile aynı olmayabilir. Bu nedenle A549 akciğer kanser hücrelerindeki hücre yüzeyi TRAIL reseptör protein ekspresyonlarını belirlemek amacıyla her bir TRAIL reseptörüne özgü antikorlar kullanılarak akış sitometrisi analizleri yapılmıştır. Hücre yüzeyinde TRAIL reseptörlerinin tümü eksprese edilmesine karşın, ölüm reseptörleri ile dekoky reseptör ekspresyon oranları karşılaştırıldığında, TRAIL-R4 yalancı reseptör protein ekspresyonunun diğerlerine göre önemli oranda yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8). İlginç bir şekilde, Delgi-Esposti ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada, artmış TRAIL-R4 ekspresyonunun TRAIL aracılı sitotoksiteden hedef hücreleri koruduğu rapor edilmiştir (100). Bu rapor geçici TRAIL-R4 ekspresyonunun, hem bir yalancı reseptör hem de bir anti-apoptotik sinyal sağlayıcı olarak hareket ederek hücreleri apoptozisten koruduğunu iddia etmiştir. Tüm bu sonuçlar, hücre yüzeyi TRAIL-R4 ekspresyonunun, kanser hücrelerinde TRAIL duyarlılığını kesin bir şekilde etkileyeceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda A549 akciğer kanser hücre hattında rekombinant adenovirüs aracılı TRAIL'ın tedavi edici etkisi araştırılmıştır. A549 hücre hattında ortaya çıkan TRAIL dirençliliğini yıkmak için IKK inhibisyonunu içeren komplementer bir gen tedavi modeli test edilmiştir. Ayrıca, A549 hücre hattında ortaya çıkan TRAIL dirençliliğinin moleküler mekanizması araştırılmış, TRAIL dirençliliği ve TRAIL yalancı reseptör gen ekspresyonu arasında bir bağlantı kurulmuştur. Ancak, bu bağlantının kesinleştirilmesi için birkaç primer hücre hattını da içeren daha fazla akciğer kanser hücre hattında detaylı olarak tarama yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak, ekzojen TRAIL ekspresyonu ile birlikte NF-κB yolunun inhibisyonunu kapsayan ikili bir gen tedavi stratejisinin, akciğer kanserli hastalar için tedavi edici potansiyeli olduğu düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- 1) Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., Ghafour, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E.J., Thun, M.J. Cancer Statistics, 2004. A Cancer Journal for Clinicians 54: 8-29. (2004)
- 2) Carney, DN. Lung cancer--time to move on from chemotherapy. N Engl J Med 346:126-128. (2002)
- 3) www.turkcancer.org/pdf/turkiye%20_istatistikleri_2pdf
- 4) http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser_epidemiyojisi.htm
- 5) http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric_2_4_1x_what_is_lung_cancer_26.asp
- 6) <http://emice.nci.nih.gov/>
- 7) Gazioglu, K. Akciğer Hastalıkları. 7. Baskı. Nobel Tıp Kitapevi. İstanbul (1997)
- 8) Erk, M. Göğüs Hastalıkları. 2. Cilt. İstanbul Ün. Cerrahpaşa Tıp Fak. İstanbul (2001)
- 9) Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. Pathologic basis of disease. Sixth Edition. Chapter 16. W.B. Saunders Company. p: 387-89. (2001)
- 10) www.medicinenet.com/lungcancer/article.htm
- 11) www.fleshandbones.com/readingroom/pdf/266.pdf
- 12) Fossella, F.V. Lung Cancer. Chapter 15. p 281 (2002)
- 13) Köktürk, N., Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi. Solunum 5 (3): 127-138. (2003)
- 14) Hastürk, S., Yüksel, M. Akciğer Kanseri. Bölüm 1. İstanbul. (2000)
- 15) Mao, L. Molecular abnormalities in lung carcinogenesis and their potential clinical implications. Lung cancer 34: 27-34 (2001)
- 16) Fong, K.M., Sekido, Y., Gazdar, A.F., Minna, J.D. Lung Cancer 9; Molecular biology of lung cancer: clinical implications. Thorax 58(10): 892-900 (2003)

- 17) Rom, W.N., Hay, J.G., Lee, T.C., Jiang, Y. Molecular and Genetic Aspects of Lung Cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161 (4): 1355-67 (2000)
- 18) Forgacs, E., Zöchbauer-Müller, S., Olah, E., Minna, J.D. Molecular Genetic Abnormalities in the Pathogenesis of Human Lung Cancer. *Pathology Oncology Research* 7(1): 6-13 (2001)
- 19) Cowell, J.K. *Molecular Genetics of Cancer. Second Edition. Chapter 17.* BIOS Scientific Publishers Limited, USA. (2001)
- 20) Sozzi, G. Molecular biology of lung cancer. *European Journal of Cancer* 37(7): 63-73 (2001)
- 21) Kaye, F.J. Molecular biology of lung cancer. *Lung Cancer* 34: 35-41 (2001)
- 22) Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D. Apoptozisin Önemi. *Derleme. Toraks* 2(1): 91-95. (2001)
- 23) Reed, J.C. Mechanisms of Apoptosis. Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture. *American Journal of Pathology* 157 (5): 1415-1430. (2000)
- 24) Levine, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-31. (1997).
- 25) Bunn, P.A., Soriano, A., Johnson, G., Heasley, L. New Therapeutic Strategies for Lung Cancer. *Chest* 117: 163-168. (2000).
- 26) Obata, A. et al. Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer* 89: 187-93. (2000).
- 27) Ehlert, J.E. & Kubbutat, M.H. Apoptosis and its relevance in cancer therapy. *Onkologie* 24: 433-40. (2001).
- 28) Terlikowski, S.J. Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. *Rocz Akad Med Bialymst* 46: 5-18 (2001).
- 29) Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-65. (1997).
- 30) Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3 (6): 673-82. (1995).
- 31) Pitti, R.M., Masters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., Ashkenazi, A. Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a New Member of the Tumor

Necrosis Factor Cytokine Family. *The Journal of Biological Chemistry* 271(22): 12687-12690. (1996)

- 32) Marsters, S.A., Sheridan, J.P., Pitti, R.M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A.D., Godowski, P., Ashkenazi, A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 7 (12): 1003-6. (1997)
- 33) Almasan, A., Ashkenazi, A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14: 337-348. (2003)
- 34) Özören, N., El-Deiry, W.S. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Seminars in Cancer Biology* 13: 135-147. (2003)
- 35) Goddwin, R.G., Smith, C.A. The TRAIL of death. *Apoptosis* 3: 83-88. (1998)
- 36) Nagane, M., Huang, J.S., Cavenee, W.K. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis* 6: 191-197. (2001)
- 37) Le Blanc, H.N., Ashkenazi, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death and Differentiation* 10: 66-75. (2003)
- 38) Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyon, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V.M. The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Science* 276: 111-113. (1997)
- 39) MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G.M., Alnemri, E.S. Identification and Molecular Cloning of Two Novel Receptors for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (41): 25417-25420. (1997)
- 40) MacFarlane, M. TRAIL-induced signaling and apoptosis. *Toxicology Letters* 139: 89-97. (2003)
- 41) Wang, S., El-Deiry, W.S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22: 8628-8633. (2003)
- 42) Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R.A., James, I.E., Rosenberg, M., Lee, J.C., Young, P.R. Osteoprotegerin is a Receptor for Cytotoxic Ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (23): 14363-14367. (1998)

- 43) Kadin, M. E., Younes, A. Emerging Applications of the Tumor Necrosis Factor Family of Ligands and Receptors in Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology* 21(18): 3526-3534 (2003)
- 44) Shankar, S., Srivastava, R.K. Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications. *Drug Resistance Updates* 7: 139-156. (2004)
- 45) Zhang, L., Fang, B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Therapy*. November (2004)
- 46) Barnes, P.J., Karin, M. Nuclear Factor- κ B- A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *The New England Journal of Medicine* 336 (15): 1066-1071. (1997)
- 47) <http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb/>
- 48) <http://www.celldeath.de/encyclo/misc/nfkb.htm>
- 49) Baldwin, A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *The Journal of Clinical Investigation* 107 (3): 241-246. (2001)
- 50) Chen, F., Castranova, V., Shi, X. New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B in Cell Growth Regulation. *American Journal of Pathology* 159 (2): 387-397. (2001)
- 51) Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L.M. New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B, a Ubiquitous Transcription Factor in the Initiation of Diseases. *Clinical Chemistry* 45(1): 7-17. (1999)
- 52) Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 107 (2): 135-142. (2001)
- 53) Baetu, T.M., Kwon, H., Sharma, S., Grandvaux, N., Hiscott, J. Disruption of NF- κ B Signaling Reveals a Novel Role for NF- κ B in the Regulation of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Expression. *The Journal of Immunology* 167: 3164-3173. (2001)
- 54) Karin, M. The Beginning of the End: I κ B Kinase (IKK) and NF- κ B Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (39): 27339-27342. (1999)
- 55) Elstrom, R.L., Thompson, C.B. *Science of Clinical Oncology*. Chapter 6: Cell Life and Cell Death.

- 56) Lin, Y.L., Devin, A., Cook, A., Keane, M.M., Kelliher, M., Lipkowitz, S., Liu, Z.G. The Death Domain Kinase RIP is Essential for TRAIL (Apo2L)-Induced Activation of I κ B Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 20(18): 6638- 6645. (2000)
- 57) Karacay, B., Sanlioglu, S., Griffith, T.S., Sandler, A., Bonthius, D.J. Inhibition of the NF- κ B pathway enhances TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Gene Therapy* 11: 681-690. (2004)
- 58) Kimberley, F.C., Screaton, G.R. Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. *Cell Research* 14(5): 359-372. (2004)
- 59) Kelley, S.K., Ashkenazi, A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Current Opinion in Pharmacology* 4: 333-339. (2004)
- 60) Olsson, A. Molecular Characterization of Apoptosis in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. From Microbiology and Tumor Biology Center Karolinska Institutet, Stockholm (2005)
- 61) Pietro, R.D., Zauli, G. Emerging Non-Apoptotic Functions of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)/Apo2L. *Journal of Cellular Physiology* 201: 331-340. (2004)
- 62) El-Aneed, A. Current strategies in cancer gene therapy. *European Journal of Pharmacology* 498: 1-8. (2004)
- 63) http://www.healthatoz.com/healthatoz/Atoz/ency/gene_therapy.jsp
- 64) http://www.xlk.org.uk/gene_therapy.pdf#search='gene%20therapy%20for%20cancer'
- 65) Scholl, S.M., Michaelis, S., McDermott, R. Gene Therapy Applications to Cancer Treatment. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1: 35-45. (2003)
- 66) Rojas-Martinez, A., Martinez-Davila, I.A., Hernandez-Garcia, A., Aguilar-Cordova, E., Barrera-Saldana, H.A. Gene Therapy for Cancer. *Revista de Investigacion Clinica* 54(1): 57-67. (2002)
- 67) Templeton, N.S., Lasic, D.D. Gene Therapy Therapeutic Mechanisms and Strategies (2000)
- 68) Hendrie, P.C., Russell, D.W. Gene Targeting with Viral Vectors. *Molecular Therapy*. Article in Press (2005)

- 69) Harrington, K.J., Bateman, A.R., Melcher, A.A., Ahmed, A., Vile, R.G. Cancer Gene Therapy: Part 1. Vector Development and Regulation of Gene Expression. *Clinical Oncology* 14: 3-16. (2002)
- 70) Romana, G., Pacilio, C., Giordano, A. Gene Transfer Technology in Therapy: Current Applications and Future Goals. *Stem Cells* 17(4): 191-202. (1999)
- 71) Gonçalves, M.A. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology Journal* 2: 43. (2005)
- 72) Vorburger, S.A., Hunt, K.K. Adenoviral Gene Therapy. *The Oncologist* 7: 46-59. (2002)
- 73) Russell, W.C. Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology* 81: 2573-2604. (2000)
- 74) <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/peel/peel3.html>
- 75) Wu, Q., Moyana, T., Xiang, J. Cancer Gene Therapy by Adenovirus-Mediated Gene Transfer. <http://bentham.org/cgt1-1/xiang/xiangms.htm>
- 76) <http://www.meducator.org/archive/20030319/adenoviral.html>
- 77) Daniel, J.C., Smythe, W.R. Gene Therapy of Lung Cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 21: 196-204. (2003)
- 78) Robbins, P.D., Ghivizzani, S.C. Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacol. Ther.* 80(1): 35-47. (1998)
- 79) Zhang, W.W. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy* 6(2): 113-138. (1999)
- 80) Özvaran, M.K. Malign Mezotelyomada Gen Tedavisi. *Toraks Dergisi. Cilt 5, Sayı 2: 110-115.* (2004)
- 81) Swisher SG, Roth JA. Clinical update of Ad-p53 gene therapy for Lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 11: 521-535. (2002)
- 82) Nemunaitis J, Swisher SG, Timmans T. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 18: 609-622. (2000)
- 83) Honda T, Coppala , Ghibelli L. GSH depletion enhances adenoviral Bax-induced apoptosis in lung cancer cells. *Cancer Gene Therapy* 11(4): 249-255. (2004)

- 84) Albelda SM, Wiewrodt R, Sterman DH. Gene therapy for lung cancer neoplasms. *Clinics in Chest Medicine* 23: 265-277. (2002)
- 85) Hege KM, Carbone DP. Lung cancer vaccines and gene therapy. *Lung Cancer* 41: 103-113. (2003)
- 86) Lee KY, Park JS, Jee YK, et al. Triptolide sensitizes lung cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB activation. *Exp Mol Med* 34:462-468. (2002)
- 87) Jang SH. Additive effect of TRAIL and p53 gene transfer on apoptosis of human lung cancer cell lines. *Int J Mol Med* 13(1): 181-186. (2004)
- 88) Seol JY, Park KH, Hwang CI, Park WY, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Shim YS, Lee CT. Adenovirus-TRAIL can overcome TRAIL resistance and induce a bystander effect. *Cancer Gene Therapy* 10(7): 540-8. (2003)
- 89) Liu X, Yue P, Zhou Z, Khuri FR, Sun SY. Death receptor regulation and celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 1;96(23):1769-80. (2004)
- 90) Jin H, Yang R, Fong S, Totpal K, Lawrence D, Zheng Z, Ross J, Koeppen H, Schwall R, Ashkenazi A. Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival. *Cancer Res.* Jul 15;64(14):4900-5. (2004)
- 91) Shi J, Zheng D, Liu Y, Sham MH, Tam P, Farzaneh F, Xu R. Overexpression of soluble TRAIL induces apoptosis in human lung adenocarcinoma and inhibits growth of tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res.* May 1;65(9):3966. (2005)
- 92) Spierings DC, de Vries EG, Timens W, Groen HJ, Boezen HM, de Jong S. Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors. *Clin Cancer Res.* Aug 15;9(9):3397-405. (2003)
- 93) Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D, et al. The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J Cell Sci* 115:141-151. (2002)
- 94) Senftleben U, Li ZW, Baud V, et al. IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis. *Immunity* 14:217-230. (2001)

- 95) Sanlioglu AD, Aydin C, Bozcuk H, et al. Fundamental principals of tumor necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma. *Lung Cancer* 44:199-211. (2004)
- 96) Sanlioglu S, Engelhardt JF. Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways. *Gene Ther* 6:1427-1437. (1999)
- 97) Batra RK, Guttridge DC, Brenner DA, et al. IkappaBalpha gene transfer is cytotoxic to squamous-cell lung cancer cells and sensitizes them to tumor necrosis factor-alpha-mediated cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 238-245. (1999)
- 98) Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, et al. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD- dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7:821-830. (1997)
- 99) Schneider P, Thome M, Burns K, et al. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7:831-836. (1997)
- 100) Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, et al. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7:813-820. (1997)
- 101) Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, et al. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 161:2833-2840. (1998)
- 102) Griffith, T.S. & Lynch, D.H. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 10: 559-63. (1998)
- 103) Sanlioglu, S., Luleci, G., Thomas, K.W. Simultaneous inhibition of Rac1 and IKK pathways sensitizes lung cancer cells to TNF α -mediated apoptosis. *Cancer Gene Therapy* 8(11): 897-905. (2001)
- 104) Kaner, R.J., Worgall, S., Leopold, P.L. Modification of the genetic program of human alveolar macrophages by adenovirus vectors in vitro is feasible but inefficient, limited in part by the low level of expression of the coxsackie/adenovirus receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 361-370. (1999)
- 105) Sanlioglu AD, Koksai T, Baykara M, et al. Current progress in adenovirus mediated gene therapy for patients with prostate carcinoma. *Gene Ther Mol Biol* 7:113-133. (2003)

- 106) Sheridan, J.P. et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277: 818-21. (1997)
- 107) Pan, G. et al. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277: 815-8. (1997)
- 108) Srivastava RK. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* 3:535-546. (2001)
- 109) Kagawa S, He C, Gu J, et al. Antitumor activity and bystander effects of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene. *Cancer Res* 61:3330-3338. (2001)
- 110) French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signaling by FLICE-inhibitory protein as a mechanism for immune escape of tumors. *J Exp Med* 190:891-894. (1999)
- 111) French LE, Tschopp J. The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med* 5:146-147. (1999)
- 112) Frese S, Brunner T, Gugger M, et al. Enhancement of Apo2L/TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines by chemotherapeutic agents without correlation to the expression level of cellular protease caspase-8 inhibitory protein. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123:168-174. (2002)
- 113) Kandasamy K, Srivastava RK. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 62:4929-4937. (2002)

ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem AYDIN ACAR, 12.07.1980 tarihinde Ankara'da doğdu. İlköğrenimini 1987-1991 yılları arasında Ankara Şenlik İlkokulunda, orta ve lise öğrenimini 1991-1997 Ankara Keçiören Fatih Sultan Mehmet Lisesinde tamamladı. 1998-2003 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde öğrenim gördü. 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Tıbbi Genetik programında lisans üstü eğitimine başladı. 2004 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsüne Araştırma Görevlisi olarak atandı.