

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS CERRAHI ANABİLİM DALI**

**İNSAN AKCİĞER KANSER LC-3 HÜCRE HATLARINDA
TRPM5 İYON KANALININ OTOFAJİK HÜCRE ÖLÜMÜNDEKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Siyami AYDIN**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Akın Eraslan BALCI**

ELAZIĞ-2017

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur

Göğüs Cerrahi Anabilim Dalı

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Akın Eraslan BALCI

Danışman

Uzmanlık Sınavı Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince bana her tűrlű desteęi veren deęerli tez danıőman hocam Prof. Dr. Akın Eraslan BALCI'ya teőekkűr ederim. Tez yapım aőamasında emeęi ve yardımı olan Doç. Dr. Ebru Őnalán'a teőekkűrű borç bilirim. Hayatımın her daima yanında olan anneme ve bundan sonra yanımda bulunacak olan deęerli eőim ve kızlarım Beyzanur, Elif Sude'ye minnetlerimi sunarım.



ÖZET

Otofajik yollar, akciğer kanseri (LC) etiopatogenezisine katkıda bulunurlar. Otofajinin anahtar düzenleyicisi olarak tanımlanan hücre içi kalsiyum seviyeleri, kalsiyum kanalları tarafından kontrol edilir. Geçici potansiyel metastatin 5'in (TRPM5) otofajik yollarda rolünün olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada, akciğer kanseri A459 hücre hattındaki otofajik yol üzerinde, bir kalsiyum kanalı olan TRPM5'in rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

A459 %5 CO₂, % 95 hava ile 37°C'de nemlendirilmiş bir inkubatörde % 5 fetal bovin serumu içeren RPMI-1640 ortamında oluşturuldu. A459 hücre dizisindeki TRPM5, siRNA aracılığıyla bloke edildi. A459 hücrelerinden RNA izolasyonu ise üçlü reaktif ile yürütüldü. Otofaji ile ilişkili genlerin mRNA ifade şekilleri kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) ile gösterildi.

Transient Receptor Potential Melastanin 5-siRNA grubundaki TRPM5 mRNA ekspresyon düzeyinin, kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış olduğu görüldü. siRNA verimliliği ise qRT-PCR verileri kullanılarak % 83 olarak hesaplandı. Ayrıca, qRT-PCR sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TRPM5-siRNA grubunda, otofaji ile ilgili genler olan ATG3, ATG5, ATG10, ATG12, LC3A, LC3B, LAMP3BECLIN1, AMBRA1, ULKE3 seviyelerinde belirgin bir artış olduğu gösterildi.

Transient Receptor Potential Melastanin 5-siRNA uygulaması, otofajik yollardaki genlerin ekspresyonunu açıkça arttırmaktadır. Bu veriler, TRPM5 supresyonunun, otofajik mekanizmaları harekete geçirebileceğini göstermiştir. Kanserde, otofajinin, hücrelerin hem sağkalımına hem de ölümüne yol açabilen iki farklı fonksiyon gösterebileceği tespit edilmiştir. TRPM5 ile ilişkili otofajin tespit edilmesi ile TRPM5 otofajisi hedef alınarak inhibisyon ya da aktivasyon yapılabilir. Bu durum, hücrelerin otofajik ölümüne yol açan kanser tedavilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, otofaji, TRPM5 iyon kanalları, Hücre kültürü, qRT-PCR.

ABSTRACT

THE STUDY OF TRPM5 ION CHANNEL IN THE LINE OF AUTOFACIAL CELL IN LUNG CANCER CELL LINES

Autophagic pathways are contribute to lung cancer (LC) ethiopathogenesis. Intracellular calcium levels described as key regulator of autophagy are regulated by calcium channels. It is not known whether transient potential melastatin 5 (TRPM5) has a role in autophagic pathways. In this study, it is aimed to investigate the role of TRPM5, a calcium channel, on autophagic pathways in lung cancer A459 cell line.

A459 cells were grown in RPMI-1640 medium containing 5% fetal bovine serum in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. In A459 cell line, TRPM5 was blocked through siRNA. RNA isolation from A459 cells was conducted with Tri Reagent. mRNA expression profiles of genes related with autophagy was demonstrated by quantitative RT-PCR (qRT-PCR).

Transient Receptor Potential Melastatin 5 mRNA expression level in TRPM5-siRNA group was demonstrate significant decrease against to control group. siRNA efficiency was calculated as %83 using qRT-PCR data. In addition, qRT-PCR results demonstrated that compared with the control group there was a significant increase in autophagy related genes ATG3,ATG5, ATG10, ATG12, LC3A, LC3B, LAMP3 BECLIN1, AMBRA1, ULKE3 expression levels in TRPM5-siRNA group.

Transient Receptor Potential Melastatin 5-siRNA application clearly increases the expression of genes involved in autophagic pathways. This data shows that TRPM5 suppression can activate autophagic mechanisms. In cancer it has also been determined that autophagy may show two different function in the way leading to both the survival and the death of the cell. Determining that autophagy is associated with TRPM5, by targeting TRPM5 autophagy can be inhibited or excessively increased so it may contribute to the development of cancer treatments leading to autophagic death of the cell.

Key Words: Lung cancer, Authophagy, TRPM5 ion channel, Cell Culture, qRT-PCR.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
BAŞLIK SAYFASI	i
DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kuramsal Bilgiler Ve Literatür Taraması	4
1.1.1. Akciğer Kanseri	4
1.1.2. İnvazyon ve Metastaz	6
1.1.3. Apoptozis	7
1.1.4. Otofaji	9
1.1.4.1. Otofaji ve Kanser	11
1.1.5. TRPM 5	12
1.1.5.1. TRPM5'İN Model Tanımı ve Biyolojik Fonksiyonu	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	13
2.1. Hücre Kültürü	13
2.1.1. Gereçler	13
2.1.2. Hücre Hattı Seçimi ve Temini	14
2.1.3. Hücrelerin Beslenmesi	14
2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması	14
2.1.5. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi	14
2.1.6. siRNA Uygulaması	15
2.1.7. Total RNA izolasyonu	15
2.1.7.1. Gereçler	15
2.1.7.2. Yöntem	16

2.1.8. Spektrofotometrik RNA Ölçümü	16
2.1.8.1. Gereçler	16
2.1.8.2. Yöntem	17
2.1.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	17
2.1.9.1. Gereçler	17
2.1.9.2. Yöntem	17
2.1.10. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real Time)-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Çoğaltımı	18
2.1.11. İstatistiksel Analizler	19
3. BULGULAR	20
4. TARTIŞMA	22
5. KAYNAKLAR	25
6. ÖZGEÇMİŞ	30

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde genetik mutasyonlar	4
Tablo 2. Akciğer kanserlerinin DSÖ'nün sınıflandırılması	5
Tablo 3. cDNA Karışım Miktarı	17
Tablo 4. cDNA Sentezi için Uygulanan PZR Programı	18
Tablo 5. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler	19
Tablo 6. Uygulanan RT-PZR Programı	19



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Bağırsak adenomunun kanser hücresine dönüşüm süreci	2
Şekil 2. Fas reseptör aracılığı ile apoptozisin uyarılması	8
Şekil 3. Apoptozun mitokondriden sitokrom c salınımı ile aktive edilmesi	9
Şekil 4. Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi bulguları	20
Şekil 5. TRPM5 siRNA tranfeksiyonu sonrası kontrol	20



KISALTMALAR LİSTESİ

APC	: Adenomatöz Poliposis Koli
APAF 1	: Apoptotik Aktivatör Faktör 1
AMBRA1	: Activating Molecule In Becn1-Regulated Autophagy Protein
ATG	: Autophagy-Related Genes (Otofaji İle İlişkili Genler)
BAX	: BCL-2 Associated X Protein (BCL-2 İlişkili X Proteini)
BCL-2	: B-Cell Cll/Lymphoma 2
C-MET	: Hepotosit Büyüme Faktör Reseptörü
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FOXO	: Forkhead Transkripsiyon Faktörü
GPCR	: G Protein İlişkili Reseptör
GSK 3	: Glikojen Sentetaz Kinaz 3
HMD 2	: İnsan Double Minute 2 Proteini
LAMP1	: Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
LAMP2	: Lysosomal-Associated Membrane Protein 2
LAMP3	: Lysosomal-Associated Membrane Protein 3
NSCLC	: Küçük Hücreli olmayan Akciğer Kanseri
RT-PZR	: Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TNFR	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TRPM	: Transient Receptor Potential Melastanin
TP53	: Tumor Protein P53
ULK1	: Unc-51-like kinase 1
ULK2	: Unc-51-like kinase 2
UVRAG	: UV Radiation Resistance Associated Gene

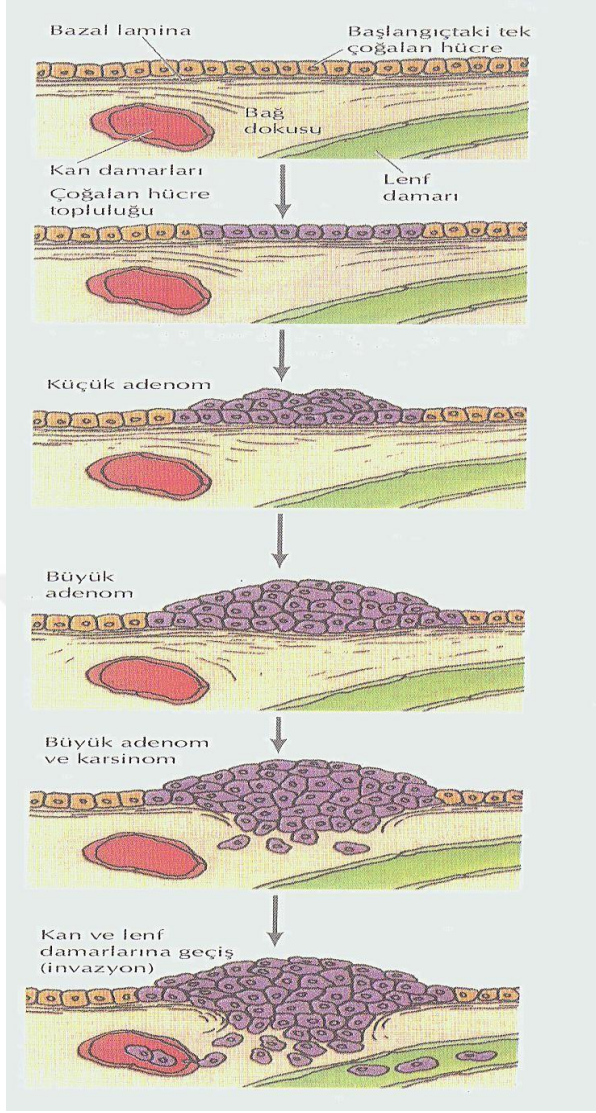
1. GİRİŞ

Günümüzde bilim ve teknolojik gelişmelerin hızla ilerlemesine rağmen hala büyük ölüm oranına sahip olan kanser hastalığı tam olarak aydınlatılamamaktadır. Dünya genelinde birçok araştırmacı kanser alanında geniş bütçelerle çalışmasına rağmen halen cevap bekleyen birçok soru bulunmaktadır.

Kanserleşen hücrelerin, normal vücut hücrelerine göre birçok değişim geçirdiğini kanser üzerine yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlardan anlayabilmekteyiz. Her kanser tipinde bu değişimler aynı olmadığı gibi aynı kanser tipinin farklı dönemlerinde de farklılık arz etmektedir. Ayrıca kişiden kişiye de aynı kanser tipi farklılık göstermektedir. Hastalığın tedavisini de bu durum güçleştirmektedir.

Karsinogenez, normal hücrenin, kanser hücresine dönüşüm için geçen süreçtir. Hücrenin genetik materyalinde meydana gelen mutasyonların birikimi ile bu değişim oluşur. Hücrenin sürekli olarak bölünmeye başlaması, hücre döngüsünü kontrol eden genlerde oluşan mutasyonlara bağlıdır. Kanser gelişimi, bölünme kontrolünün kaybına bağlı olarak hücrenin aşırı çoğalmasıyla olur (1).

Çok basamaklı bir süreç olan karsinogenezde, bir hücrede oluşan genetik mutasyon düzeltilmeden hücre çoğalmaya başlar ve apoptozise uğramaz ise oluşan transforme hücre bölünerek çoğalmaya başlar. Bu mutasyonlar ile invaziv yeteneği olan ve uzak yayılım yapabilen hücreler oluşup monoklonal kitle oluşturmaz. Örneğin bağırsak duvarına yapışık olarak iyi huylu tümör olarak çoğalan polipler, Adenomatöz poliposis coli (APC) tümör baskılayıcı genin ifadesinin kaybı oluşur. K-ras geninin aktivasyonu ile kontrolsüz bölünmeye başlayan bu polip daha sonra geniş bir polip oluşturur ve sınıf II adenom adını alır. Kolorektal kanserlerde mutasyonlu (DCC) tümör baskılayıcı genin ifade kaybı ile sınıf II adenom, sınıf III adenom olarak adlandırılır. Prekanseroz olarak adlandırılan, üç mutasyon geçiren bu adenom, tümör protein 53 (p53) tümör süpresör gen kaybı ile invaziv yetenek kazanır ve karsinoma adını alır. Bazal laminayı geçerek (2) metastatik etki ile yayılım gerçekleştirir (Şekil 1)



Şekil 1. Bağırsak adenomunun kanser hücresine dönüşüm süreci (3)

Köken aldığı hücre tipine göre kanseri üç ana grupta toplayabiliriz. İnsan kanserlerinin çok büyük kısmını oluşturan epitel hücre kaynaklı karsinomlar, kan veya immün sistem hücrelerinden kaynaklanan lösemi veya lenfomalar ve kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku kaynaklı sarkomlardır. Ayrıca köken aldığı hücrenin dışında olduğu hücreye göre de kanser değişiklik göstermektedir. Aynı coğrafyaya, yaşam koşullarına insan ırklarına ve beslenme alışkanlıklarına göre de aynı kanser türü değişiklikler göstermektedir.

Kanser ölüm sebebi olarak bugün ikinci sırada yer almaktadır (4, 5) Akciğer kanseri %30 oranla kanser nedeni ölümlerin başında gelmektedir (6). Akciğer kanserleri kanser vakalarının görülme sıklığında, prostat ve meme kanserlerinden

sonra üçüncü sırada yer almaktadır (6). Beş yıllık sağ kalım oranı ise akciğer kanserinde % 15 olarak bilinmektedir (7, 8).

Belli bir yaşam sürecinden sonra normal bir hücre programlı bir şekilde kendini yok etmektedir. Apoptozis ya da programlı hücre ölümü olarak bilinen bu süreç ile yaşlanmış hücreler ortadan kalkarken genç ve yeni hücreler ile organizma devamını sağlar. Apoptozis, enerji gerektiren belli proteinlerin aktifleşmesi ile başlayan hücrenin kendi kendini yok ettiği bir süreçtir. DNA'nın 50-200 baz çifti ve katları şeklinde kesilmesi bu durumun en belirgin özelliğidir. Bu işlem aktif kaspaz ile sağlanmaktadır (9).

Multifaktöriyel bir hastalık olan karsinogenez, sadece bir genden sorumlu bir mekanizma değil birçok genin etkisi ile oluşur. Hücre içinde başka yolların aktiflenmesine neden olan bu süreç bir genin mutasyonu sonucu, aşırı ifadesi ile oluşur ya da tümör baskılayıcı genler olarak bilinen genlerin, delesyonu, promotor metilasyonu veya mutasyonu ile bu genlerin ifadelerinin ortadan kaybolması nedeniyle karsinogenezi artırıcı etkiye sahip moleküllerin artışına neden olmaktadır. Hücre proliferasyonu indüklenir ve kontrolsüz büyüyen hücrenin yeni mutasyonlar geçirmesiyle tamamen farklı bir hücre oluşur (10).

Transient Receptor Potential Melastanin 5, ilk olarak Beckwith-Wiedemann sendromu (BWS) olarak bilinen tümör üreten durumla ilişkili genleri araştırırken tanımlanmıştır. İlk çalışmalar TRMP5'i BWS ile ilişkilendirmekte başarısız olmasına rağmen genin temel yapısı tanımlanabilmiştir (11, 12). İnsandaki TRMP5 geni, kromozom 11 üzerinde 24 ekson içerir ve 1,165 amino asitlik bir proteini öngören 3,495 bp'lik bir açık okuma çerçevesi içerir (12). Ortolog fare geni, kromozom 7'nin sentetik distal ucunda bulunur ve 1,158 amino asitlik bir proteinin öngörüldüğü açık okuma çerçevesi içerir. TRMP5, TRMP4'e en yüksek benzerliği (amino asit seviyesinde %40 özdeşlik) göstermekte olup, soğuk ve metol reseptörü TRMP8 benzeri diğer TRMP kanallarıyla daha uzak olarak ilişkilidir (13, 14). Diğer transient reseptör potansiyeli (TRP) kanalları gibi, TRMP5'in altı transmembran alan içerdiği ve bir tetramer olarak birleştiği düşünülmektedir (15, 16).

Bu çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre dizisi LC 3 TRMP 5 geninin durdurulmasının otofaji genleri üzerindeki olası etkilerinin mekanizmaları ile araştırılması planlanmıştır.

1.1. Kuramsal Bilgiler Ve Literatür Taraması

1.1.1. Akciğer Kanseri

Kanser nedenli ölüm sebepleri arasında akciğer kanserleri ilk sırada yer almaktadır. Oluştığı organ sıklığına göre akciğer kanseri prostat ve meme kanserlerinden sonra gelmektedir. Küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) akciğer kanserlerin % 80'ini oluşturmaktadır (17). NSCLC yaklaşık %45'i adeno ve skuamoz tipi iken, %65'i heterojenite gösterir (18). Evre 1 ve 2 olan hastalar opere edilirken, evre 3 hastalarının bir kısmına operasyon, bir kısmına ise radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır (19). Buna rağmen 3 yıllık yaşam beklentisi evre 2 hastalarda %35-50, evre 3 hastalarda % 28 (20), NSCLC hastalarında 5 yıllık sağ kalım ise %15 dir (21). Cerrahi girişim, kemoterapi ve radyoterapi uygulanması ile erken evre hastalarında sağ kalım oranı artmaktadır. Ancak ileri evre hastalarının büyük bir kısmına cerrahi uygulanamamaktadır. Sağ kalım oranını da bu durum etkilemektedir. Ayrıca sağ kalım oranı ileri evre hastaların kemoterapiye ve radyoterapiye olan dirençleri nedeniyle azalmaktadır (17). NSCLC moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde genetik mutasyonlar (22)

Resesif Onkogen		Baskın Onkogenler	
Rb mutasyonu	%20	ras mutasyonu	%30
P53 mutasyonu	>%50	Her 2/neu aşırı ifadesi	%50
3p delesyonu	>%50	myc aşırı ifadesi	%50
Mikrosatellit değişimi	var	bcl-2 aşırı ifadesi	%50
		telomeraz ifadesi	%90

Akciğer kanserlerini akciğer parankimi veya solunum yollarından kaynaklanan tümörler oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) önerisine göre akciğer kanserlerinin histopatolojik sınıflandırılması yapılmaktadır. Akciğer kanserleri buna göre temel olarak küçük hücreli akciğer kanserleri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri (NSCLC) olmak üzere iki gruba ayrılır. Tüm akciğer kanserlerinin %95'ini bu iki grup teşkil eder. Akciğerlerden kaynaklanan diğer tümörler geri kalan %5'lik oranı oluşturur (23), (Tablo 2).

Tablo 2. Akciğer kanserlerinin DSÖ'nün sınıflandırılması (22)

Akciğer Kanseri	İnsidans
Küçük hücreli akciğer kanserleri	%20
Küçük hücreli olmayan akciğer kanserler	%75
● Adeno kanser	%35
● Skuamöz hücreli kanserler	%30
● Büyük hücreli kanser	%10
Diğerleri	%5
● Karsinoid tümörler	
● Pulmoner lenfoma	
● Mukoepidermoid karsinoma	
● Adenoid kistik karsinoma	
● Sarkomlar	

Akciğer kanserleri uluslararası kabul görmüş tümör, nodül ve metastaz (TNF) sistemine göre sınıflandırılmaktadır. Buna göre;

Evre1A; Tümör çapı <3 cm, akciğer veya viseral plevra ile çevrili, lob bronş proksimaline invazyon yapmamış tümörler.

Evre1B; Tümör çapı >3 cm ana bronş invazyonu olup ancak karinaya invaze olmayan tümörler

Evre IIA; Tümör çapı <3 cm, akciğer veya viseral plevra ile çevrili ve hiler veya intrapulmoner lenf nodu metastazı yapmış tümörler

Evre IIB; Tümör çapı >3cm ana bronş invazyonu olan ve hiler veya intrapulmoner lenf nodu metastazı yapmış tümörler

Evre IIIA; Herhangi büyüklükte olup, mediasten invazyonu olan ve hiler veya intrapulmoner lenf nodu metastazı yapmış tümörler

Evre IIIB; Herhangi büyüklükte olup, mediastene direk invazyonu olan ve aynı taraf medastinal, hiler veya karşı taraf supraklaviküler lenf bezi metastazı

Evre IV; Herhangi büyüklükte tümör ve uzak metastaz Kanserin evre ve tipine göre akciğer kanserinde tedavi değişir. Evre I, II hastalarda buna göre cerrahi uygun iken bazı evre IIIA hastalara da cerrahi girişim uygulanmaktadır. Yayılımın yaygın olması nedeniyle diğer evre IIIB ve IV hastalara cerrahi girişimde bulunulamamaktadır. Radyoterapi ve kemoterapi bütün hastalara uygulanabilmektedir (22).

1.1.2. İnvazyon ve Metastaz

KontROLSÜZ büyüyen kanser hücreleri buldukları dokuda diğer dokuları itmeye başlarlar. Mutasyonlar da bu süreçte devam etmektedir. İnvazyonun gerçekleşmesi çok önceleri geleneksel görüş olarak baskıya maruz kalan dokunun daha sonra tümörün büyümesine bağlanmıştır. Bu görüş ancak bugün geçerli değildir. KontROLSÜZ bölünen kanser hücreleri invazyon ve metastazı 4 basamakta gerçekleştirmektedir (24).

Yapılan araştırmada kanser hücrelerinde kadherin ailesinden N kadherinin ifadesinin arttığı ve E kadherinin ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (25). Bazal laminaya $\alpha 5\beta 3$ integrin proteini ile fibronektin aracılığıyla tutunan kanser hücrelerinin E kadherin ifadesinden yoksun olduğu gösterilmiştir (26). Hücre hareketliliği kazanmış olan kanser hücrelerinin bu tutunma hareketi sabit olmayıp amoboid hareket yapmaktadır. Sitoplazmanın miyozin kasılmaları ile kasılıp gevşeyerek hücre hareketini gerçekleştirmesi aktin proteininin yeniden organize olarak yalancı ayak oluşumu, fillipoda oluşumu ve lamellipoda oluşumları ile sağlanır (24).

Kanser hücresi bu hareketlilikten sonra ekstraselüler matrikse ulaşır. Matriks metalloproteaz ve plazmin gibi proteazların yardımıyla buradaki bariyeri aşar (25). Matriks metalloproteaz inhibitörünün kanser hücrelerinde ifade edilmediği dolayısıyla matriks metalloproteazların aşırı ifadesinin olduğunu gösteren yayınlar vardır (25). Ayrıca hücrede plazmin artışının olması ürokinaz reseptörüne bağlanmıştır (25). Ekstraselüler matriksin parçalanmasına neden olan bu iki proteaz kanser hücrelerinin ekstraselüler matrikste ilerlemesine sebep olmaktadır.

Ekstraselüler matriksteyken damar endoteline ulaşan kanser hücresi tümör ilişkili makrofaj (tumor associated macrophage) ile arasında parakrin bir ilişki oluşur. Tümör ilişkili makrofaj C-met (hepatosit büyüme faktör reseptörü) ile epidermal büyüme faktörü salgılar bunu epidermal büyüme faktör reseptörü ile alan tümör hücresi hepatosit büyüme faktörü salgılar (24). Bu da invazyon indükleyicisi olan kemokinin 12 ya da SDF-1 olarak bilinen proteininin ifade edilmesine neden olur (24). Hücre endotelden damar içine bu parakrin ilişki oluşumu ile ekstraselüler olur.

Damar içine ekstraselüler yapan tümör hücresi, üst ana toplar damar veya lenf damarlarında ise akciğere, alt ana toplar damar da ise karaciğere metastaz yapar.

Trombositler ile kendine bir örtü yapan tümör hücresi damar içinde savunma hücresinden kaçır. Böylelikle tümör embolisi oluşumu esnasında dar yataklı organlardan geçerken kılcal damarlara takılır tutunduğu organa yayılımı buradan tekrar invazyon yaparak olur (24).

Tüm bu süreç tümör hücresinin uğradığı mutasyonlara bağlı olduğu kadar bulunduğu ortamda varolan mikro çevre ile de ilişkilidir (25).

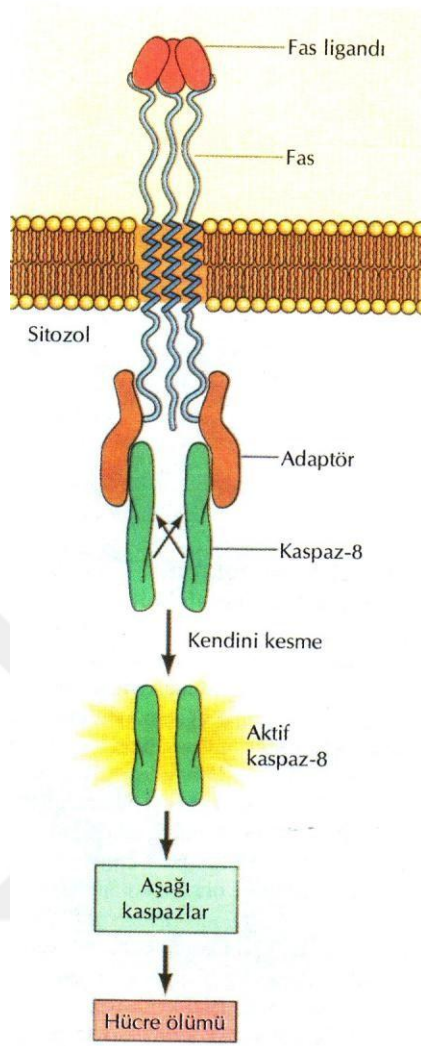
1.1.3. Apoptozis

Latince kelime anlamı olarak apopitoz sonbaharda yere düşen yaprak olarak tanımlanır. Apopitoz programlı hücre ölümü olarak ta tanımlanır ve bu süreçte hücre zarı cepçikler yapar, DNA kromatinler degravasyona uğrar ve kondanse olur, hücre küçük cisimciklere ayrılır ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek yok edilir.

B-Cell Cll/Lymphoma -2 ailesi ve kaspazlar olmak üzere apoptotik süreçte iki protein ailesi rol alır. Bcl-2 ailesi, apoptotik süreci indükleyen ve baskılayan zıt etkili iki gruptan oluşur. Apoptotik baskılayıcı grup bcl-2 ve bcl-XL indükleyici grup ise bax, bcl-Xs, Bad, Bak ve Bid üyelerinden oluşur. Bu iki grup arasında normal bir hücrede bir denge mevcuttur. Eğer baskılayıcılarda artış olursa hücre yaşamaya devam ederken indükleyiciler de artış olursa hücre apoptoza gider.

Kaspazlar ise apoptozda yer alan proteazlardır. Kaspazlar, zimojen olarak sitoplazmada bulunan aktif merkezde sisteinlerin yer aldığı proteazlardır. Kaspazlar, efektör kaspazlar 3, 6, 7 ve başlatıcı kaspazlar 2, 8, 9, 10 olmak üzere iki gruba ayrılır (9).

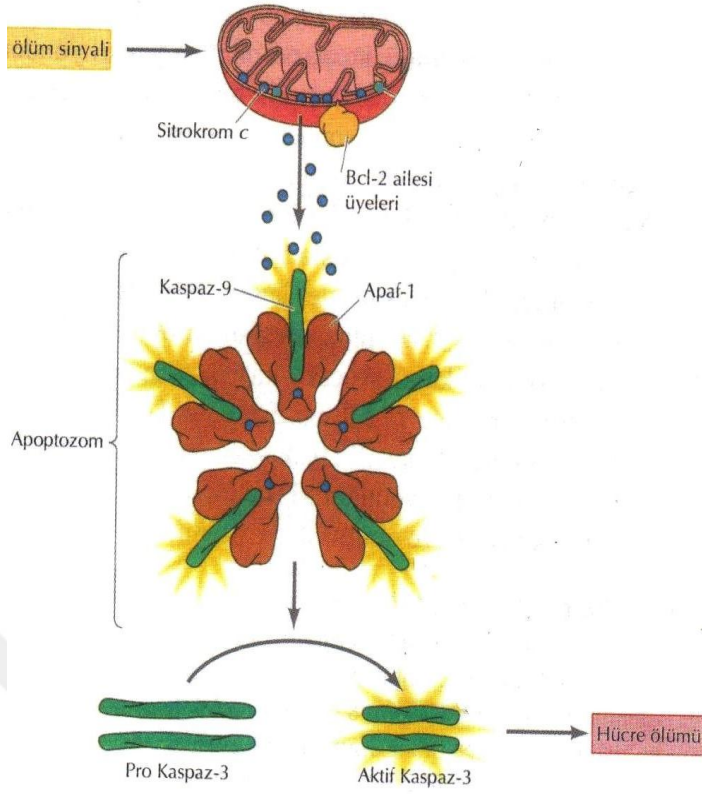
Hücrede apoptozis, iç yolaklar (intrinsik) ve dış (ekstrinsik) yolaklar olarak bilinen iki yolla indüklenir. Apoptozun aktivasyonunda dış yolaklar aracılığıyla örneğin, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesinden olan Fas reseptör ligandına (FasL), Fa bağlandıktan sonra reseptör membranda dimerize olur ve aktifleşir. Böylece prokaspaz 8, reseptörün stoplazmik kısmında yer alan bölgelerine bağlanır. Kaspaz 8 prokaspaz 8'in kendi kendini kesmesi ile aktifleşir, prokaspaz 3'ü keserek aktifleştirir ve böylece kaspaz kaskadı oluşur (Şekil 2.) hücreyi apoptozise götürür (27).



Şekil 2. Fas reseptör aracılığı ile apoptozisin uyarılması (3)

İç yolakta ise p53'ün aktivitesi ile mitokondriden sitokrom c çıkışı sonucu apoptotik aktivatör faktör 1 peptidaz (Apaf-1) aktif hale gelir veya Bcl-2 ailesi proteinlerinin proapoptotik üyeleri artar. Prokaspaz-9 aktif Apaf-1 ile aktif kaspaz 9 haline gelir. Prokaspaz 3 aktif kaspaz 9 ile aktifleşerek kaspaz kaskatının oluşmasına (Şekil 2) dolayısıyla apoptozise sebep olur (27).

B-Cell Cll/Lymphoma-2 ailesi üyelerinin ifadelerinin artışı ya da azalışı apoptozis sürecinde önemlidir. Birçok kanser türünde fosforlanmış bad miktarında artış olmaktadır. Bad proapoptotik molekülü fosforlandığında diğer bad molekülerine bağlanarak mitokondri zarında bad/bcl-2 heterodimer yapısına katılamamakta ve hücre apoptozise uğrayamamaktadır (28).



Şekil 3. Apoptozun mitokondriden sitokrom c salınımı ile aktive edilmesi (3)

1.1.4. Otofaji

Otofaji, normal büyüme ve stres koşulları altında hücrel homeostazın sürdürülmesi ve hücre canlılığının korunmasında kritik işlevlere sahip olan son derece korunmuş bir süreçtir. Hücrel, organelerin sitoplazma ve otofagozomlar olarak adlandırılan çift kat membranlı veziküllerde tutulmasını, kendi kendini yeme işlevi ardından lizozomlarda kargonun parçalanmasını içerir. Böylece yeni biyomoleküllerin sentezi için gerek duyula yapı taşlarının ve enerjinin geri dönüşümü sağlanmış olur (29).

Otofajinin; mikrotofaji, makrotofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere 3 farklı tipi vardır. Bunların tamamı sitozolik içeriklerin lizozomda proteolitik olarak parçalanmasını teşvik eder. Makrotofajide sitoplazmik kargo, otolizozomu oluşturmak için lizozom ile birleşen otofagozom olarak adlandırılan çift kat membran ile çevrili bir vezikül aracılığıyla lizozoma aktarılır. Bunun aksine mikrotofajide sitozolik içerikler lizozom membranının invaginasyonu aracılığıyla lizozomun kendisi tarafından doğrudan alınır. Şaperon aracılı otofajide ise şaperon

proteinleri (Hsc-70 gibi), hedef proteinler ile kompleks bir şekilde lizozomal membrandan ayrılarak parçalanır. Makro ve mikrotofajide büyük yapılar seçici ve seçici olmayan mekanizmalar aracılığıyla kuşatılabilir (30).

Otofaji, yığın haldeki sitoplazmik materyallerin lizozomal olarak işlenmesine yol açarak seçici olmayan bir tarzda ya da ribozom (ribofaji), mitokondri (mitofaji) veya lipidler (lipofaji) gibi organeller ve spesifik proteinlerin hedeflenerek parçalanmasını içerecek şekilde seçici tarzda olabilir. Son yıllarda seçici otofajiyi düzenleyen mekanizmalar araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Bazal otofajideki defektler protein agregatları ve hasarlı organellerin toksik birikimi ile sonuçlanırken, stres aracılığıyla uyarılan otofajideki defektler esas olarak hücre canlılığını sınırlandırır. Her iki durumda da, olası genom bütünlük ve kararlılığındaki bozulması sonucu; kanser, karaciğer bozuklukları, nörodejenerasyon ve yaşlanma gibi problemlerin ortaya çıkmasında etiyolojik olarak otofajideki defektleri ile hücre yaşama tehlikeye atılır (31).

Genellikle stres koşullarına (genotoksik, besinsel, hipoksi vb.) hücreler için bir sağ kalım mekanizması olarak görülen otofaji kontrolsüz olduğunda aşırı otofajinin tip 2 programlı hücre ölümüne sebep olduğu varsayılmaktadır (32).

Artmış otofajik belirteçlere ve otofaji kökenli morfolojik özelliklere sahip ölen hücre örneği üzerinde yapılan incelemeler otofajik hücre ölümüne yol açmıştır. Otofajinin artmış metabolik işlevler ve besin yetersizliğinin sebep olduğu hücre stresinin ardından aktive olan bir yolağın olduğu düşünüldüğünde stresin ardından ölüme maruz kalan hücrelerin de otofaji özelliklerini göstermesi şaşırtıcı değildir. Shen ve Codongo (33) hücre ölümünün otofaji tarafından gerçekleştiğinin belirlenebilmesi için şu üç kriterin yerine getirilmesinin gerektiğini öne sürmüşlerdir;

- 1) Hücre ölümü apoptozdan bağımsız olarak oluşmalıdır.
- 2) Sadece otofaji belirteçlerinde bir artış değil otofajik akışta da artış olmalıdır.
- 3) Kimyasal inhibitörler ya da genetik araçlar kullanılarak otofajinin baskılanması hücre ölümünü önlemelidir (33, 34).

1.1.4.1. Otofaji ve Kanser

Bir hücrenin hayatta kalma mekanizması olarak kabul edilen otofaji bazal koşullar altında, protein kümelerini ve hasar görmüş organelleri elemine ederek hücrel homeostazın korunmasına yardımcı olur. Buna karşın stres koşulları altında otofaji, enerji üreterek, makromoleküllerden besin sağlayarak, tehlike potansiyeline sahip elementleri ortadan kaldırarak hücrenin hayatta kalmasını destekleyici sitoprotektif bir yanıt sağlar (35).

Otofajinin işleyişindeki bozukluklar fizyolojik işlevi etkilemekte ve bu durum kanser, nörodejeneratif bozukluklar gibi birçok sayıda hastalıkta vurgulanmaktadır (36, 37). Kanser çalışmalarında elde edilen son bulgu özellikle tümör başlangıcının erken safhalarında otofajinin bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini ortaya koymaktadır (38). Aslında birçok otofaji ilişkili protein (Beclin1, ATG4c, ATG5, ATG7) tümör baskılayıcı olarak gösterilmiştir. Bunların yanı sıra bazı yardımcı proteinlerin de (UVRAG, Bif1) bu özellikte olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, birkaç onkösüpresör proteinin (PTEN, DAPK, TSC1/2, p53, LKB1) otofajiyi tetiklediği belirtilmiştir. Bunun yanında pek çok onkoproteinin ise (Bcl- 2, class 1 PI3K, AKT)otofajiyi negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (39). Bunun aksine yerleşik tümörlerde, temel olarak hayatta kalma mekanizması olan otofaji; besin yetersizliği ve hipoksi ile karakterize edilen sert koşullar altında kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekler (40). Aslında artan veriler, otofajinin genetik ya da kimyasal bir araçla inhibe edilmesinin, apoptotik hücre ölümünü hızlandırdığı ve birçok kanserde tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermektedir (41). Ayrıca artmış otofaji, kanser hücrelerinde radyasyon ve kemoterapiye yanıtta çoğu kez tespit edilmektedir (42). Dahası, otofaji, bazı kanserlerin tedaviye olan direncine katkıda bulunuyormuş gibi görülür çünkü otofajinin inhibisyonu ile kemoterapi tedavilerine karşı tümör hücrelerinin hassaslaştığı gösterilmiştir (43). Bu yüzden, kemoterapiye ek olarak otofajinin inhibe edilmesi bazı kanserlerin tedavisinde umut vaat eden bir stratejidir (44).

1.1.5 TRPM 5

1.1.5.1. TRPM5'İN Model Tanımı ve Biyolojik Fonksiyonu

Transient Receptor Potential Melastanin-5'in fizyolojik önemini anlama konusundaki esas ilerleme büyük bir ölçüde tat alıcı hücreler ile sınırlı olmasının keşfi ile geldi (45, 46). 5 çeşit tad biçiminin 3 ü olan acı tatlı ve acımtırak tadlarının ayrı ayrı sınıflandırılmasına G proteine bağlı reseptörler aracılık ederler (47, 48). Bu G protein reseptörler, gustducin ve fosfolipaz C (PLC) $\beta 2$ yi aktive ettirir, Böylece doğası iyi anlaşılmayan bir elektriksel tepkiye yol açan bir hücre içi sinyalleme zincirini başlatır (49). Biyokimyasal değişikliklerin bir elektrik sinyaline dönüştürüldüğü TRPM5 iyon kanalı, bu zincirin nihai hedefi olabilir. TRPM5'in her üç tad alma yöntemi için reseptörlerle ve gustducin ve PLC $\beta 2$ ile birlikte ifade edildiği gözlemlerle desteklenmektedir (45, 46). Ayrıca, Zuker ve Ryba laboratuvarlarındaki fareler üzerindeki etkili deneylerde, PLC $\beta 2$ ve TRPM5'in, normal acı, tatlı ve acımtırak tatları için gerekli olduğunu gösterdi (46). Hem davranışsal çalışmalar hem de sinir kayıtları, her iki genden yoksun olan farelerin bu üç tada belirgin şekilde daha az duyarlı olduklarını, ancak ekşi ve tuzlu saptama yeteneklerini koruduğunu göstermektedir. TRPM5'in, ayrıca, sindirim sonrası ince bağırsakta ve midedeki kemosenstasyonda rol oynayabileceği ifade edilmiştir (45).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

2.1.1. Gereçler

- Biyogüvenlik Kabini (NÜVE)
- Derin Dondurucu (-86) (NUAIRE)
- İverted Faz kontrast (Floresans Ataçmanlı) Işık mikroskobu (NIKON)
- Karbondioksitli İnkübatör (NÜVE)
- Hücre Sayım Cihazı (BIO-RAD)
- Vorteks (LAB NET)
- Santrifüj Cihazı
- Sıvı Azot Tankı (İnternational Cryogenics. Inc.)
- Mikropipet (Eppendorf)
- 25/75 cm² Flask (NEST)
- 6/12/24/96 Kuyucuklu Plate (COSTAR)
- Falkon Tüp (CORNING)
- Thoma Lamı (ISOLAB)
- Hücre Sayım Slide (BİO-RAD)
- 10/20/200/1000 µl Mikropipet Ucu (AXYGEN)
- Pastör Pipet
- 500/1000/1500 µl Ependorf Tüp
- 2 ml Kriyo Tüp
- RPMI 1640 (LONZA (Kat. No:BE12-918F))
- OPTI-MEM (GİBCO (Kat. No: 31985-062))
- DMEM (PAN BİOTECH (Kat. No: P04-03588))
- H₂O₂ (SIGMA (Kat. No: SZBE0090V))
- Fötal Sığır Serumı (SİGMA (Kat. No: 080M3397))
- L-Glutamin (SİGMA Kat. No: RNBB7408))
- PBS (Fisher Bioreagents (Kat. No: 135974))
- %0,25 Tripsin-EDTA Solüsyonu (SIGMA (Kat. No: 11G804))
- Antibiyotik (Biological Industries (Kat. No: 030321B))

- . DMSO
- . Steril Su
- . TRPM2 siRNA (Qiagen)
- . Hiperfect Transfektan (Qiagen)
- . Etil alkol
- . 3-MA (SİGMA (Kat. No: M9281))
- . z-VAD-fmk (ABCAM Biochemicals (Kat. No: AB120382))

2.1.2. Hücre Hattı Seçimi ve Temini

İnsan akciğer kanseri çalışmalarında genellikle A549 hücre hatları kullanılmaktadır. Bu hücre hattı ticari olarak satın alınmıştır (ATCC; CCL-185).

2.1.3. Hücrelerin Beslenmesi

A549 hücreleri, %10 FBS, %1 antibiyotik ve %1 L-glutamin ilave edilen RPMI 1640 besiyeri içeren 25 ve 75 cm²'lik flasklerde CO₂'li etüvde 37 °C'de çoğaltıldı. Her gün canlılık, çoğalma ve enfeksiyon bakımından inverted mikroskop kullanılarak değerlendirilen flasklardaki besiyeri her 2-3 günde bir değiştirildi.

2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

Inverted mikroskop altında değerlendirilen flasklardaki yüzeye tutunmuş olan hücre yoğunluğunun %90-100 olduğu tespit edildiğinde flask içindeki besiyeri döküldü ve flask yüzeyine tutunmuş olan hücreler serbest hale gelmeleri için 4 ml tripsin-EDTA ile muamele edildi. 5 dk 37°C'de inkübe edildikten sonra inverted mikroskop altında hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Flask içinde serbest hale geldikleri tespit edilen hücrelere 4 ml besiyeri ilave edilerek tripsin-EDTA'nın olumsuz etkisi nötralize edildi. Falkon tüplere aktarılan bu karışım 2300 g'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım dökülerek yerine taze besiyeri eklendi. Flask içerisine aktarılmadan önce homojen bir süspansiyon oluşması için vorkteks yapıldı ve hücreler iki farklı flaska aktarıldı.

2.1.5. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücrelerin dondurulması için flask içindeki besiyeri dökülerek hücreler 4 ml tripsin-EDTA ile muamele edildi. 5 dk 37°C'de inkübe edildikten sonra flask içinde

serbest hale geldikleri tespit edilen hücrelere 4 ml besiyeri ilave edildi. Falkon tüplere aktarılan bu karışım 2300 g'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra elde edilen hücre pelleti üzerine %70 oranında DMEM, %20 oranında FBS ve %10 oranında DMSO içeren solüsyon ilave edildi. Kriyo tüplere bu karışımdan 1'er ml aktararak aşamalı olarak (oda sıcaklığı/+4°C/-20°C/-80°C) soğutulup, -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Donmuş olarak saklanan hücrelerin çözdürülmesi işlemi sırasında hücrelerin hemolizini önlemek amacıyla çözdürme işlemi dondurma işleminin aksi yönde aşamalı olarak gerçekleştirildi. -80°C derin dondurucudaki hücreler çıkarılarak -20, +4 ve oda sıcaklığı ve ardından 37°C'ye ısıtılmış besiyeri ilave edilerek flasklara ekildi.

2.1.6. siRNA Uygulaması

Transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmeden önceki gün 6'lık plate'lere her bir kuyucukta 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekim yapılarak CO₂'li etüvde 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Besin ortamı değiştirilerek kuyucuk başına 2.3 ml DMEM eklendi. 10 µM'lık siRNA'dan 9 µl alınarak 100 µl OptiMEM içerisinde seyreltildi. Seyreltilmiş siRNA üzerine 12 µl HiPerFect eklendi ve 3 kez 1'er saniye vortekslenerek karıştırıldı. Lipozomların oluşumu için oda sıcaklığında 5-10 dk inkübe edildikten sonra bu karışım pipetaj yapılmadan hücreler üzerine damla damla olacak şekilde eklendi ve plate hafifçe karıştırıldı. CO₂'li etüvde 37 °C'de inkübe edildi ve transfeksiyon işleminden 24 saat sonra besiyeri değiştirildi. siRNA transfeksiyon işlemi toplamda 48 saat sürdürüldü.

2.1.7. Total RNA izolasyonu

2.1.7.1. Gereçler

- TRI-Reagent (MRC gene)
- PBS (Invitrogen)
- Etil Alkol (Pharmco)
- İzopropil alkol (Fisher Scientific)
- Kloroform (Fisher Scientific)
- Nükleaz İçermeyen Steril Su (Gibco)

- RNase ZAP™ (Ambion)
- 15 mL Falcon Tüp (Corning)
- 1,5 mL Ependorf Tüp
- 10CC şırınga (Genject)
- 18G şırınga iğnesi (Genject)
- Santrifüj Cihazı
- Vorteks
- Mikropipet
- Mikropipet Ucu

2.1.7.2. Yöntem

Flasklardan alınan A549 hücreleri 15 ml'lik falcon tüplerine aktarıldı ve 5 ml PBS ilave edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. 2300g'de 3 dakika santrifüj işlemi ardından pellet oluşturan hücrelerin üstünde kalan sıvı kısım dikkatli bir şekilde dökülerek PBS ile yıkama işlemi bir kez daha tekrar edildi. Elde edilen hücre pelleti 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra 1 ml Trizol ilave edilerek 18 gauge enjektör ile pellet parçalandı ve 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. 200 µl kloroform (Trizol hacminin 1/5'i kadar) ilave edilerek 30 saniye vorteks yapıldı ve 2-3 dk. oda sıcaklığında bekletildi. +4 °C'de 10000 g'de 20 dk. santrifüj edildikten sonra en üstteki sıvı kısım yeni ependorf tüplere aktarıldı. Eldeki sıvı kısım ile eşit hacimde izopropanol eklenerek vorteks yapıldı ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi. RNA pelleti için +4 °C'de 10000 g'de 20 dk. santrifüj edildi ve üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml. %75'lik etanol ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. +4 °C'de 10000 g'de 5 dk. santrifüj işleminin ardından bu yıkama işlemi tekrarlandı ve etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 30 µl Nükleaz-free su eklenerek kullanılabilecek kadar -80°C'de saklandı.

2.1.8. Spektrofotometrik RNA Ölçümü

2.1.8.1. Gereçler

- BioSpec-nano (Shimadzu) cihazı
- Mikropipet
- Mikropipet Ucu

- Nükleaz İçermeyen Steril Su

2.1.8.2. Yöntem

İşleme geçmeden önce DNAaz-RNAaz içermeyen steril su ile kör ölçüm yapıldı. BioSpec-nano (Shimadzu) cihazının ölçüm alanına 1 µl RNA konularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Bu işlem her bir örnek için tekrarlandı.

2.1.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

2.1.9.1. Gereçler

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystems) (10xRT Buffer, 25xdNTP mix, 10xRT Random Primers ve Multiscribe™ Reverse Transcriptase)
- PCR Cihazı
- 500/1500 µl Ependorf Tüp
- Nükleaz İçermeyen Steril Su

2.1.9.2. Yöntem

Beşyüz mikrolitre hacimli ependorf tüplerde toplamda 20 µl hacimde gerçekleştirilen cDNA sentezi için RNA örneklerinden 10 µl kullanılırken 2 µl 10xRT Buffer, 0,8 µl 25xdNTP mix, 2 µl 10xRT Random Primers, 1 µl Multiscribe™ Reverse Transcriptase ve 4,2 µl nükleaz-free su kullanıldı. Termal döngü cihazına yerleştirilen örnekler; 25 °C'de 10 dk, 37 °C'de 120 dk, 85 °C'de 5 dk ve 4 °C'de ∞ olacak şekilde cihazda bekletilerek sonunda oluşan cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

Tablo 3. cDNA Karışım Miktarı

BİLEŞİK	HACİM (µl)
10x RT Tamponu	2.0
25x dNTP Karışımı (100mM)	0.8
Multiscribe™ Reverse Transkriptaz	1.0
10x RT Random Primer	2.0
Nükleaz İçermeyen H ₂ O	4.2
Karışımın Toplamı	10.0

Tablo 4. cDNA Sentezi için Uygulanan PZR Programı

	1. BASAMAK	2. BASAMAK	3. BASAMAK	4. BASAMAK
SICAKLIK	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
SÜRE	10 dk	120 dk	5 dk	∞

2.1.10. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real Time)-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Çoğaltımı

Revers transkripsiyon sonucunda elde edilen cDNA'lar spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltıldı. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH (Qiagen (Kat. No: OT00079247)), TRPM2 (Qiagen (Kat. No: QT01870407)), Beta aktin (Actb), Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (MAP1LC3A), Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (MAP1LC3B), BCL-2 associated X protein (BAX), B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2), Autophagy/beclin-1 regulator 1 (AMBRA1), ATG12, ATG16L1, ATG5, BECLIN1, BECN1L1, Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1), Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), Lysosomal-associated membrane protein 3 (LAMP3), Phosphoinositide-3-kinase class 3 (PIK3C3), Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4 (PIK3R4), RB1-inducible coiled-coil 1 (RB1CC1), SH3-domain GRB2-like endophilin B1 (SH3GLB1), Tumor protein p53 (TP53), Tumor protein p73 (TP73), Unc-51-like kinase 1 (ULK1), Unc-51-like kinase 2 (ULK2) ve UV radiation resistance associated gene (UVRAG) genlerinin ekspresyonları belirlendi. Gen ekspresyonları arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

siRNA susturma yüzdesinin hesaplanmasında aşağıdaki hesaplama metodu kullanıldı.

$$\Delta\Delta CT \text{ Değeri} = \Delta CT \text{ siRNA} - \Delta CT \text{ Kontrol}$$

$$\text{Kat Değişimi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\text{Susturma Yüzdesi} = 100 \times (1 - \text{Kat Değişimi})$$

Üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen kantitatif RT-PZR yönteminde plate hazırlanırken her bir kuyucuğa 1 µl cDNA örneği konuldu. Her bir örnek için 2 µl qPCR mix, 1 µl primer ve 6 µl DNAaz ve RNAaz içermeyen steril su ilave edildi.

Tablo 5. RT-PZR için her bir kuyucuğa konan bileşikler

BİLEŞİKLER	HACİM (µl) x ÖRNEK SAYISI
cDNA	1.0
qPCR Mix	2.0
Primer	1.0
Su	6.0
Toplam	10

Gen ekspresyon düzeyleri Applied Biosystems 7500 Real Time PCR sistemi ile belirlendi. Çalışmada kontrol gen (housekeeping) olarak GAPDH ve beta-aktin kullanıldı. Isı koşulları 1 kez 95 °C'de 15 dk ve 40 kez 95 °C'de 15 sn-60 °C'de 30 sn-72 °C'de 30 sn olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 6. Uygulanan RT-PZR Programı

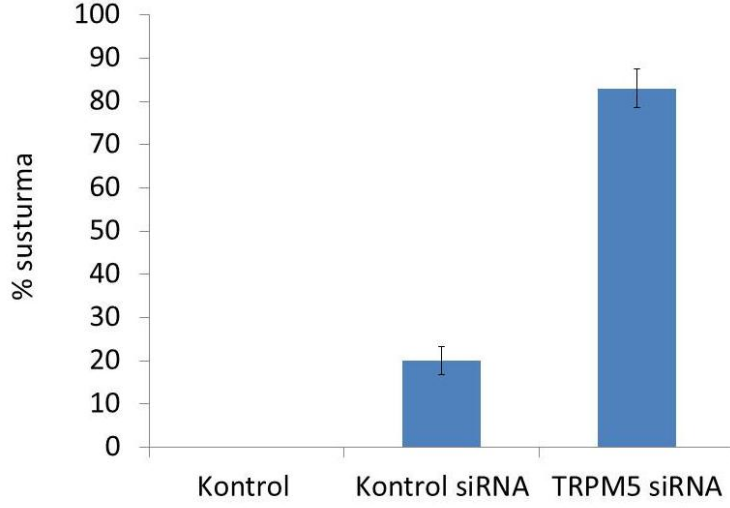
Döngü basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç Aktivasyonu	95 °C	15 dk	1
Denatürasyon	95 °C	15 sn	
Annealing	60-65 °C	30 sn	40
Uzama	72 °C	30 sn	

2.1.11. İstatistiksel Analizler

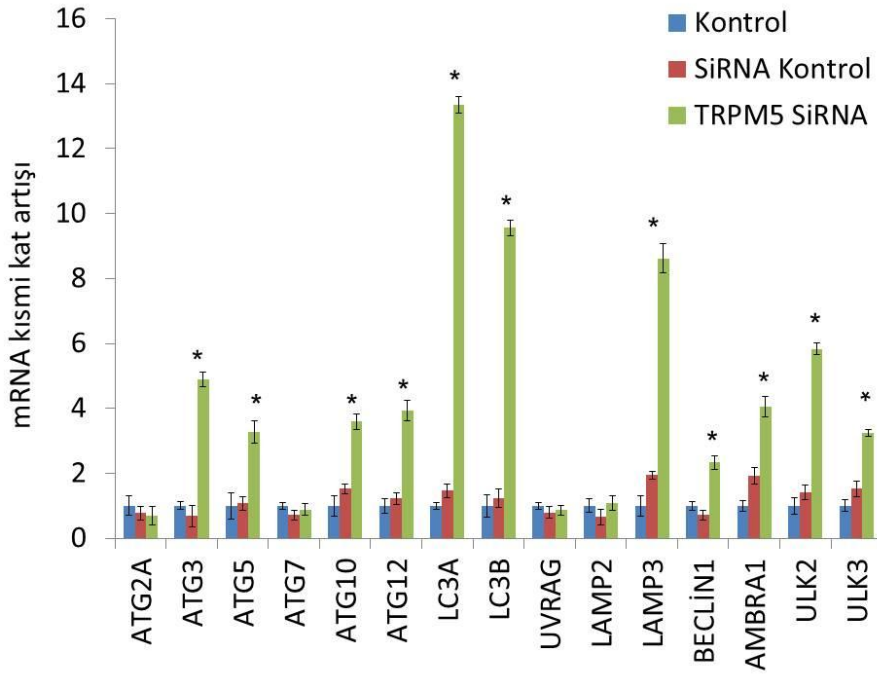
Tüm istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics programı 22. sürüm paket programı kullanıldı. Hücre sağkalım verilerinin gruplar arasındaki karşılaştırılmasında ki-kare, RT-PCR parametrelerinin gruplar arasında karşılaştırılması için t testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi bulgularına göre TRPM5 siRNA'sının %83 oranında baskılandığı belirlendi.



Şekil 4. Kantitatif Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyon Analizi bulguları



Şekil 5. TRPM5 siRNA tranfeksiyonu sonrası kontrol

Kontrol siRNA ve TRPM5 siRNA gruplarında otofajik genlerin kat artışı grafiği Grafikte 2 katın üzerindeki artışlar anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Real Time -PCR bulgularına göre kontrolle karşılaştırıldığında siRNA kontrol gruplarında otofajik genler açısından anlamlı bir azalma yada anlamlı bir artış belirlenmedi. Ancak hem kontrol hem de siRNA kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında TRPM5 siRNA grubunda ATG3 4,89 kat, ATG5 3,28 kat, ATG10 3,59 kat, ATG12 3,93 kat, LC3A 13,35 kat, LC3B 9,56 kat, LAMP3 8,62 kat, BECLIN1 2,34 kat, AMBRA1 4,06 kat, ULK2 5,83 kat ve ULK3'ün 3,24 kat istatistiki olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (Şekil). Ancak yine otofajide görevli olan ATG2A, ATG7, UVRAG ve LAMP2 gen mRNA ifadelerinde kontrol ve kontrol siRNA gruplarıyla karşılaştırıldığında TRPM5 siRNA grubu açısından anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



4. TARTIŞMA

Unc-51-like kinase 3 ve homoloğu olan ULK2, otofajinin indüklenmesinde yer alan kilit moleküllerdir. Otofajinin indüklenmesinde ULK'nın rolü tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen, ULK3'in otofagozomların öncül formları olan fagoforların oluşumunu düzenlemek için, otofaji indüklenmesinde bir diğer kilit aracı olan PIK3C3 ile etkileşim kurduğu gösterilmiştir (50). W Gao ve ark. (51) 2011'de yaptıkları çalışmada, ULK2 ve ULK3'yi, tümör baskılayıcı p53'ün kesin birer transkripsiyonel hedefi olduğunu göstermiştir. DNA hasarına yanıtta p53'ün, ULK2/3 transkripsiyon düzeylerini arttırdığını ve devamlı otofajiyi başlattığını öne süren bu araştırmacılar, böyle bir senaryoda otofaji indüklenmesinin artmış apoptotik olmayan hücre ölümüne yol açtığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda, TRPM5-siRNA gurubunda ULK3 düzeyinde anlamlı artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar,

Transient Receptor Potential Melastanin 5 ile ULK3 arasında ters orantı olduğunu ortaya koymaktadır. BECLIN 1, otofajide merkezi bir role sahiptir. BECLIN 1 etkileşimli bir protein olan AMBRA1, BECLIN 1 bağımlı otofajiyi pozitif bir şekilde düzenlemektedir. AMBRA1'in fare embriyolarındaki fonksiyonel eksikliği, otofajinin azlığı (bozukluğu) ile ilişkili olan nöroepitelyal hiperplaziye ve aşırı apoptotik hücre ölümüne sebebiyet vermiştir. AMBRA1, otofaji başlangıcının düzenlenmesinde hayati öneme sahip bir faktör olarak tanımlanabilir. Bir antiapoptotik faktör olan BCL-2'nin aşırı ekspresyonu, çoğu apoptoz indükleyicisine karşı koruyucu bir etki başlatır. Strappazon ve ark. (52) 2011 yılında yaptıkları çalışmada, AMBRA1 ve BCL-2'nin BECLIN 1'e aynı bölge üzerinden bağlandığını bu yüzden AMBRA1'in BECLIN 1'e bağlanmak için BCL-2 ile yarıştığını göstermişlerdir. Strappazon ve ark. (52). AMBRA1'in ekspresyonundaki azalma, rapamisinin düzeyi ve besin yokluğu ile indüklenen otofajide önemli düzeyde bir düşüşe yol açarken, AMBRA1'in aşırı ekspresyonu bazal ve rapamisin indüklü otofajiyi artırmaktadır. Kang ve ark. (53) Çalışmamızdaki RT-PZR sonuçlarına göre, AMBRA1 mRNA düzeyi TRPM2-siRNA gurubunda anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar TRPM5 ile AMBRA1 arasında ters orantı olduğunu ortaya koymaktadır.

Memeli hücrelerde MAPLC3 (LC3), yaygın bir şekilde bulunur ve otofagozomların oluşumu için esansiyeldir. Besin yetersizliğine bağlı olarak indüklenen otofajide, LC3 ekspresyonu artmaktadır. Bu yüzden otofaji için spesifik bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Wu ve ark. (54). Memeli hücrelerinde LC3'ün; LC3A, LC3B ve LC3C olmak üzere 3 izoformu bulunmaktadır ancak LC3B diğer iki izoforma kıyasla daha sık bir şekilde otofaji belirteci olarak kullanılmaktadır Ouyang ve ark. (55) ve Wu ve ark. (54) 2015'te yaptıkları çalışmada, LC3'ün, kolorektal kanser dokularında kanserli olmayanlara kıyasla hem mRNA hem de protein düzeyindeki ekspresyonunun önemli derecede artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, kanser hücrelerinde otofajik aktivite ya da otofaji potansiyelinin arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada elde ettiğimiz verilere göre, MAPLC3A ve MAPLC3B mRNA ekspresyonlarının, TRPM5-siRNA grubunda istatistikî açıdan anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, MAPLC3A ve MAPLC3B'nin, TRPM5 ile ters orantılı olduğunu göstermektedir.

Otofaji ile ilişkili genler-5, otofagozom uzamasında yer almasından dolayı otofaji için gerekli olan merkezi bir düzenleyicidir. ATG5'in zorunlu ekspresyonu hem in vivo hem de in vitro olarak tümör hücrelerini anti kanser ilaç uygulamalarına karşı hassas hale getirmektedir. Buna karşın siRNA aracılığıyla inhibe edilmesi kemoterapiye karşı kısmi bir direnç oluşmasına neden olmaktadır (56). Ouyang ve ark. (55) 2013 yılında insan prostat kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, VPA (anti kanser etkilere sahip bir histon deasetilaz inhibitörü) uygulanmasıyla LNCap ve PC-3 hücrelerinde otofajinin indüklendiğini ancak DU145 hücrelerinde ise engellendiğini gözlemlemişlerdir. ATG5'in, LNCAP ve PC3 hücrelerinde tespit edildiği ancak DU145 hücrelerinde ATG5 mRNA alternatif splicelerinin fonksiyonel olmayan kesik ürünlere yol açmasından dolayı ATG5 eksik olduğu belirlenmiştir. Wild tip ATG5 geninin DU145 hücrelerine transfekte edilmesinin ardından hücrelerde otofaji sağlandığı tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada, ATG5 mRNA ekspresyonunun, TRPM5-siRNA gruplarında istatistikî açıdan anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, TRPM5 ile ATG5 arasında mRNA düzeyinde ters yönlü bir ilişkinin olduğunu ifade edebilir.

Otofaji ile ilişkili genler-12, hem otofagozom oluşumunu başlatarak hem de bazı BCL-2 ailesi üyelerine bağlanıp inaktif hale getirmek suretiyle apoptozu doğrudan düzenleyerek iki farklı şekilde hizmet edebilmektedir (57). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, ATG12 mRNA ekspresyonu, TRPM5-siRNA grubunda istatistikî olarak anlamlı arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, TRPM2 ile ATG12 arasında mRNA düzeyinde ters orantı olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızda, LAMP3 mRNA ekspresyonunun TRPM5-siRNA grubunda istatistiksel olarak anlamlı arttığı belirlendi. Bu sonuç, TRPM5 ile LAMP3 arasında ters orantılı ilişkinin olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Sonuç olarak TRPM5-siRNA uygulaması, otofajik yollardaki genlerin ekspresyonunu açıkça arttırmaktadır. Bu veriler, TRPM5 supresyonunun, otofajik mekanizmaları harekete geçirebileceğini göstermiştir. Kanserde, otofajinin, hücrelerin hem sağkalımına hem de ölümüne yol açabilen iki farklı fonksiyon gösterebileceği tespit edilmiştir. TRPM5 ile ilişkili otofajın tespit edilmesi ile TRPM5 otofajisi hedef alınarak inhibisyon ya da aktivasyon yapılabilir. Bu durum, hücrelerin otofajik ölümüne yol açan kanser tedavilerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

5. KAYNAKLAR

1. Aparicio CB, Renner O, Leal JFM, Carnero A. PTEN, More than the AKT Pathway. *Carcinogenesis*, 2007; 28: 1379–1386.
2. Alberts B, Alexander J, Jelina L, Martin R, Keith R, Peter W. *The Cell*, New York: Garland Serunce Pub 2001: 34: 7-8
3. Cooper MC, Hausman RE. *Hücreye Moleküler Yaklaşım*. Neşe Atabey (ed) İzmir: İzmir Kitapevi, 2006: 635.
4. www.cdc.gov/nchs/PRESSROOM/08newsrelases/mortality2006.htm Erişim tarihi 11.05.2017
5. www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db18.htm 01.06.2009 Erişim tarihi 11.05.2017
6. www.cancer.org/downloads/stt/500809web.pdf 01.06.2009 Erişim tarihi 11.05.2017
7. www.seer.cancer.gov/csr/1975-2005 01.06.2009 Erişim tarihi 11.05.2017
8. www.Cancercontrol.cancer.gov 01.06.2009 Erişim tarihi 11.05.2017
9. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and Apoptosis: Size Matters. *Oncogene*, 2003; 22: 8983–8998.
10. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN Signaling in Tumorigenesis and Angiogenesis. *Biochemica et Biophysica Acta*. 2008; 1784: 150–158.
11. Enklear T, Esswein M, Oswald M, Hilbert K, Winderpacht A, Higgins M, et al. MTRL, a novel biallelically expressed gene in the center of the Mouse distalchromosom 7 imprinting cluster, is a member of the trp gene family. *Genomics* 2000; 67: 179-187.
12. Prawitt D, Enklaar T, Klemm G, Gärtner B, Spangenberg C, Winterpacht A, et al. Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression *Hum Mol Genet*. 2000; 9: 203-216.

13. McKemy DD, MNeuhausser W, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 2002; 416: 52–58.
14. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 2002; 108: 705-715.
15. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 2002; 108: 595-598.
16. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. 2003; 426: 517-524.
17. Ohashi R, Takahashi F, Cui R, Yoshioka M, Gu T, Sasaki S, et al. Interaction Between CD44 and Hyaluronate Induces Chemoresistance in Non-small Cell Lung Cancer. *Cell Cancer Letters*. 2007; 252: 225-234.
18. Kandasamy K, Srivastava RK. Role of the Phosphatidylinositol 3 Kinase/PTEN/Akt Kinase Pathway in Tumor Necrosis Factor-related ApoptosisInducing Ligand-Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Research* 2002; 62: 4929-4937.
19. Lim WT, Zhang WH, Miller CR, Watters JW, Gao F, Viswanathan A, et al. PTEN and Phosphorylated AKT Expression and Prognosis in Early- and Late-Stage Non-Small Cell Lung cancer. *Oncology Reports* 2006; 17: 853-857.
20. Liu D, Nakanoa J, Ishikawaa S, Yokomisea H, Uenob M, Kadotac K, et al. Overexpression of Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7) Correlates with Tumor Proliferation, and a Poor Prognosis in Non-Small Cell lung Cancer. *Lung Cancer*, 2007; 58: 384-391.
21. Tang JM, Hea QY, Guob RX, Chang XJ. Phosphorylated Akt Overexpression and Loss of PTEN Expression in Non-small Cell Lung Cancer Confers Poor Prognosis. *Lung Cancer* 2006; 51: 181-191.
22. Abraham J, Allegra CJ, Gulley J. *Klinik Onkoloji El Kitabı*, Cem Parlak ve Alpaslan Mayadağı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2009: 35-42.
23. Bireroğlu İÜ. *Temel İç Hastalıkları*. 1. Baskı, Ankara: Güneş kitapevi, 1994; 1391.

24. Sahai E. Mechanisms of Cancer Cell Invasion. *Current Opinion in Genetics & Development* 2005; 15: 87–96.
25. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of Evil: Molecular Mechanisms of Cancer Metastasis. *Oncogene* 2003; 22: 6524–6536.
26. Demuth T, Berens ME. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Migration and Invasion. *Journal of Neuro-Oncology* 2004; 70: 217–228.
27. Song L, Morris M, Bagui T, Lee FY, Jove R, Haura EB. Dasatinib (BMS-354825) Selectively Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells Dependent on Epidermal Growth Factor Receptor Signaling for Survival. *Cancer Res* 2006; 66: 5542-5548.
28. www.biyokimya.uludağ.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf Erişim tarihi 05.06.2017
29. Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press 2012: 395-401.
30. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010; 221: 3–12.
31. Grasso S, Gómez-Martínez Á, Tristante E. *Cell Death and Cancer, Novel Therapeutic Strategies*. INTECH Open Access Publisher, 2012.
32. Kung HJ. Targeting tyrosine kinases and autophagy in prostate cancer. *Horm Cancer* 2011; 2: 38–46.
33. Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 2011; 7: 457–465.
34. Denton D, Nicolson S, Kumar S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation* 2012; 19: 87-95.
35. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90: 1383-1435.
36. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 528-539.

37. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 651–662.
38. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 401–410.
39. Kondratskyi A, Yassine M, Kondratska K. Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Frontiers in physiology* 2013; 4: 272.
40. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006; 10: 51–64.
41. Takamura A, Komatsu M, Hara T. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; 25: 795–800.
42. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 726–734.
43. Selvakumaran M, Amaravadi RK, Vasilevskaya IA, O'dwyer PJ. Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2995–3007.
44. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 654–666.
45. Perez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, et al. A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 2002; 5, 1169–1176.
46. Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, et al. Coding of sweet, bitter and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 2003; 112: 293-2301.
47. Lindemann B. Receptors and transduction in taste. *Nature* 2001; 413: 219-225
48. Margolskee RF. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *Biol Chem* 2002; 277: 1-4.

49. Medler K, Kinnamon S. Transduction mechanisms taste cells. Frings S, Bradley J, (eds). Transduction channels in sensory cells. Wiley-VCH, Weinheim 2004; 153-174
50. Jung CH, Seo M, Otto NM, Kim DH. ULK1 inhibits the kinase activity of mTORC1 and cell proliferation. *Autophagy* 2011; 7: 1212-1221.
51. Gao W, Shen Z, Shang L, Wang X. Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death & Differentiation* 2011; 18: 1598-1607.
52. Strappazon F, Vietri-Rudan M, Campello S. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. *The EMBO journal* 2011; 30: 1195-1208.
53. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 2011; 18: 571-580.
54. Wu S, Sun C, Tian D. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015; 8: 3882.
55. Ouyang DY, Xu LH, He XH. Autophagy is differentially induced in prostate cancer LNCaP, DU145 and PC-3 cells via distinct splicing profiles of ATG5. *Autophagy* 2013; 9: 20-32.
56. Ge J, Chen Z, Huang J. Upregulation of Autophagy-Related Gene-5 (ATG-5) Is Associated with Chemoresistance in Human Gastric Cancer. *PLoS One* 2014; 9: 40-48.
57. Hayat MA (ed). *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging: Volume 3-Role in Specific Diseases*. Academic Press, 2013.

6. ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladım. 1987 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi bölümüne tıp eğitimime başladım. 1993 yılında mezun oldum. Sağlık Bakanlığına bağlı hastanelerde doktorluk ve idarecilik yaptım. 2012 yılında F.Ü. Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalında uzmanlık eğitimime başladım. Halen devam etmekteyim. Evli 2 çocuk babasıyım. Orta düzeyde İngilizce bilmekteyim.

