



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

KÜÇÜK HÜCRE DİŞİ AKCİĞER KANSERLERİNDE
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ NF κ B-ARACILI
OTOFAJİ DÜZENLENME MEKANİZMALARININ
AYDINLATILMASI

Özge ALVUR

Ağustos 2020
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRE DIŞI AKCİĞER KANSERLERİNDE
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ NFκB-ARACILI
OTOFAJİ DÜZENLENME MEKANİZMALARININ
AYDINLATILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Özge ALVUR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Denizli, 2020

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar" gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Tam metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-1. Akgun S, Kucuksayan H, Ozes O N, Can O, Alikanoglu A S, Yildiz M, Akca H. NF-kappaB-Induced Upregulation of miR-548as-3p Increases Invasion of NSCLC by Targeting PTEN. Anticancer Agents Med Chem 2019.

Ek-2. Alvur O, Tokgun O, Baygu Y, Kabay N, Gok Y, Akca H. The triazole linked galactose substituted dicyano compound can induce autophagy in NSCLC cell lines. Gene 2019 Sep 5;712:143935

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Özge ALVUR tarafından Prof. Dr. Hakan AKÇA yönetiminde hazırlanan “**Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde Transkripsiyon Faktörü NFκB-aracılı Otofaji Düzenleme Mekanizmalarının Aydınlatılması**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Hakan AKÇA
Pamukkale Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Hakan AKÇA
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Ali Nur Turgut ULUTİN
İstanbul Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK
Marmara Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.../.../..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Özge ALVUR
İmza :

ÖZET

Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde Transkripsiyon Faktörü NFκB-aracılı Otofaji Düzenlenme Mekanizmalarının Aydınlatılması

Özge ALVUR
Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Ağustos 2020, 111 Sayfa

Otofaji, tüm ökaryotlarda yüksek oranda korunmuş hücre içi degradasyon ve geri dönüşüm prosesidir. Otofaji mekanizmasında meydana gelen aksaklıklar kanser de dahil birçok hastalığın progresyonunda yer alır. Otofaji, kanserin doğasına bağlı olarak tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak davranabildiği gibi onkogenik bir mekanizma olarak da davranabilir. Otofaji mekanizmasının düzenlenmesinde birçok hücre içi molekül, selüler proses ve yollar rol oynayabilir. Bu yollardan biri de NFκB yolağıdır. Bir transkripsiyon faktörü olan NFκB, önemli hücresel proseslerde rol oynayan çok fazla sayıda genin ekspresyonunu regüle eder. NFκB'nin otofajiyi indükleyici ya da otofajiyi inhibe edici olarak davrandığı bilinmektedir. Kullanımda olan birçok anti-kanser terapisinin hem otofajiyi hem de NFκB yolağını etkilediği bilinmektedir. NFκB yolağı ve otofaji arasındaki fonksiyonel ilişkiyi aydınlatmak kombine terapiler kullanılarak kanser tedavilerinin etkinliğinin artırılmasına ve yeni stratejiler geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir. Ancak literatürde, Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde (KHDAK) NFκB yolağının otofajiyi nasıl düzenlediği ve bu düzenlemenin ayrıntılı mekanizmasına ilişkin bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle tez çalışmamızda Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NFκB'nin otofaji mekanizması üzerindeki olası regüle edici etkisini ve NFκB-aracılı otofaji regülasyonunda rol oynayan olası genleri saptamayı amaçladık. Öncelikle KHDAK hücre hattında NFκB baskılanan ve overeksprese edilen gruplar oluşturduk ve bu gruplarda otofajiyi indüklediğimiz ve indüklediğimiz alt gruplar oluşturduk. Bu örnek gruplarında otofaji düzeylerini western blot analizi ile belirledik. Bunun sonucunda Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserinde NFκB'nin otofajiyi pozitif regüle ettiğini ortaya koyduk. Sonrasında bu örnek gruplarında RNA sekans analizi ile gruplar arasında farklı ekspresyon profili sergileyen genleri saptadık. NFκB overeksprese edilen otofaji indüklü gruplarda ekspresyonu artarken NFκB baskılandığında ekspresyonu düşüş gösteren genleri NFκB-aracılı otofaji regülasyonunda rol oynayan aday genler olarak belirledik. RNA sekanslama sonuçlarını qRT-PCR analizi ile teyit ederek NFκB-aracılı pozitif otofaji regülasyonunda rol oynayan genleri saptadık. Çalışmamızın 'NFκB Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde otofajiyi nasıl regüle eder ve bu regülasyonda rol oynayan genler nelerdir?' sorusuna cevap bulabilmek adına literatüre katkı sunacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Otofaji, NFκB, KHDAK, LC3B, RelA

Bu çalışma, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ve PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018SABE024).

ABSTRACT**Elucidation of Transcription Factor NF κ B-mediated Autophagy Regulation Mechanisms in Non-Small Cell Lung Cancer**

ALVUR, Ozge
PhD Thesis in Medical Biology
Supervisor: Prof. Dr. Hakan AKCA (PhD)

August 2020, 111 Pages

Autophagy, is an intracellular degradation and recycling process which has been highly conserved in eukaryotes. Dysfunctions in autophagy process take place in progression of various diseases including cancer. Depend on nature of cancer, autophagy may behave as an oncogenic mechanism as well as a tumor suppressor mechanism. Many intracellular molecules, cellular processes and pathways may play role in regulation of autophagy mechanism. One of them is NF κ B pathway. NF κ B, a transcription factor, regulates the expression of a large number of genes involved in important cellular processes. It is known that NF κ B behaves an autophagy inducer or inhibitor. Many anti-cancer therapies in use effect both autophagy and NF κ B pathway. Illuminating the functional relationship between the NF κ B pathway and autophagy can contribute to increase of the effectiveness of cancer treatments by using combined therapies and to development of new strategies. However in the literature, there is no information about how NF κ B pathway regulates autophagy in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and detailed mechanism of this regulation. Therefore, in our thesis, we aimed to determine the possible regulatory effect of NF κ B on autophagy mechanism and possible genes involved in NF κ B-mediated autophagy regulation in NSCLC. Firstly, we constituted NF κ B-suppressed and -overexpressed groups in NSCLC cells and subgroups which we induced and not induced autophagy. We determined autophagy levels in these groups by western blotting. As result, we revealed that NF κ B positively regulates autophagy in NSCLC. After that, in these groups, we detected genes that display different expression profiles between the groups by RNA sequence analysis. We determined the genes that showed decreased expression when NF κ B was suppressed while their expressions increased in NF κ B overexpressed autophagy-induced groups as candidate genes which play role in NF κ B-mediated autophagy regulation. We detected genes which play role in NF κ B-mediated positive autophagy regulation by confirming RNA sequencing results by qRT-PCR. We think that our study will contribute to the literature in order to find the answer to the question of "How does NF κ B regulate autophagy in NSCLC and what are the genes involved in this regulation?"

Keywords: Autophagy, NF κ B, NSCLC, LC3B, RelA

This study was supported by Faculty Member Training Program and Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project numbers: 2018SABE024).

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim için beni öğrencisi olarak kabul ederek birlikte çalışma olanağı sağlayan, yardımlarını esirgemeyip çalışmalarımız için tüm imkanlarını sunan, bilimsel tecrübelerini cömertçe paylaşan, katkı ve eleştirileri ile tez çalışmamın tamamlanmasında büyük emeği olan değerli hocam Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya,

Pamukkale Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm saygıdeğer hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Tez projemin maddi desteğini sağlayan Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ve Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tüm hayatım boyu beni her koşulda sonsuz sevgi ve hoşgörüyle karşılayan, maddi ve manevi tüm imkanlarını karşılıksız sunarak beni destekleyen, vatana hayırlı evlat yetiştirme sorumluluğuyla beni bugünlere getirmiş olan, artık bu Dünya'da olmasalar da hep yanımda olduklarını hissettiğim rahmetli anne, babama; bu zorlu süreçte beni daima destekleyen sevgili eşime, aileme ve tüm sevdiklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	3
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Akciğer Kanseri	4
2.1.1. Epidemiyolojisi	4
2.1.2. Etiyolojisi.....	8
2.1.2.1. Tütün ve sigara tüketimi	8
2.1.2.2. Genetik faktörler	10
2.1.2.3. Yaş, cinsiyet, ırksal ve etnik faktörler	11
2.1.2.4. Çevresel hava kirliliği ve mesleksel faktörler.....	13
2.1.2.5. Enfeksiyon.....	14
2.1.2.6. Diyet ve obezite.....	15
2.1.3. Histolojik sınıflandırması	16
2.1.4. Evrelemesi.....	20
2.2. Otofaji.....	21
2.2.1. Genel bilgi.....	21
2.2.2. Otofajinin fizyolojik rolleri.....	24
- Hücreesel homeostazın korunması	24

- Stres yanıtının düzenlenmesi	24
- Starvasyona bağlı stres yanıtı	24
- Hipoksik koşullara yanıt	24
- Enfeksiyona yanıt.....	25
- Oksidatif stres ve mitokondriyal hasara yanıt	25
2.2.3. Otofajinin regülasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar	25
2.2.4. Programlı hücre ölüm mekanizması olarak "otofajik hücre ölümü"	31
2.2.5. Otofaji ve kanser	33
2.2.5.1. Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde otofaji mekanizması	35
2.2.5.2. KHDAK tedavisinde otofaji mekanizmasını hedefleyen terapötik yaklaşımlar.....	36
2.3. Transkripsiyon Faktörü NF κ B.....	37
2.3.1. NF κ B ve kanser	39
2.3.2. NF κ B ve otofaji sinyal yolları arasındaki etkileşim	41
2.3.2.1. NF κ B sinyal yolağı bileşenlerinin otofaji aracılı degradasyonu.....	41
2.3.2.2. Otofajinin NF κ B-aracılı regülasyonu	42
2.3.3. Kanser tedavi yaklaşımı olarak NF κ B ve otofaji arasındaki ilişkinin hedeflenmesi..	43
2.4. Hipotez.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	45
3.1. Hücre Kültürü	45
3.2. Kullanılan Kimyasallar	45
3.3. H1299 Hücreleri için Optimum Torin1 Dozunun Ayarlanması	46
3.4. Plazmid Vektörü ve siRNATtransfeksiyonları.....	46
3.5. Western Blot Analizi	48
3.5.1. Protein izolasyonu.....	48
3.5.2. Protein miktar tayini	48

3.5.3. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve PVDF membrana transferi.....	49
3.5.4. İmmunoblotlama	51
3.6. İmmunofloresans.....	51
3.7. Total RNA İzolasyonu.....	52
3.8. Total RNA'dan cDNA Sentezi.....	53
3.9. RNA Sekanslama (RNA-seq)	53
3.10. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR).....	54
3.11. Biyoinformatik Araçların Kullanımı	55
3.12. İstatistiksel Analiz	56
4. BULGULAR	57
4.1. H1299 Hücreleri İçin Torin1 Optimum Dozunun Belirlenmesi	57
4.2. Plazmid Vektörü ile NFκB Overekspresyonu ve siRNA-aracılı NFκB Knockdownu Sonucunda Otofaji Düzeyinin Western Blot Analizi ile Değerlendirilmesi.	58
4.3. NFκB-aracılı Otofaji Regülasyonunun İmmunofloresans Görüntüleme ile Değerlendirilmesi	62
4.4. RNA-seq Analizi ile NFκB-bağımlı Otofaji Regülasyonunda Rol Oynayan Genlerin Belirlenmesi	63
4.4.1. RNA-seq analizi için oluşturulan grupların ve analiz verilerinin doğruluğu	63
4.4.2. DEG analizi ile gruplar arasında farklı eksprese olan genlerin saptanması ...	66
4.5. qRT-PCR ile RNA-seq Analizi Sonucunda Saptanan Genlerin Ekspresyon Düzey Değişimlerinin Doğrulanması.....	70
4.6. NFκB-aracılı otofaji regülasyonunda rol oynadığı belirlenen genlerin promoter bölgelerinde κB motifi varlığının <i>in silico</i> incelenmesi	73
4.7. Saptanan Genlerden Eksprese Olan Proteinlerin NFκB ve Kendi Aralarındaki Fonksiyonel Etkileşimlerin <i>In Silico</i> İncelenmesi	78
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇLAR	88

7. KAYNAKLAR	90
8. ÖZGEÇMİŞ	109
9. EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 2018 tahmini verilerine göre Dünya genelinde kanser çeşitlerinin görülme sıklığı ve kanser nedenli ölüm sıklığı.....	5
Şekil 2.2 Akciğer kanserinin uluslararası düzeyde erkek (A) ve kadınlarda (B) yaşa göre standardize edilen 100.000 kişide görülme sıklığı	5
Şekil 2.3 Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı Türkiye verilerine göre erkeklerde ve kadınlarda gözlenen kanser türlerinin insidansı	6
Şekil 2.4 Akciğer kanser türlerinin akciğerde sıklıkla görüldüğü bölgelerin basit şematize gösterimi.....	18
Şekil 2.5 Akciğer kanserinin basit histolojik sınıflandırılması.	18
Şekil 2.6 Otofaji mekanizmasının basamaklarının şematik gösterimi.....	26
Şekil 2.7 Otofagozom ile lizozomun birleşmesinin ve bu aşamada rol oynayan başlıca proteinlerin şematize gösterimi	29
Şekil 2.8 Otofagozom ile lizozomun birleşmesinin ve bu aşamada rol oynayan başlıca proteinlerin şematize gösterimi.....	31
Şekil 4.1 H1299 hücrelerinde 24 saat sonunda en yüksek otofaji düzeyini sağlayan optimum Torin1 konsantrasyonunun western blot analizi ile tespit edilmesi ve dansitometrik ölçüm ile elde edilen LC3BII OD değerlerinin GAPDH OD değerlerine göre normalize edilerek sonuçların grafik şeklinde gösterimi.	69
Şekil 4.2 Torin1(-) normal şartlardaki ve Torin1(+) otofaji indüklü şartlardaki H1299 hücre hatlarına pcDNA3.1+p65 overekspresyon vektörü ve p65 siRNA transfeksiyonu sonrasında p65 protein düzeyleri ve dansitometrik ölçüm sonucu elde edilen OD değerlerinin GAPDH ile normalize edilerek grafik şeklinde gösterimi.	59
Şekil 4.3 Torin1(-) normal şartlardaki ve Torin1(+) otofaji indüklü şartlardaki H1299 hücre hatlarına pcDNA3.1+p65 overekspresyon vektörü ve p65 siRNA transfeksiyonu sonrasında p-p65 protein düzeyleri ve dansitometrik ölçüm sonucu elde edilen OD değerlerinin GAPDH ile normalize edilerek grafik şeklinde gösterimi.	60
Şekil 4.4 Torin1(-) normal şartlardaki ve Torin1(+) otofaji indüklü şartlardaki H1299 hücre hatlarına pcDNA3.1+p65 overekspresyon vektörü ve p65 siRNA transfeksiyonu sonrasında LC3BII protein düzeyleri ve dansitometrik ölçüm sonucu elde edilen OD değerlerinin GAPDH ile normalize edilerek grafik şeklinde gösterimi	61

Şekil 4.5 Torin1(-) normal şartlarda ve Torin1(+) otofaji indüklü şartlarda NFκB overeksprese edilmiş ve susturulmuş gruplarda LC3B proteininin beyaz ışık ve 588nm dalga boyundaki immunofloresans görüntüsü.....	62
Şekil 4.6 Sekanslanan örneklerden elde edilen verilen Q30 skoruna göre doğruluğu.....	64
Şekil 4.7 Örneklerin haritalanma oranları.....	64
Şekil 4.8 Örnekler ve genler arasındaki ekspresyon patern benzerliğini gösteren heat map haritası.....	65
Şekil 4.9 Gruplar arası ekspresyon farklılıklarının hiyerarşik sınıflandırma grafiği ile gösterimi.....	66
Şekil 4.10 p65 overeksprese eden Torin1(+) otofaji indüklü H1299 hücrelerinde kontrole kıyasla ekspresyon farklılığı gösteren genlerin moleküler fonksiyonları ve yer aldığı biyolojik prosesler Gene Ontology veri tabanına dayanarak enrichment analizi ile belirlenmiştir.....	68
Şekil 4.11 qRT-PCR analizi sonucunda RNA-seq sonuçları ile korele ekspresyon düzey değişimi saptanan genlerin relatif ekspresyon değişimlerinin grafiği.....	71
Şekil 4.12 NFκB (RelA/p65) 'nin bağlanma motifi logosu ve bazların dizilim olasılığı puanlaması.....	73
Şekil 4.13 <i>EGR3</i> promoterındaki tahmini NFκB bağlanma bölgeleri.....	74
Şekil 4.14 2 farklı tahmini <i>EBI3</i> promoterı üzerindeki NFκB bağlanma bölgeleri.....	74
Şekil 4.15 2 farklı tahmini <i>MMP15</i> promoterı üzerindeki NFκB bağlanma bölgesi.....	75
Şekil 4.16 4 farklı tahmini <i>FBLN5</i> promoterı üzerindeki NFκB bağlanma bölgeleri.....	75-76
Şekil 4.17 Tahmini <i>STK32A</i> promoterı üzerindeki NFκB bağlanma bölgeleri.....	76
Şekil 4.18 3 farklı tahmini <i>SPOCK2</i> promoterları üzerindeki NFκB bağlanma bölgeleri.....	77
Şekil 4.19 Tahmini <i>TGFβ1</i> promoterı üzerindeki NFκB bağlanma bölgeleri.....	77
Şekil 4.20 Tahmini <i>NLRP3</i> promoterı üzerindeki NFκB bağlanma bölgeleri.....	78
Şekil 4.21 Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde otofajinin NFκB-aracılı pozitif regülasyonunda rol oynadığını saptadığımız genlerin STRING veritabanına göre NFκB ve kendi aralarındaki fonksiyonel etkileşimleri gösterilmesi.....	78

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 IARC'nın 2018 yılı tahmini verilerine göre ilk 25 ülkenin yaşa göre standardize edilmiş akciğer kanser insidansları	7
Tablo 2.2 Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılındaki son güncellemesi ile oluşturulan akciğer kanserinin detaylı histopatolojik sınıflandırılması.....	19
Tablo 2.3 Akciğer Kanseri Çalışma Derneği'nin (IASLC) 2017 yılında oluşturduğu en güncel 8. TNM evreleme sistemi.....	21
Tablo 2.4 Günümüzde kullanılan anti-kanser ilaçları arasında otofaji mekanizmasını ve NFκB sinyal yollarını hedefleyenler ve etki mekanizmaları.....	44
Tablo 3.1 Separating (Ayrıştırma) ve Stacking (Yükleme) jel formülasyonları.....	50
Tablo 3.2 Total RNA'yı cDNA'ya dönüştürme reaksiyon bileşenleri ve koşulları.....	53
Tablo 3.3 qRT-PCR reaksiyon bileşenleri ve koşulları.....	54
Tablo 3.4 qRT-PCR ile mRNA ekspresyonları değerlendirilen genler ve primer dizileri.....	55
Tablo 4.1 RNA-seq analizi sonucunda karşılaştırılan gruplar arasındaki NFκB (p65) ekspresyon değişim oranları.....	67
Tablo 4.2 Torin1(+) otofaji indüklü H1299 hücre hatlarında p65 overeksprese edilen ve susturulan gruplarda anlamlı ekspresyon düzeyleri saptanarak qRT-PCR ile ekspresyon düzeyleri doğrulanmak üzere seçilen genler.....	69
Tablo 4.3 RNA-seq sonucuna göre belirlenen genlerin qRT-PCR analizi sonucunda saptanan ekspresyon düzey değişimleri ve istatistiksel anlamlılıkları.....	70
Tablo 4.4 qRT-PCR analizi sonucunda RNA-seq sonuçları ile korele ekspresyon düzey değişimi saptanan genler.....	71
Tablo 4.5 Tezimizde saptadığımız NFκB-aracılı pozitif otofaji regülasyonunda rol oynayan genler ve otofaji mekanizması arasındaki etkileşim ile ilişkili literatür ve veritabanı bilgisi...	72

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl.....	Mikrolitre
ALK.....	Anaplastik Lenfoma Kinaz
AMBRA1.....	Otofaji ve Beclin1 Regülatörü 1
AMP.....	Adenozin Monofosfat
AMPK.....	AMP-Aktive Protein Kinaz
APS.....	Amonyum persülfat
ATF4.....	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4
ATG.....	Otofaji İlişkili Gen
ATP.....	Adenozin Trifosfat
Bcl-2.....	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BH3.....	Bcl-2 Homoloji 3
BNIP3.....	BCL2 Etkileşim Proteini 3
BSA.....	Sığır Serum Albumini
cDNA.....	Komplementer DNA
Csi_T_plus.....	Kontrol siRNA otofaji indüklü grup
DEG Analizi.....	Farklı Ekspres Olan Gen Analizi
dH ₂ O.....	Distile su
DNA.....	Deoksiribo Nükleik Asit
EGF.....	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR.....	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
eIF2 α	Ökaryotik Translasyon Başlatıcı Faktör 2
EMT.....	Epitelyalden-Mezenşimale Geçiş
ER.....	Endoplazmik Retikulum
FIP200.....	FAK Ailesi Kinaz-Etkileşimli Protein 200 kDa
GAPDH.....	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GSEA.....	Gen Set Zenginleştirme Analizleri
HIF-1 α	Hipoksi-indüklenebilir Faktör-1 α
HOPS.....	Homotipik Füzyon ve Protein Sınıflandırma
HPV.....	İnsan Papiloma Virüsü
I κ B.....	NF κ B inhibitörleri
IARC.....	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IASLC.....	Akciğer Kanseri Çalışma Derneği
IKK.....	I κ B kinaz
kDa.....	Kilodalton
KHAK.....	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK.....	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
LC3.....	Mikrotübül İlişkili Protein 1 Hafif Zincir 3
LCN2.....	Lipocalin 2
LIR.....	LC3 Etkileşim Bölgesi
LKB1.....	Karaciğer Kinaz B1
ml.....	Mililitre
mLST8.....	mTOR İlişkili Protein, LST8 Homoloğu

mM.....	Milimol
MOCK_T_minus.....	Kontrol vektörü normal grup
MOCK_T_plus.....	Kontrol vektörü otofaji indüklü grup
mRNA.....	mesajcı RNA
mTOR.....	Memeli Rapamisin Hedefi
mTORC1/2.....	mTOR Kompleksi1/2
MYO.....	Miyozin ağır zincir yapı genleri
NBR1.....	BRCA1 Komşu Proteini 1
NDP52.....	Nüklear Domeyn 10 Protein 52
NEMO.....	NFκB Esansiyel Modülatör
NFκB.....	Nüklear Faktor Kappa B
NIK.....	NFκB-indükleyici kinaz
nM.....	Nanomol
°C.....	Santigrat derece
OD.....	Optik Dansite
P65_T_minus.....	p65 overekspresyon vektörü normal grup
P65_T_plus.....	p65 overekspresyon vektörü otofaji indüklü grup,
P65si_T_minus.....	p65siRNA normal grup
P65si_T_plus.....	p65siRNA otofaji indüklü grup
PBS.....	Fosfatla Tamponlanmış Tuzlu su
pcDNA3.1.....	Plasmid klonlayıcı DNA 3.1
PE.....	Fosfotidiletanolamin
PI.....	Fosfotidilinositol
PI3P.....	Fosfotidilinositol trifosfat
PVDF.....	Poliviniliden Florür
qRT-PCR.....	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
RAPTOR.....	mTOR Kompleks 1 Düzenleyici Protein
RFA.....	Radyofrekans Ablasyonu
RHD.....	Rel Homoloji Domainleri
RICTOR.....	Rapamisine Duyarlı mTOR Eşlikçi Protein
RIP.....	Reseptör Etkileşim Proteini
RIPA.....	Radioimmünopresipitasyon Analiz Tamponu
RNA.....	Ribonükleik Asit
RNA-seq.....	RNA Sekans Analizi
ROS.....	Reaktif Oksijen Türleri
rRNA.....	Ribozomal RNA
SD.....	Standart Deviasyon
SDS PAGE.....	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
siRNA.....	small interfering-RNA
SNARE.....	SNAP Reseptör Proteini
SQSTM1.....	Sequestosome 1
TAD.....	Transkripsiyonal Aktivasyon Domaininin (
TBS-T.....	Tris-tamponlu Tuzlu su-Tween 20
TFF-1.....	Tiroid transkripsiyon faktörü
TNF.....	Tümör Nekrozis Faktör
TSC2.....	Tuberoskleroz 2 Proteini
UBA.....	Ubikutin İlişkili Domeyn
ULK1/2.....	Unc-51-benzeri Kinaz 1/2
UVRAG.....	UV Radyasyon Direnç İlişkili Gen
Vps34.....	Vesiküler protein sortin 34

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri Dünya genelinde en yüksek yaygınlığa sahip olan kanser türüdür ve başlıca iki gruba ayrılır: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK). Bu iki tip kanserin büyüme hızları, yayılımları ve tedavileri farklıdır. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK), Küçük Hücreli Akciğer Kanserinin dışındaki tüm epitelyal akciğer kanserlerini kapsar. Amerikan Kanser Topluluğu'nun 2017 yılı verilerine göre akciğer kanserlerinin %80-85'i KHDAK alt türüne dahildir (WEB_1).

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır (Öz Arslan vd 2011). Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyum sağlamasına yardım ettiği böylelikle hücre içi homeostazın korunmasında etkili bir hücresel proses olduğu gösterilmiştir (Ohsumi 2001, Shintani ve Klionsky 2004). Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve hücre içi patojenlerin yıkımı gibi hücresel olaylarda da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Shintani ve Klionsky 2004, Mizushima vd 2008). Ayrıca otofaji; oksidatif stres, hipoksi, endoplazmik retikulum stresi, hormonal dengesizlik, patojen-ilişkili moleküler paternler, DNA hasarı ve anti-kanser terapileri gibi stres koşullarına yanıt olarak da indüklenebilir. Stres koşulları altında çoğunlukla hücreyi koruma yönünde çalışan otofaji, bazı koşullarda da hücre ölüm programlarını tetikleyebilir (Trocoli ve Djavaher-Mergny 2011). Araştırmalar, otofaji mekanizmasındaki anormalliklerin; kanser, inflamatuvar patolojiler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da gelişim ve progresyonunda rol oynadığını göstermektedir (Yang ve Klionsky 2010).

Otofaji ve kanser arasında tümörün doğasına, evresine ve koşullarına bağlı olan karmaşık bir ilişki vardır. Otofaji, tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak fonksiyon gösterebildiği gibi tümörü destekleyici olarak da davranabilir. Bu ilişkinin aydınlatılması için çok sayıda genetik çalışma yapılmıştır ve bunların sonucunda çalışılan çeşitli

kanser türlerinde otofaji-ilişkili genlerde mutasyonlar saptanmıştır. Yapılan çalışmalar otofajinin, inflamasyonu, hücre proliferasyonunu ve hücre hasar birikimini inhibe ederek tümör gelişimini sınırlandırdığını ancak diğer taraftan çevresel değişimlere ve anti-kanser uygulamalara maruz kalan belirli tümörlerin gelişimini desteklediğini göstermektedir (Botti vd 2006, Levine 2007, Morselli vd 2009).

Transkripsiyon faktörü olan NF κ B ailesi; hücre proliferasyonunda, sağkalımında, gelişiminde ve yaşlanmasında rol oynayan çeşitli genlerin ekspresyonunu regüle eder. Ayrıca bu transkripsiyon faktörleri inflamasyonun, doğal ve adaptif immün yanıtın düzenlenmesinde de önemli role sahiptir (Bonizzi ve Karin 2004, Perkins ve Gilmore 2006, Hayden ve Ghosh 2011). Normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde NF κ B yolağının ekstra düzenleyicileri vardır. Kanser hücrelerinde NF κ B aktivitesi; Ras, EGF reseptörü, mTOR, Akt, STAT3 ve p53 gibi birçok tümör düzenleyici yolağın kontrolü altındadır (Hayden ve Ghosh 2008, Chaturvedi vd 2010). Bu yüzden farklı sinyal yolları NF κ B üzerinde kesişir ve uygun hücre sel cevabı sağlamak için aktivatörler ve represörler arasında kurulan denge aracılığı ile sinyal iletimini sıkı şekilde düzenlerler. NF κ B yolağındaki herhangi bir düzensizlik inflamatuvar hastalıklar ve kanseri de kapsayan çeşitli hastalıkların gelişimine ve progresyonuna neden olabilmektedir (Chaturvedi vd 2010). NF κ B-aracılı apoptozdan kaçış, tümör gelişimini destekleyen kilit olaylardan biridir ve kanser terapilerine karşı direnç gelişiminde öncelikli rol oynar.

NF κ B aile üyeleri, otofajinin indüksiyonuna sebep olan sinyal yollarını ya aktive ya da inhibe edebilir ve ayrıca otofaji düzenleyici genlerin transkripsiyonlarını da regüle edebilir. NF κ B ve otofajinin regülasyonunda rol oynayan yollar, tümörögenезin kontrolünde rol oynayan çoklu yollarla çakıştığı için bu yolların detaylı moleküler analizleri tümör ilişkili yanıtlardaki rollerinin daha iyi anlaşılması için gereklidir. Kullanımda olan birçok anti-kanser terapisinin de hem otofajiyi hem de NF κ B yollarını etkilediği bilinmektedir. NF κ B yolları ve otofaji arasındaki fonksiyonel ilişkinin aydınlatması ile kombine terapiler kullanılarak kanser tedavilerinin etkinliğinin artırılıp yeni stratejiler geliştirilmesine ayrıca bu ilişkide yer aldığı belirlenen moleküllerin marker olarak klinik kullanımına katkı sağlanabilecektir. Ancak literatürde, Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanselerinde NF κ B yollarının otofajiyi nasıl düzenlediği ve bu düzenlemenin ayrıntılı mekanizmasına ilişkin bilgi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda da bu mekanizmaların aydınlatılması gerektiğine vurgu yapılmaktadır.

1.1. Amaç

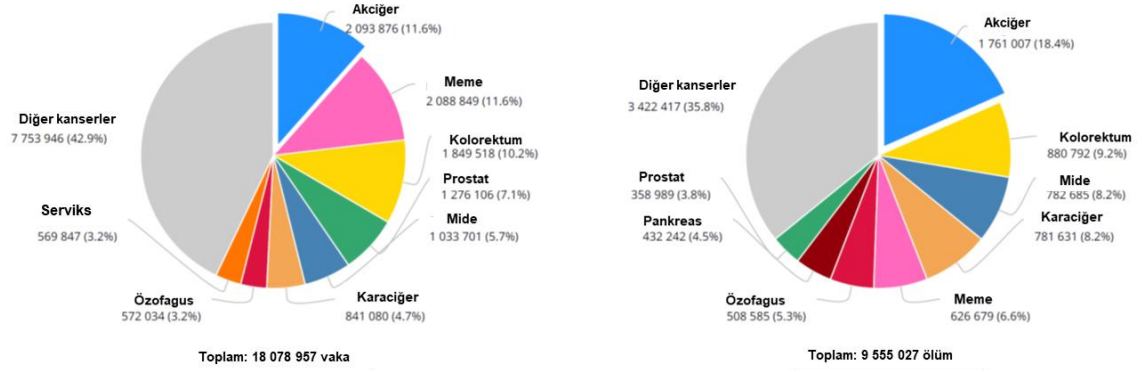
Bu tez çalışmasının amacı; Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde transkripsiyon faktörü NF κ B ve otofaji mekanizması arasındaki olası fonksiyonel ilişkiyi saptamak ve bu ilişkide rol oynayan olası genleri tespit etmektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

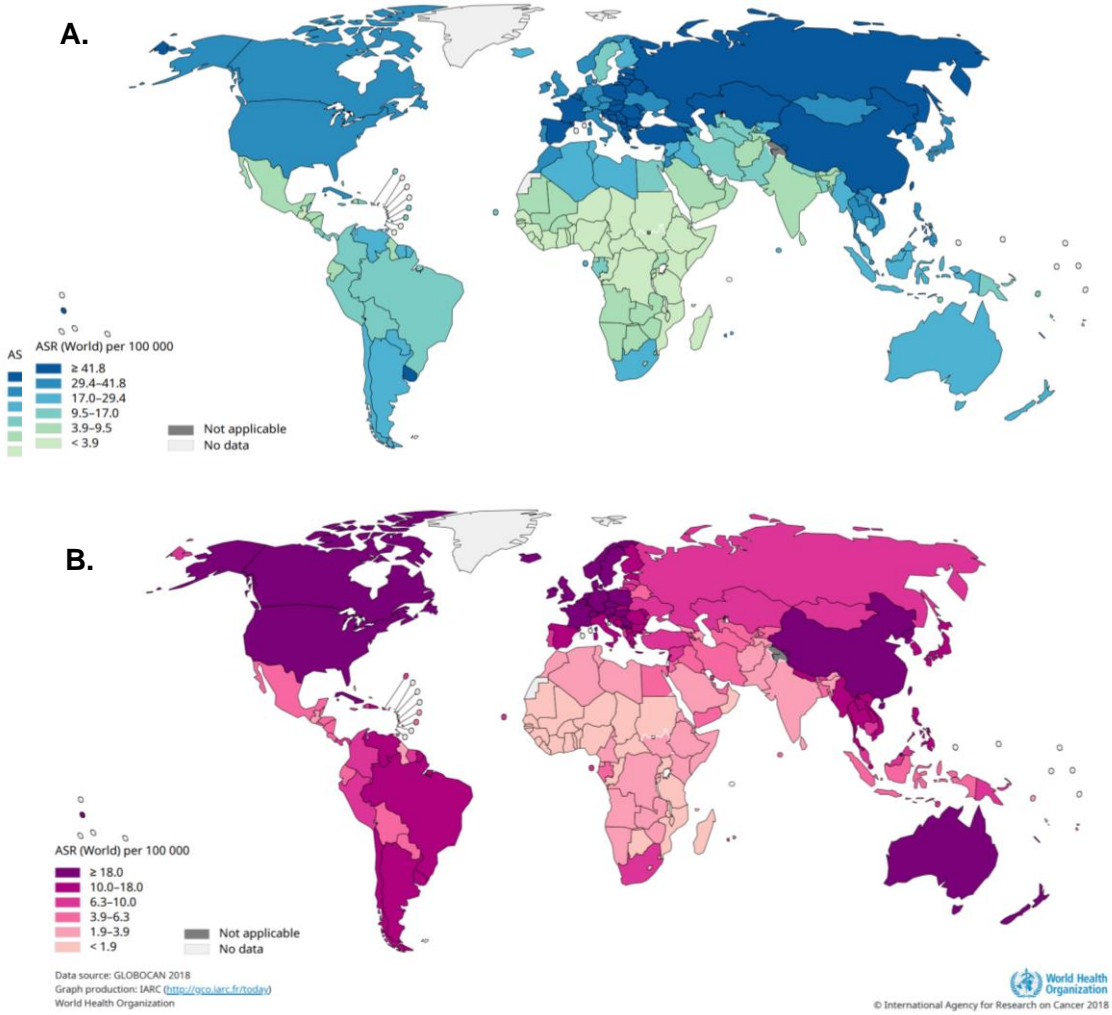
2.1. Akciğer Kanseri

2.1.1. Epidemiyolojisi

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın 2018 yılındaki tahmini verileri Dünya genelinde 18,1 milyon kanser vakasının teşhis edildiğini ve bunların 9,6 milyonunun ölümle sonuçlandığını ortaya koymaktadır (Bray vd 2018). Bu verilerin oluşturulmasında değerlendirilen 36 kanser çeşidinden biri olan akciğer kanseri, Dünya genelinde erkekler arasında en sık, kadınlar arasında ise 3. en sık görülen kanser türüdür. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, 2018 yılında 2,09 milyon akciğer kanseri vakası teşhis edilmiş ve bunların 1,76 milyonu ölümle sonuçlanmıştır (WEB_2). Dünyanın 20 farklı bölgesinden elde edilen veriler ışığında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından oluşturulan GLOBOCAN 2018 tahmini verilerine göre akciğer kanseri tüm kanser vakalarının %11,6'sını oluşturmaktadır. Aynı veriler kanser nedeni ölümlerin %18,4'ünden akciğer kanserinin sorumlu olduğunu, bunu %9,2 oranla kolorektum kanserinin takip ettiğini ortaya koymaktadır (Şekil 2.1) (Bray vd 2018). Bu da demek oluyor ki 5 kanser nedeni ölümden 1'i akciğer kanseri sebebiyle gerçekleşmektedir. Şekil 2.2'de Dünya genelinde erkekler ve kadınlarda akciğer kanseri görülme oranları yaşa göre standardize edilerek gösterilmiştir. Erkekler arasında akciğer kanserine bağlı ölümlerin en sık görüldüğü ülkeler Doğu Avrupa (özellikle Bulgaristan), Doğu Asya (Çin), Kuzey Afrika ülkeleri ve Güneydoğu Asya'nın belirli ülkeleri (Myanmar, Filipinler ve Endonezya) iken kadınlarda akciğer kanserine bağlı ölümler en sık Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa (özellikle Danimarka ve Hollanda)' da görülür.

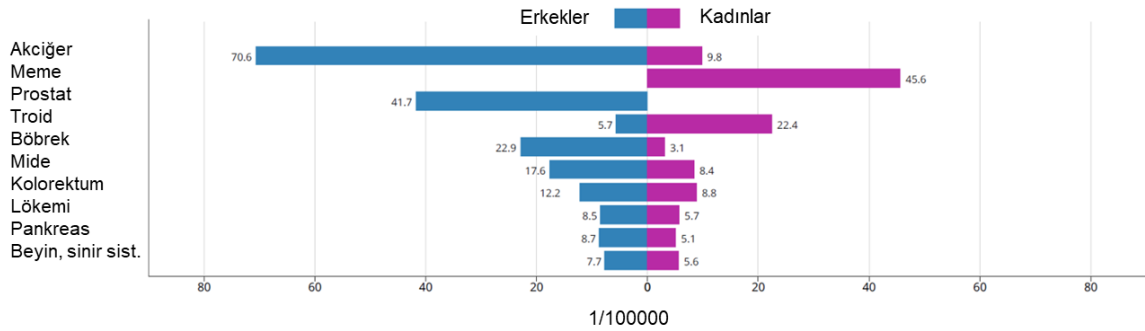


Şekil 2.1 2018 tahmini verilerine göre Dünya genelinde kanser çeşitlerinin görülme sıklığı ve kanser nedenli ölüm sıklığı (WEB_2 kaynağından modifiye edilmiştir.)



Şekil 2.2 Akciğer kanserinin uluslararası düzeyde erkek (A) ve kadınlarda (B) yaşa göre standardize edilen 100.000 kişide görülme sıklığı (GLOBOCAN 2018'den alıntılanmıştır).

Ülkemizde, Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre 2018 yılında kansere bağlı ölümler, dolaşım sistemi hastalıklarına bağlı ölümlerden sonra 2. sırada yer alan ölüm nedenidir. Aynı verilere göre 2018 yılında, 81.129 kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir ve bunların 25.017'si yani %30,8'i gırtlak, soluk borusu tümörleri ve akciğer kanserleri nedeniyledir. Bu ölümlerin 23.674'ünü 65-74 yaş aralığındaki kişiler oluşturmuştur. Kansere bağlı ölümlerin en yüksek olduğu ilk 5 ilimiz ise sırasıyla şu şekildedir: %24,6 ile Kırklareli, %23,8 ile İstanbul, %23,2 ile Van ve Eskişehir, %23 ile Edirne. Akciğer kanser ölümlerini %8,2 oranla lenfomalara bağlı ölümler ve yine %8,2 oranla mide kanserleri takip eder (WEB_3). Şekil 2.3'te Dünya Sağlık Örgütü'nün, GLOBOCAN 2018 verilerine dayanarak oluşturduğu Türkiye'deki kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen kanser türleri gösterilmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın 2018 yılı tahmini verilerine göre her cinsiyet için akciğer kanseri görülme sıklığına göre sıralandığında 25 ülke arasında Türkiye, 36.9/100.000 insidans ile 9. sırada yer alır (Tablo 2.1). Aynı verilere göre 25 ülke arasında ülkemiz, erkeklerde 70.6/100.000 insidans ile 3. sırada yer almakta iken kadınlarda ilk 25 ülke arasında yer almamaktadır.



Şekil 2.3 Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı Türkiye verilerine göre erkeklerde ve kadınlarda gözlenen kanser türlerinin insidansı (WEB_2 kaynağından modifiye edilmiştir)

Tablo 2.1 IARC'nın 2018 yılı tahmini verilerine göre ilk 25 ülkenin yaşa göre standardize edilmiş akciğer kanser insidansları (WEB_4 kaynağından alıntılanmıştır)

Sıra	Ülkeler	kişi/100bin
1	Bulgaristan	56.7
2	Sırbistan	49.8
3	Yeni Kaledonya (Fransa)	42.3
4	Yunanistan	40.5
5	Fransız Polinezyası	39.8
6	Montenegro	39.7
7	Belçika	39.0
8	Guam	37.9
9	Türkiye	36.9
10	Danimarka	36.6
11	Polonya	36.5
12	Kuzey Kore	36.2
13=	Bonsa Hersek	36.1
13=	Fransa	36.1
15	Samoa	35.4
16=	Çin	35.1
16=	Amerika	35.1
18	Makedonya	34.1
19=	Almanya	33.7
19=	İrlanda	33.7
21	Hollanda	33.3
22	Slovenya	32.9
23	Hırvatistan	32.5
24	İngiltere	32.5
25	Slovakya	31.2

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018 yılı tahmini verilerinde 18,1 milyon yeni teşhis alan kanser vakası sayısının 2040 yılında 29,5 milyon olması ve bu vakaların da 16.388.459'unun ölümle sonuçlanması öngörülmektedir. Bu tahminler, Türkiye için ise 368.674 yeni kanser teşhisi ve bunların da 223.609'unun ölümle sonuçlanacağı yönündedir. Akciğer kanserinin ise Dünya genelinde 2040 yılında 3.104.704 ölümden sorumlu olacağı, Türkiye'de ise yaklaşık 66.000 yeni vakadan 64.258'ünün ölümle sonuçlanabileceği tahmin edilmektedir.

Tüm bu veriler, diğer kanser türleri gibi akciğer kanserinin de insanlık tarihinde geçmişten geleceğe en önemli hayati tehlikelerden biri olarak yer aldığını gözler önüne sermektedir.

2.1.2. Etiyolojisi

Akciğer kanserinin gelişiminde diğer kanser türlerinde olduğu gibi tek bir sebep rol oynamamaktadır. Sigara kullanımının, akciğer kanseri gelişiminde rol oynayan en büyük faktör olduğu 50 yılı aşkın süredir bilinmekle birlikte çok farklı çevresel ve genetik faktörler, cinsiyet farkı, coğrafi özelliklerden kaynaklı farklılıklar akciğer kanserinin etiolojisinde yer alır. Bu faktörlerin detaylıca tespit edilmesi akciğer kanserinin önlenmesinde ve akciğer kanserine bağlı ölümlerin azaltılmasında önem taşır.

2.1.2.1. Tütün ve sigara tüketimi

1950'lerde Amerika'da yapılan iki farklı vaka çalışmasıyla sigara kullanımı ile akciğer kanseri arasındaki ilişkinin ilk kanıtları ortaya konmaya başlamıştır. Bu çalışmalar sonucunda araştırmacılar uzun yıllar yoğun şekilde sigara kullanan erkeklerde %96,5 oranında akciğer kanseri görüldüğü sonucuna varmışlardır (Doll ve Hill 1950, Wynder vd 1951). 2004 yılında Amerikan Genel Cerrahi Derneği, bu sonuçları destekleyerek sigara kullanımının majör akciğer kanser sebebi olduğunu vurgulamıştır.

Sigara dumanı aerosol gaz bileşiminden ve partiküllerden oluşan bir komplekstir. Sigara bağımlılığına neden olan en öncelikli bileşen nikotindir. Katran ise nikotin ve suyun birleşimi sonrası sigara dumanından arta kalan total partikülleri içeren maddedir (Hoffmann vd 1997). Katran maruziyeti akciğer kanserine sebep olan asıl faktör olarak görülmektedir. Bunun yanında polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), aromatik aminler, N-nitrozaminleri kapsayan birçok potansiyel karsinogenezler ve benzen, vinil klorid, arsenik ve krom gibi diğer organik ve inorganik bileşikler sigara dumanında yer alan 4000 farklı kimyasal içerikten bazılarıdır (Dela Cruz vd 2013). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı sigara dumanında en az 50 farklı karsinogenez tanımlamıştır (Smith CJ vd 2000). Özellikle akciğer kanseriyle ilişkili olduğu düşünülen ajanlar tütün-spesifik N-nitrozaminlerdir (TSNA'lar). Bunlar tütün ve duman oluşumu sırasında nikotinin nitrozasyonu ile oluşur. TSNA'lar tütün dumanının solunumuyla doğrudan akciğere geçer ve sistematik olarak absorbe edilerek pulmoner dolaşıma dağıtılır. Sigara dumanının derin nefesle çekilmesi bu dumanın majör bronşların yanısıra periferaldeki, koruyucu epitelyumdan yoksun bronşları da etkilemesine neden olur ve bu da akciğer kanserinin indüklenmesi ile ilişkilidir (Wynder ve Hoffmann 1994). 8 farklı TSNA belirlenmiştir ve bunlardan 4-metilnitrozamin-l(3-piridil)-l-bütanon (NNK), akciğer kanseriyle ilişkisi hayvan deneyleriyle kanıtlanmış bir karsinojendir.

NNK, DNA'ya kovalent bağlanabilir ve DNA tamir mekanizmaları bu bileşikleri uzaklaştırarak normal DNA'yı tekrar düzenleyebilir ya da hasarlı DNA'ya sahip olan hücreler apoptoza gidebilir. Ancak bu tamir mekanizmalarında ve apoptotik yollarda meydana gelen anormallikler kalıcı mutasyonların oluşmasına neden olur. Ayrıca NNK, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerle ilişkili sinyal yollarını aktive ederek kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve tümörogeneze yola açabilir (Akopyan ve Bonavida 2006). NNK'lar K-ras onkogeninin aktivasyonuna neden olan DNA mutasyonlarıyla ilişkilidir (Hoffmann vd 1993). K-ras onkogen aktivasyonu insan akciğer kanserlerinin %24'ünde tespit edilmiştir ve eskiden sigara kullanmış akciğer kanser hastalarında da varlığını devam ettirdiği gözlenmiştir (Belinsky vd 1989, Rodenhuis ve Slebos 1992). Bu da sigara kullanımını bırakmanın mutasyonları geri çevirmediğini göstermekte ve sigara kullanımı uzun yıllar bırakılsa dahi bu kişilerde gözlenen yüksek akciğer kanseri riskini açıklamaktadır. Yine sigara dumanındaki bir bileşen olan benzopiren metaboliti bir tümör baskılayıcı gen olan p53 geninde mutasyonlara sebep olabilir ve p53 mutasyonları akciğer kanserlerinin %60'ında gözlenir (Deninssenko vd 1996). Yapılan çalışmalar 9 sigara kullanıcısından 1'inde akciğer kanserinin gelişebileceği yönünde sonuçlar sunmuştur (Jemal vd 2005). Hayatı boyunca sigara kullanmamış bireylere kıyasla uzun süreli sigara kullanıcılarında akciğer kanseri görülme olasılığı 10 ile 30 kat arasında artış gösterir (Mattson vd 1987). Bu risk sigara tüketiminin miktarı, sigara kullanımına başlama yaşı, duman inhalasyonunun derecesi, sigaranın nikotin ve katran içeriği ve sigaranın filtre özellikleri gibi etkenlerle orantılıdır. Ancak kesin olan bir şey varsa o da sigara kullanımının, akciğer kanserine sebep olan faktörler arasında yer alan kişiye bağlı değiştirilebilir faktör olmasıdır (Mattson vd 1987, Harris vd 2004). Dünya genelindeki kansere bağlı ölümlerin %20'sinin tütün kullanımının engellenmesiyle önlenilebileceği tahmin edilmektedir (Pisani vd 2002). Ancak sigara kullanıcılarının %20'sinden daha azında akciğer kanserinin gelişmesi çevresel faktörlerin ve genetik yatkınlığın da akciğer kanseri tümörogenezinde rol oynadığını göstermektedir (Dela Cruz vd 2013).

Amerika'da yapılan bir çalışma akciğer kanseri teşhisi alan kadınların %19'unun erkeklerin ise %9'unun hayatları boyunca sigara içmediğini söylemektedir (Wakelee vd 2007). Çalışmalar hiç sigara içmeyen kişilerde akciğer kanseri görülme olasılığının yıllar içerisinde anlamlı olarak arttığını göstermektedir (Harris vd 2004, Zell vd 2005, Yano vd 2008). Hiç sigara içmeyen popülasyonda akciğer kanseri görülme sıklığı kadınlarda erkeklere oranla daha yüksektir ve sigara içmeyenlerde görülen akciğer kanseri Asya kıtasında daha yaygındır. Ayrıca akciğer kanserinin histolojik tiplerinin sigara kullanımıyla

ilişkisi farklılık göstermektedir. Örneğin KHAK ve skuamoz hücre karsinoma için sigara kullanımı arasında güçlü bir ilişki varken, adenokarsinoma insidansı, sigara içmeyen kişilerde sigara kullananlara kıyasla daha yüksektir (%62-sigara kullanmayan %18-sigara kullanan, 5155 kişide (Sun vd 2007) / %53-sigara kullanmayan, %19-sigara kullanan 21.853 kişide (Gabrielson 2006)). Sigara kullanmayan popülasyonda gözlenen akciğer kanserlerinin risk faktörleri olarak pasif içicilik, radon maruziyeti, hava kirliliği, asbest ve arsenik, ailede akciğer kanseri öyküsü ve genetik faktörler gösterilmektedir. Çalışmalar, özellikle Asyalılarda sigara içmeyenlerde görülen adenokarsinomalarda epidermal büyüme faktörü (EGFR) mutasyonlarında artış olduğunu saptamıştır (Pao vd 2004, Kosaka vd 2004, Shigemetsu vd 2005, Rudin vd 2009).

2.1.2.2. Genetik faktörler

Akciğer kanseri gelişiminin tek nedeni sigara kullanımı değildir. Genetik sebepler, sigara kullanımı kadar akciğer kanser gelişiminde rolü olan ve sigara kullanımıyla birlikte insidansı arttırabilen risk faktörleridir. Sigara kullanımına bağlı akciğer kanserlerinde G:C'den T:A'ya transversiyon sıklığı yüksektir (Hollstein vd 1991, Le Calvez vd 2005). Bu yüzden, bu transversiyonları indükleyen ya da önleyen DNA tamir aktiviteleri ve metabolik enzim aktivitesi üzerine yapılan akciğer kanseri yatkınlığıyla ilgili genetik çalışmalar arttırılmıştır (Govindan 2010). Akciğer kanseri için pozitif aile öyküsünün bulunması akciğer kanser gelişiminin 1,7 kat artmasıyla ilişkilidir (Lissowska vd 2010). Irksal farklılıklar, ailesel öykünün bireyde akciğer kanseri gelişimine etkisini değiştirebilir. Siyah ırkta birinci dereceden akrabalarında aile öyküsünün bulunması beyaz ırka kıyasla riski 2 kat arttırır (Cote vd 2005). Genom Çaplı İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS), 5p15, 15q25-26 ve 6q21 kromozom bölgelerinde gözlenen mutasyonları, Avrupalılarda artan akciğer kanser riski ile ilişkilendirmiştir. 5p15 bölgesi telomeraz revers transkriptaz (TERT) enzimini kodlar ve bu enzim normal hücrelerde telomeraz replikasyonunda ve korunmasında rol oynar ve epitel hücre proliferasyonunu düzenler. Bu enzimin, kanser hücrelerinde sürekli ekspresyonu nedeniyle anormal hücre proliferasyonu gerçekleşir (Landi vd 2009). 15q25-26 kromozom bölgesi, 3 adet nikotin asetilkolin reseptör altbirimi kodlayan gen içerir ve bu bölgedeki mutasyonlar hem nikotin bağımlılığı hem de akciğer kanserine yatkınlıkla bağlantılıdır (Thorgeirsson vd 2008). 6p21 kromozom bölgesi G-protein sinyalleşmesini düzenler ve varyantları sigara içmeyenlerde artan risk ile ilişkilendirilmiştir (Yokota vd 2010). 6p21 bölgesi *BAT3* (HLA_B ilişkili transkript 3) ve *MSH5* (mutS homoloğu5) genlerini içeren

bölgedir. BAT3 proteini, bir histon asetiltransferaz olan ve p53 proteinini DNA hasarına yanıt olarak asetilleyen p300 proteini ile kompleks oluşturur. *MSH5* geni ise DNA yanlış eşleşme tamirinde rol oynayan bir genidir (Wang vd 2008, Landi vd 2009). 5p15.33 bölgesi, özellikle en yaygın görülen histolojik tip olan ve sigara kullanımıyla zayıf ilişkili olan akciğer adenokarsinoma riski ile ilişkili bulunmuştur. Bilinmektedir ki kanser, prekürsör hücrelerde gerçekleşen çoklu genetik değişimlerin birikimi sonucunda gelişen bir hastalıktır. Bu yüzden akciğer kanseri tiplerinde gözlenen moleküler yolak benzerlikleri ve farklılıklarının anlaşılması önem taşımaktadır. Hücre büyümesi ile ilgili işlevleri olan bazı genlerde dış etkenlerle (radyasyon, kimyasal maddeler, virüsler) değişiklik meydana gelerek “onkogen” haline gelmesi karsinogenezde önemlidir. Bu onkogenlerin en önemli grupları “myc” (C-myc, L-myc, N-myc) ve “ras” (K-ras, H-ras, N-ras) aileleridir. Buna karşılık bazı tümör baskılayıcı genlerde de (*retinoblastoma*(*RB*) ve *p53* geni) kanser hastalarında mutasyon saptanmıştır. Genetik ve epigenetik değişimler de tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna, onkogenlerin ise aktivasyonuna neden olur. Tümörlerde meydana gelen mutasyonlar genellikle ErbB protein ailesi (EGFR/HER1-4) ve GTPaz Kristen rat sarkoma virüs (*K-ras*) geninin rol oynadığı hücre sinyal yollarında gözlenir (Herbst vd 2008). *myc*, *p53*, *PTEN* ve *PTPRD* genleri akciğer kanser türleri arasında yaygınlıkla değişime uğramıştır. *RB*, özgün olarak küçük hücreli akciğer kanserlerinde inaktive edilirken *p16* adenokarsinoma ve skuamoz akciğer kanserlerinde inaktivedir. K-ras, LKB1, EGFR ve ALK spesifik olarak adenokarsinomalarda mutasyona uğramıştır. Hatta adenokarsinomalar bu mutasyonlardan hangisini taşıdığına göre de KRAS-tip, EGFR-tip, ALK-tip ve non-KRAS/EGFR/ALK-tip olarak alt tiplere ayrılır (Travis vd 2004, Subramanian ve Govindan 2008, Govindan 2010). EGFR-tip, Asyalılarda (%30-50) sıklıkla görülen adenokarsinomadır ve Asyalılarda görülme sıklığı, Amerikalı ve Avrupalılarda (%10-20) görülme sıklığından daha yüksektir. Oysa KRAS-tip, Amerika ve Avrupalılarda (%20-40), Asyalılardan (%10) daha sık, ALK-tip ise her popülasyonda yaklaşık %5 oranındanda görülür. Bu da akciğer kanser gelişiminde etnik ve coğrafik farklılıkların etkisini göstermektedir.

2.1.2.3. Yaş, cinsiyet, ırksal ve etnik faktörler

Gelişmiş ülkelerdeki çoğu popülasyonda ortalama yaşam süresi uzadığı için kanserin görüldüğü ortalama yaş aralığı da artmıştır. 65 yaş ve üstü insanlar arasında sigara kullanım yaygınlığı (%9,3), 18-24 yaş (%21,4), 25-44 yaş (%23,7) ve 45-64 yaş (%22,6) aralığındaki kişilere kıyasla daha fazladır. Akciğer kanserli hastaların %65'i, 65 yaş üstü, %31,1'i 65-74

yaş aralığında, %29'u 75-84 yaş aralığında ve %8,3'ü 85 yaş ve üstündedir (Dube vd 2009, Dela Cruz vd 2011). Teşhis sırasındaki ortalama yaş ise 70 üstüdür.

1980'lerin sonunda kadınlarda, akciğer kanserine bağlı ölüm oranları meme kanserine bağlı ölüm oranlarını geride bırakmıştı (Siegel vd 2011). 1950'den bu yana kadınlarda akciğer kanseri mortalitesi %600'den fazla artış göstermiştir. Amerika'da, kadınlarda sigara kullanım oranı 1930-1960 yılları arasında artmış ve bu artıştan 20 yıl sonra akciğer kanserli kadın sayısında artış gözlenmiştir (Weir vd 2003, Thomas vd 2005). Sigara kullanımı 1920'li yıllarda doğan erkekler arasında 2. Dünya Savaşı sırasında zirve yapmıştır. 10 yıl sonra ise 1930'lu yıllarda doğan kadınlar arasında sigara kullanımı en yüksek oranlara ulaşmıştır. Sigara kullanımı erkeklerde (%23,1) kadınlara (%18,3) kıyasla daha düşüktür ancak bu fark gitgide kapanmaktadır. Neyse ki 2005 yılı verilerinde kadınlardaki akciğer kanserine bağlı ölümlerin %0,2'lik bir artış ile sabitlenmeye başladığı gözlenmiştir (Jemal vd 2008). 1997-2006 yılları arası verilerin analiz sonuçlarına göre akciğer kanser mortalitesi erkeklerde yılda 74,08/100.000 iken kadınlarda bu oran yılda 40,81/100.000'dir (Cook vd 2011). Cinsiyetler arasındaki bu farkların, nikotin metabolizmasındaki, metabolik aktivasyondaki ve karsinogenlerin detoksifikasyonundaki cinsiyet ile ilişkili farklılıklar nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Örneğin, *sitokrom P450* tarafından plazma nikotin temizliğinde cinsiyet farkının etki ettiği raporlanmıştır (Dela Cruz vd 2011). Ryberg ve Lindahl (1982), akciğer kanserli kadınlarda DNA'ya kovalent bağlanan kimyasalların erkeklere oranla daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu tür çalışmalar kadınlarda düşük yoğunlukta sigara maruziyetinde akciğer kanseri gelişimine yatkınlığı açıklamaktadır. Ayrıca hormonal etkenler de bu yatkınlığı destekleyebilir. Bir vaka kontrol çalışması östrojen replasman tedavisinin artan adenokarsinoma riski ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir (Taioli vd 1994). Bunun aksine 40 yaş ve altında görülen erken menapoz adenokarsinoma riskini düşürür. Akciğer kanseri sigara kullanmayan kadınlar arasında sigara kullanan erkeklere göre daha sıklıkla gözlenir (Wynder ve Graham 1950).

Akciğer kanser insidansının siyahlar, Hawaii yerlileri ve diğer Polinezyalılar arasında önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ancak Japon, Meksika, Porto Riko kökenli Amerikalılar, Orta Amerika ve diğer Latin Amerikalılar arasında Amerikalı beyaz ırktan daha düşük olduğu gösterilmiştir (Menck ve Henderson 1982). Bu farklılıkların başlangıçta, farklı etnik ve irksal gruplar arasında sigara içme düzenindeki değişiklikler olduğu düşünülmüştür.

2.1.2.4. Çevresel hava kirliliği ve mesleki faktörler

Son yıllarda hızla büyümeye devam eden küreselleşme ve sanayileşme, hava kirliliğinin Dünya çapında artarak ilerleyen bir sorun olarak devam etmesine sebep olmaktadır. Düşük düzeyde hava kirliliğine uzun yıllar maruz kalmanın akciğer kanser riski üzerindeki etkilerinin ölçülmesi zordur. Belirli kirleticilerin tespitinde kullanılan analitik metodların geliştirilmesi, havadaki partiküllerin etkilerinin çalışılması konusunda araştırmacılara yardımcı olmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde hava kirliliği daha da kötüleşmekte, zararlı partiküllerin, sülfür dioksit ve dumanın en yüksek konsantrasyonları bu ülkelerde ölçülmektedir. Dış mekandaki hava kirliliğinin akciğer kanser riskini arttırdığı düşünülmektedir. Kentsel ve kırsal karşılaştırmalar yapan bir çalışma, kentsel etkenlerin akciğer kanser mortalitesi üzerinde %10-40 oranında artan risk ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Pershagen 1990). Başka bir çalışmada ise 21 ile 30 yıl boyunca $29,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nitrik oksite (trafik havası ölçümünde kullanılan ölçüt) maruz kalan bireylerde, $12,8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nitrik oksite maruz kalan bireylere kıyasla akciğer kanser riskinin 1,44 kat arttığı gösterilmiştir (Nyberg vd 2000). İnce partiküle ve sülfür oksite bağlı kirlilik akciğer kanser riskini %8 arttırır (Pope vd 2002). Birçok olası karsinogenik bileşenin, çeşitli fosil yakıt ürünlerinden kaynaklı bileşenlerden yayıldığı düşünülmektedir. Bu karsinogenlere maruziyete sebep olan meslek dallarında çalışanlarda akciğer kanser riski artmaktadır. İki bağımsız meta-analiz sonuçlarına göre dizel egzozuna mesleki maruziyet (kamyon taşımacılığı çalışanları) %30-50 oranında artan akciğer kanser riskiyle ilişkilidir (Bhatia vd 1998, Lipsett ve Campelman 1999).

Birçok çalışma alanında karsinogen olarak sınıflandırılan maddeler yoğun olarak bulunmaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, klorometil eterleri, kromiyum, nikel, radon, silika ve vinil kloridi karsinogen olarak tanımlamıştır. Bu ajanlara maruz kalan mesleklerin başında, metal eritme işleri, böcek ilaçları üreticiliği, madencilik, asbest madencililiği ve asbest tekstil üreticiliği, çimento üretimi, inşaat ve yalıtım malzemeleri üreticiliği, seramik, cam ve granit endüstrisi gelir. Bu ajanların, Dünya genelindeki akciğer kanserine bağlı ölümlerin erkeklerde %10'undan, kadınlarda %5'inden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Driscoll vd 2005, Fingerhut vd 2006). Başka bir çalışma sonucuna göre 17.000 akciğer kanser vakasından 6.800'ü işyerlerinde kimyasal maruziyetine bağlıdır (Steeland vd 2003, Steeland vd 2003).

2.1.2.5. Enfeksiyon

Enfeksiyonların akciğer kanserinin sebepleri arasında yer alması hala daha tartışmalı bir konudur. Onkogenik virüsler akciğer kanseri sebebi olarak gösterilir. Yapılan ilk çalışmalar bir retrovirüsünün koyunlarda pulmoner adenomatozise sebep olduğunu ve bu hastalığında insan bronşial alveolar karsinoma ile benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Fakat bu iki hastalık arasındaki bağlantıyı gösteren ve virüsün insanda akciğer adenokarsinomaya yol açabileceğini gösteren yeterli kanıt yoktur (Mornex vd 2003). Daha sonra yapılan çalışmalar insan papilomavirüsünün (HPV) diğer dokularda karsinomayla ilişkili olduğunu göstermiştir. HPV'nin bronşial skuamoz hücre lezyonlarındaki olası rolü ilk defa Syrjanen tarafından, bronşial karsinomlardaki epitel değişimleri kadın genital sistemine yerleşen HPV virüsünün sebep olduğu lezyonlara benzetmesiyle ortaya konmuştur (Syrjanen 2002). HPV DNA'sı skuamoz hücre karsinomalı dokuda tespit edilmiştir. Ancak farklı etnik ve coğrafik bölgelerde yaşayan akciğer kanserli hastalarda HPV enfeksiyon yaygınlığının farklılaşma gösterdiği raporlanmıştır. Örneğin Asyalılarda, özellikle sigara kullanmayanlarda, yüksek yaygınlıkta HPV DNA'sına rastlanılmıştır. Ancak batı Avrupa'da yapılan çalışmalar HPV'nin etiyolojik rolüne dair anlamlı sonuçlar vermemiştir (Syrjanen 2002, Chen vd 2004, Rezazadeh vd 2009). HPV'nin 16 ve 18 serotipleri diğer serotiplere kıyasla akciğer kanseri ile daha ilişkili bulunmuştur. Bu HPV serotiplerindeki E6 ve E7 onkogenlerinin, genetik hastalıklara oldukça yatkın olan insan trake epitel hücrelerini immortalize ettikleri gösterilmiştir (Willey vd 1991). Burkitt lenfomalarla ve nazofarengeal karsinomlarla ilişkili olan Epstein-Barr virüsünün nadiren de olsa akciğer kanserinin nadir bir türü olan lenfoepitelyoma-benzeri karsinoma ile güçlü ilişkisi olduğu Asyalı hastalarda saptanmıştır. Fakat bu ilişki Batılı popülasyonda gösterilememiştir (Castro vd 2001). 2008 yılında yapılan bir çalışmada *Torque teno* adlı virüse ait DNA, akciğer kanserli idiopatik pulmoner fibrozis hastalarında yüksek düzeylerde tespit edilmiştir ancak idiopatik pulmoner fibrozis hastalarında akciğer kanser gelişimi ile ilişkilendirmek ve klinik anlamını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Bando vd 2008). *Chlamydia pneumonia* bakterisinin, özellikle sigara dumanına maruz kalan bireylerde akut solunum enfeksiyonlarının yaygın bir sebebi olduğu ve akciğer kanseri karsinogenezinde de rol oynayabileceği ortaya konmuştur (Kirk vd 2007). Bu bakterinin reaktif oksijen türleri oluşumuna bağlı DNA hasarı ve artan mutasyon riskine neden olduğu bunların da artan akciğer kanser riskiyle ilişkili olduğu bazı araştırmacılar tarafından hipotez edilmiştir. Ayrıca bu gibi enfeksiyonlar akciğer kanser gelişiminde sigara kullanımıyla sinerjistik olarak rol oynayabilir (Dela Cruz vd 2013).

Tayvan'da yapılan bir çalışma, tüberküloz hastalarında, akciğer kanseri için 3,3 kat artmış risk olduğunu göstermiştir. 2840 HIV-enfekte hastayla yapılan çalışma, HIV'in akciğer kanser riskini 3,6 kat arttırdığını göstermektedir (Kirk vd 2007). Yapılan çalışmalarla elde edilen tüm kanıtlar, enfeksiyonların akciğer kanseri gelişiminde rol oynayabileceğini gösterse de bu konuda yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.1.2.6. Diyet ve obezite

Akciğer kanserlerinin yaklaşık %30'unda diyetin rolü olduğu düşünülmektedir (Willet ve Trichopoulos 1996). Örneğin; vitamin A, C ve E gibi antioksidanların serumda düşük konsantrasyonda bulunmasının akciğer kanser gelişimi ile ilişkili olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur (Boone vd 1990, Woodson vd 1999). Vitamin A, hem hayvansal (retinol) hem de bitkisel (karotenoid) kaynaklıdır ve sadece bitkisel kaynaklı vitamin A'nın, özellikle β -karotenin, akciğer kanserine karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Buring ve Hennekens 1995). Diyetin kanser gelişimindeki etkisi üzerine yapılan en kapsamlı anket, 1957 yılından itibaren 19 yıl boyunca yaşları 40-55 arası değişen 2000 erkeğin beslenme öyküsü kaydedilerek yapılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre β -karoten alımının akciğer kanser insidansı ile ters orantılı olduğunu göstermiştir (Shekelle vd 1981). Byers ve arkadaşları (1987), yayınlanmış 27 çalışmayı değerlendirerek en düşük miktarda karoten alımı olan bireylerle en yüksek miktarda karoten alan bireyler arasında akciğer kanseri riski açısından %50-100 oranında fark olduğu sonucuna varmışlardır. Ancak bu çalışmaların yanısıra vitamin takviyesinin akciğer kanserini baskılamadığını aksine bazı durumlarda riski arttırdığını gösteren büyük ölçekte katılımcı ile yapılan çalışmalar da mevcuttur (Omenn vd 1996, Hennekens vd 1996, Goodman vd 2004). Bunun yanında, magnezyum, çinko, bakır ve demir gibi belirli minerallerin düşük alımlarının artan akciğer kanseri ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar olsa da daha sonrasında yapılan çalışmalarda toplam mineral alımı ile akciğer kanser riski arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir (Mahabir vd 2007, Mahabir vd 2010). Turpgillerden olan brokoli ve lahanaya gibi izotiyosiyanatlardan zengin sebzelerin tüketimi akciğer kanserine karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Brennan vd 2005). Flavonoid içeren dut, turuğgiller, çay, bitter çikolata ve kırmızı şarap gibi yiyecek ve içeceklerin metabolitleri antioksidant ve antiproliferatif etkiye sahiptir. Bir çalışmada akciğer kanser riskinin en yüksek total flavonoid alımı yapan erkeklerde daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Mursu vd 2008).

Son yıllarda Dünya genelindeki obezite yaygınlığı nedeniyle akciğer kanser riski üzerine aşırı kilolu olmanın etkisinden bahsetmek bu başlık altında anlamlı olacaktır. Gelişmiş ülkelerde yetişkin nüfusun beşte biri obez olarak nitelendirilebilir. Aşırı vücut ağırlığı endometriyal, meme ve kolorektal kanserlerle ilişkilendirilmiş ancak akciğer kanseri ile ilişkilendirilmemiştir. Renehan ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir meta-analiz sonuçları vücut kitle indeksi ile akciğer kanser riski arasında ters ilişki olduğu hata obezitenin akciğer kanseri üzerinde koruyucu etkisi olabileceği sonucunu raporlamıştır. Ancak sigara kullanımı göz önüne alınmadan vücut kitle indeksi ile akciğer kanserini ilişkilendirmek anlamlı olmayabilir. Çünkü sigara içicilerinin vücut kitle indeksi, içmeyen aynı cinsiyet ve yaştaki sigara kullanmayan kişilere kıyasla daha düşüktür (Whitlock vd 2009). Hiç sigara kullanmamış bireylerde vücut kitle indeksi ile akciğer kanseri riski doğru orantılı iken devamlı sigara kullanan kişilerde bu ilişki ters orantılıdır (Kabat vd 2007). Diğer bir çalışmada ise sigara içenlerde bel çevresi kalınlığı ile akciğer kanser riskinin doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (Kabat vd 2008).

2.1.3. Histolojik sınıflandırması

Akciğer kanseri, geç tanı ve sınırlı tedavi imkanları nedeniyle Dünya çapında kanser nedeni ölümlerin başında gelir. Son yıllarda akciğer kanserinin moleküler profili kapsamlı olarak çalışılmıştır. Bu yeni karakteristikler akciğer kanserinin moleküler patolojisinin anlaşılmasını sağlar. Sorumlu genetik değişimlerin ve olası moleküler hedeflerin tanımlanması, sayısı artan akciğer kanser hastaları için moleküler hedefli terapilerin geliştirilmesi için önem taşımaktadır. Moleküler profilin anlaşılmasındaki bu gelişimler akciğer kanserinin histopatolojik sınıflandırmasını da şekillendirmiştir.

Akciğer kanseri iki ana histolojik grup altında kategorize edilir: Küçük Hücreli Akciğer Karsinoma (KHAK, tüm akciğer kanserlerinin %15'i) ve Küçük Hücre Dışı Akciğer Karsinoma (KHDAK, tüm akciğer kanserlerinin %85'i). Kanıtlar göstermektedir ki akciğer kanser türleri, aynı histolojik alt tipte yer alsa dahi histolojik ve moleküler açıdan heterojen bir hastalıktır. KHAK'lar daha agresif yapıdadır ve çoğu vakada cerrahi olmayan yollarla tedavi yaklaşımında bulunulur oysa KHDAK'lar cerrahi ve yardımcı ilaç tedavilerinin kombinasyonu ile tedavi yaklaşımı tercih edilir. KHDAK'ın kendi içerisindeki çeşitliliği Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 ve 2015 yıllarında sınıflandırmaları alt tipler oluşturarak tekrar düzenlemesine neden oldu. KHDAK'ın majör tipleri adenokarsinoma, skuamöz hücre karsinoma ve büyük hücreli karsinomadır. KHAK nöroendokrin farklılaşması sergileyen diğer

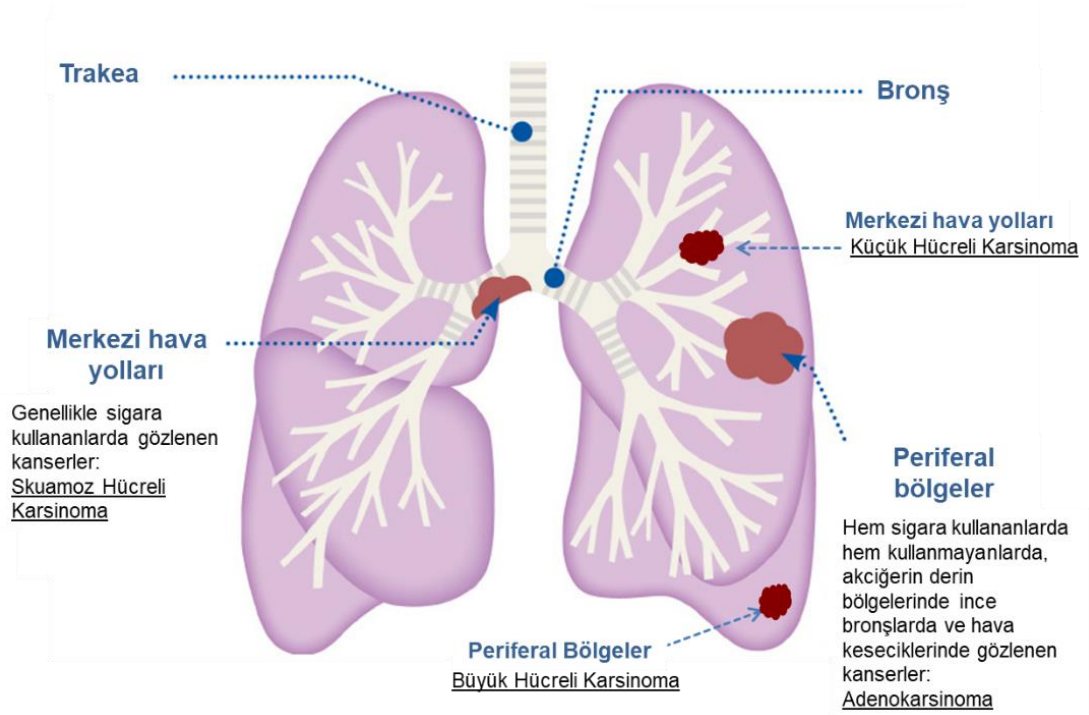
tümör gruplarıdır. Daha detaylı histolojik alt tiplere prognostik önemi olan doku tiplerini tanımlamak için diseksiyon örneklerinde kullanılır.

KHDAK'ların %60'ını oluşturan alt tipi olan adenokarsinoma, en yaygın akciğer kanser tipi olarak tüm akciğer kanserlerinin de %40'ını oluşturur (Lewis vd 2014, Travis vd 2015). Akciğer adenokarsinoma hücreleri genellikle pnömositik belirteçler eksprese eder. Örneğin tiroid transkripsiyon faktörü (TTF-1) ve NapsinA akciğer adenokarsinoma vakalarının %85'inden fazlasında eksprese edilir ve bu yüzden kötü farklılaşmış tümörlerde ya da sınırlı biyopsi materyallerinde adenokarsinoma belirteci olarak kullanılmaktadır. Çoklu gen değişimleri adenokarsinomlarda gözlenebilir ve uygun moleküler hedefli terapiler ile hasta sağkalımı desteklenebilir. Adenokarsinomanın kendi içerisindeki alt tipleri Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 güncellemesi ile oluşturulan akciğer kanserinin histopatolojik sınıflandırmasını gösteren Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

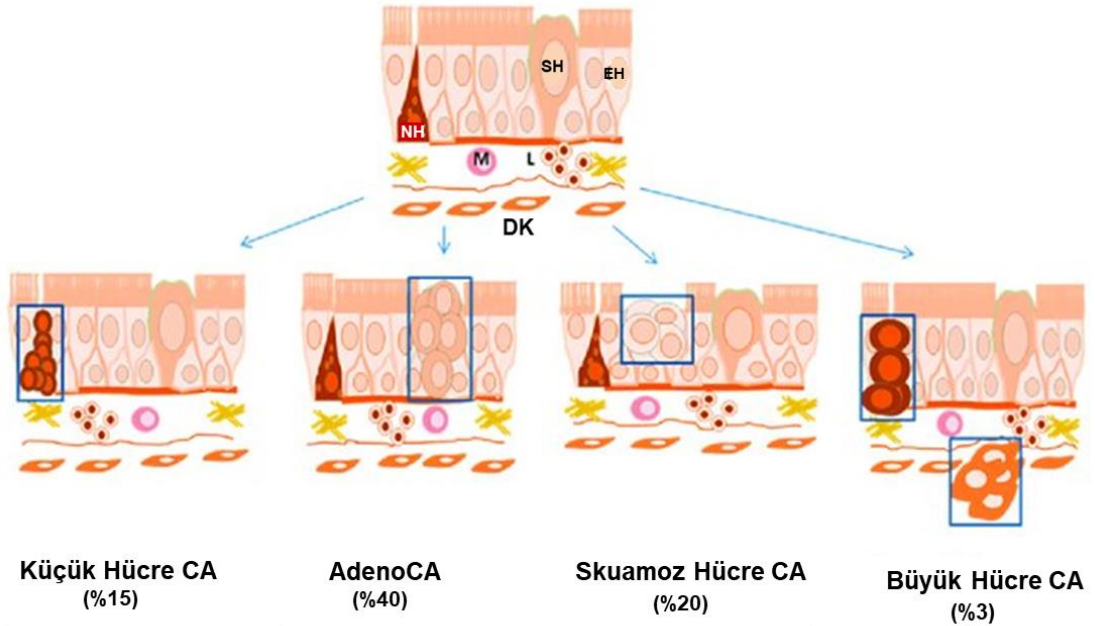
Skuamoz hücre karsinomaları akciğer kanserlerinin %20'sini oluşturur (Lewis vd 2014). Son yıllarda sigara içme alışkanlıklarının değişmesine bağlı olarak insidansı düşüş göstermiştir. Skuamoz hücre karsinomu genellikle akciğerin merkezi kısmında, majör havayolları boyunca ortaya çıkar ve büyük bir alana yayıldığında dokuda delikler oluşturabilir. Mikroskopik değerlendirmede skuamoz hücre karsinomu karakteristik olarak keratinizasyon ve interselüler köprüler sergileyebilir. Tümörün ileri farklılaşmasında morfolojik sınıflandırma yapılamadığında p40, CK5/6, CK5 ve p63 gibi skuamoz hücre belirteçleri kullanılabilir (Conde vd 2013). Skuamoz hücre karsinomalarında sağkalım oranı adenokarsinomalara kıyasla anlamlı olarak daha yüksektir.

Büyük hücre karsinomaları, KHDAK vakalarının azınlığını oluşturur. Büyük hücre karsinomaları, genellikle periferik yerleşimli ve nekrotik görünümündedir. Tümör hücreleri pleomorfik ve veziküler çekirdekli, büyük ve poligonal şekillidir. Büyük hücre karsinomalar tüm akciğer kanserlerinin %3'ünü oluştururlar (Travis vd 2013).

Adenoskuamoz karsinoma Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinin nadir görülen bir tipidir ve tüm akciğer kanserlerinin %5'inden azını oluşturur. Hem adenokarsinoma hem de skuamoz hücre karsinoma bileşenlerini içeren bir hibrit karsinomadır. Diğer Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri tipleri arasında pleomorfik, iğ hücreli ve dev hücre karsinomalar sayılabilir ve akciğer kanserlerinin %3'ünden daha azını oluşturur.



Şekil 2.4 Akciğer kanser türlerinin akciğerde sıklıkla görüldüğü bölgelerin basit şematize gösterimi (WEB_5 internet sitesinden modifiye edilmiştir.)



Şekil 2.5 Akciğer kanserinin basit histolojik sınıflandırılması. NH: Nöroendokrin hücre, SH: Salgı hücresi, EH: Epitelyal hücre, L: Lenfosit, M: Makrofaj, DK: Düz kas hücresi (Zamay vd 2017'den modifiye edilmiştir.)

Tablo 2.2 Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılındaki son güncellemesi ile oluşturulan akciğer kanserinin detaylı histopatolojik sınıflandırılması.

A. EPİTELYAL TÜMÖRLER	
I. Adenokarsinoma	IV. Büyük hücreli karsinom
1. Lepidik adenokarsinoma	V. Adenoskuamöz karsinom
2. Asiner adenokarsinoma	VI. Sarkomatoid karsinom
3. Papiller adenokarsinom	1. Pleomorfik karsinom
4. Mikropapiller adenokarsinom	2. İğsi hücreli karsinom
5. Solid adenokarsinom	3. Dev hücreli
6. İnvaziv müsinöz adenokarsinom	4. Karsinosarkom
— Mikst invaziv müsinöz ve müsin içermeyen adenokarsinom	5. Pulmoner blastom
7. Kolloid adenokarsinom	VII. Tükrük bezi tipi tümörler
8. Fetal adenokarsinom	1. Mukoepidermoid karsinom
9. Minimal invaziv adenokarsinom	2. Adenoid kistik karsinom
— Müsinöz minimal invaziv adenokarsinom	3. Epiteliyal-Myoepiteliyal karsinom
— Non-müsinöz minimal invaziv adenokarsinom	4. Pleomorfik adenom
10. Preinvaziv lezyonlar	VIII. Papillomlar
— Atipik adenomatöz hiperplazi	1. Skuamöz hücreli papillom
— Adenokarsinoma insitu	— Egzofitik Skuamöz hücreli papillom
a. Müsinöz adenokarsinoma insitu	— Endofitik Skuamöz hücreli papillom
b. Non-müsinöz adenokarsinoma insitu	2. Glandüler papillom
II. Skuamöz hücreli karsinom	3. Miks skuamöz hücreli ve glandüler papillom
1. Keratinize skuamöz hücreli karsinom	IX. Adenomlar
2. Non-keratinize skuamöz hücreli karsinom	1. Sklerozan pnomositom
3. Bazaloid skuamöz hücreli karsinom	2. Alveolar adenom
4. Preinvaziv lezyon	3. Papiller adenom
— Skuamöz hücreli karsinoma insitu	4. Musinöz kistadenom
III. Nöroendokrin tümörler	5. Muköz bez adenomu
1. Küçük hücreli karsinom	X. NUT karsinom
— Kombine küçük hücreli karsinom	XI. Lenfoepiteliyoma benzeri karsinom
2. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom	C. LENFOHİSTİOSİTİK TÜMÖRLER
— Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom	I. MALT Tipi Ekstranodal Marjinal Zon B Hücreli Lenfoma
3. Karsinoid tümör	II. Diffüz büyük B hücreli lenfoma
— Tipik karsinoid	III. Lenfomatoid granülo-matozis
— Atipik karsinoid	IV. İntravasküler büyük B hücreli lenfoma
4. Preinvaziv lezyon	V. Pulmoner Langerhans hücreli histiositoz
— Diffüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi	VI. Erdheim-Chester hastalığı
B. MEZENKİMAL TÜMÖRLER	D. EKTOPIK KÖKENLİ TÜMÖRLER
I. Pulmoner hamartom	I. Germ hücreli tümör
II. Kondrom	1. Matür teratom
III. PEComatöz tümörler	2. İmmatür teratom
1. Lenfanjioleiomyomatosis	II. İntrapulmoner timoma
2. Benign PEComa	III. Melanoma
— Şeffaf hücreli tümör	IV. Meningioma
3. Malign PEComa	E. METASTATİK TÜMÖRLER
IV. Konjenital peribronşiyal myofibroblastik tümör	
V. Diffuz pulmoner lenfanjiomatosis	
VI. İnflamatuar myofibroblastik tümör	
VII. Epiteloid hemanjioendoteliyoma	
VIII. Plöropulmoner blastoma	
IX. Sinavyal sarkoma	
X. Pulmoner arteriyal intimal sarkom	
XI. EWSR1-CREB1 translokasyonlu pulmoner mikst sarkom	
XII. Myoepiteliyal tümörler	
1. Myoepiteliyoma	
2. Myoepiteliyal karsinom	

2.1.4. Evrelemesi

Akciğer kanser hastalarının tedavi stratejileri belirlenirken sınıflandırma ile birlikte kanser evresinin doğru tespiti de kritik öneme sahiptir. Akciğer kanseri için iki büyük evreleme sistemi kullanılmaktadır. TNM sistemi Amerikan Kanser Ortak Komitesi tarafından belirlenmiştir ve akciğer kanserlerini primer tümörün boyutu ve kapsamına (T), lenf nodu tutulumunun derecesine (N) ve metastazın uzaklığına (M) göre evreler. TNM evreleme sistemi özellikle KHDAK hastaları için kullanılır. Her harf yanında tümörün tutulum derecesini belirten bir sayı ya da harf ile birlikte kullanılır (ör: T_{is} =karsinoma in situ, M_0 =Metastaz uzaklığı bilinmemekte, N_x =Bölgesel lenf nodları değerlendirilememekte). Bu sayıların artması kanserin daha ilerlemiş olduğunu belirtir. TNM evrelemesi belirlendikten sonra, daha genel bir evreleme sistemi olan numerik evreleme sistemi ile birlikte kullanılır. Numerik evreleme sisteminde, 0'dan IV'e kadar bir derece TNM karakteristiklerine göre belirlenir ve bu artan sayı kanserin ilerlemesini ifade eder. Bazı durumlarda evreler, a ve b harfleri kullanılarak alt evrelere ayrılarak belirtilir (Tablo 2.3). KHDAK evrelemesi için öncelikle fiziki muayene, biyopsi ve görüntüleme testlerinin sonuçları klinik olarak değerlendirilir. Yeni tanı alan KHDAK vakalarının %15'i evre I ve II'dir. Bu hastalar cerrahi rejeksiyon ile tedavi için adaydırlar. 5 yıllık sağkalım evre Ia hastalar için %70, evre Ib hastalar için %60, evre IIa hastalar için %55 ve evre IIb hastalar için %40'tır. KHDAK tanısı almış hastaların %25'i evre III'teki hastalardır. Evre III de, evre IIIa ve IIIb olarak kendi içinde alt evrelerde incelenir. Evre IIIa boyutuna ve yayılımına göre T_{1-3} ve N_2 nodal tutulumlu ya da T_3 ve N_1 nodal yayılımlıdır. Yeni tanı almış KHDAK hastalarının %50'si evre IV'tür. Bu hastalar kemoterapi ile tedaviye uygun hastalardır (WEB_1, Cersosimo 2002).

Tablo 2.3 Akciğer Kanseri Çalışma Derneği'nin (IASLC) 2017 yılında oluşturduğu en güncel 8. TNM evreleme sistemi

		T Skoru	N Skoru	M Skoru
EVRE		T	N	M
Gizli (occult) karsinom		Tx	N0	M0
Evre 0		Tis	N0	M0
Evre I	IA1	T1mi	N0	M0
		T1a	N0	M0
	IA2	T1b	N0	M0
	IA3	T1c	N0	M0
Evre II	1B	T2a	N0	M0
	IIA	T2b	N0	M0
		IIB	T1a	N1
	T1b		N1	M0
	T1c		N1	M0
	T2a		N1	M0
T2b	N1	M0		
T3	N0	M0		
Evre III	IIIA	T1a	N2	M0
		T1b	N2	M0
		T1c	N2	M0
		T2a	N2	M0
		T2b	N2	M0
		T3	N1	M0
		T4	N0	M0
	T4	N1	M0	
	IIIB	T1a	N3	M0
		T1b	N3	M0
		T1c	N3	M0
		T2a	N3	M0
		T2b	N3	M0
		T3	N2	M0
T4		N2	M0	
IIIC	T3	N3	M0	
	T4	N3	M0	
Evre IV	IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a
		Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b
	IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c

2.2. Otofaji

2.2.1. Genel bilgi

Otofaji terimi, Yunanca'dan türetilmiş ve anlamı 'kendini yemek' olarak çevrilebilecek bir terimdir. Bu terim ilk olarak, 40 yılı aşkın süre önce Christian de Duve'un, rat

karaciğerlerinde yaptığı çalışmada, mitokondri ve diğer hücre içi yapıların lizozomlarda degradasyonunu tanımlamak için kullanılmıştır (Deter vd 1967). 2016 yılında Nobel ödülünün, Fizyoloji ve Tıp alanında, otofaji mekanizmasının aydınlatılması üzerine yaptığı çalışmalar nedeniyle Yoshinori Ohsumi'ye verilmesi bilim dünyasının ilgisinin bu hücrel mekanizma üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. Otofaji mekanizmasını aydınlatma amaçlı yapılan ilk çalışmalar mayalardaki (*Saccharomyces cerevisiae*) otofajiden sorumlu genlerin tanımlanmasıyla başlamıştır. Bu çalışmalarda gerçekleştirilen genetik tarama testleri neticesinde günümüze kadar 32 farklı otofaji ilişkili gen (Atg "AuTophagy-related" genleri) tanımlanmış ve bu genlerin, çoğu mantarda, bitkilerde, solucanlarda, sineklerde ve memelilerde önemli ölçüde korunduğu gözlemlenmiştir (Klionsky 2007, Nakatogawa vd 2009). Yapılan ilk çalışmalar, otofajinin besin yetersizliği ile indüklenen ve makromoleküllerin lizozomlar aracılığıyla hücre içi yıkımını sağlayarak bu yıkım ürünlerinin geri kazanımı ile hücrenin stres şartlarına uyum sağlamasına yardım eden bir mekanizma olduğunu ortaya koymuştur (Ohsumi 2001, Shintani vd 2004). Ancak son yıllarda otofajinin bu görevinin yanısıra, metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre yaşlanması ve farklılaşması, hücre ölümü, doğal ve adaptif immün sistemde de rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca otofaji mekanizmasındaki bozuklukların başta kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiovasküler hastalıklar olmak üzere çeşitli patolojik süreçlere neden olduğu bilinmektedir (Mizushima vd 2008, Yang ve Klionsky 2010).

Makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon-aracılı otofaji olarak tanımlanmış 3 tip otofaji mekanizması vardır. Her üç mekanizmada da sitoplazmik bileşenlerin bir kesecik içerisine alınarak bu keseciğin lizozomlarla birleşip kesecik içeriğinin proteolitik degradasyonu gerçekleştirilir. Makrootofaji; sitoplazmik kargonun, otofagozom olarak adlandırılan çift membranlı veziküller içerisine alınarak lizozomlarla birleşmesi sonucunda oluşan otolizozomlara dağıtılma prosesidir. Makrootofaji pek çok hücrede bazal düzeyde gerçekleşen, protein parçalarının ve hasarlı organellerin parçalanmasında rol oynar. Mikrootofaji, sitozolik komponentlerin, lizozom membranının içe çökmesiyle içeri alınarak degrade edilmesidir. Hem makrootofaji hem de mikrootofaji büyük yapıları seçici ya da seçici olmayan mekanizmalarla vezikül içerisine alabilir. Şaperon-aracılı otofajide, hedeflenen proteinler, lizozomal membran reseptörleri tarafından tanınan Hsc-70 gibi şaperon proteinleriyle kompleks oluşturarak lizozomal membrandan transloke edilerek degrade edilir. Şaperon-aracılı otofaji, KFERQ motifli proteinleri tanıyarak lizozom zarına taşıdığı için seçici mekanizma ile degradasyon söz konusudur (Glick vd 2010, Öz Arslan vd 2011). Tez çalışmamız, başlıca otofaji mekanizması olan makrootofaji üzerine yoğunlaştığı için, genel

literatür kullanımına da uygun olarak, tez içerisinde 'otofaji' olarak adlandırılan mekanizma ile kastedilen 'makrootofaji'dir.

Otofaji, degrade edilecek bileşenin vezikül içine alınmasının hedeflenerek programlı şekilde gerçekleştirilmesine göre seçici ve seçici olmayan ofofaji şeklinde de incelenebilir. Makrootofaji de aslında seçici olmayan ofofaji olarak nitelendirilebilir. Seçici olmayan ofofajide degrade edilecek sitoplazmik bileşenler çift membranlı veziküller olan ofofagozomlar içerisine hedefli olmayan şekilde alınarak yıkılırken, seçici ofofajide mitokondri, peroksizom, lizozom, ER, ribozomlar, lipid damlaları, patojenler, belirli serbest proteinler ve RNA'lar ofofagozom içerisine hedeflenerek alınır ve degrade edilirler (Kocatürk vd 2019). Seçici ofofaji kargo reseptörlerini ve adaptörlerini kullanarak hedeflenen kargoyu ofofagozom membranındaki LC3 protein ailesi üyelerine bağlar. Kargo reseptörleri bir ya da daha fazla LIR (LC3 Interacting Region-LC3 Etkileşim Bölgesi) domeyni içererek ofofagozom membranındaki LC3 proteinlerine bağlanırlar. Ayrıca ubikutinlenmiş proteinlerin ofofagozomlara seçici ofofaji ile alınmasına yarayan bir diğer kargo reseptör domeyni de ubikutin ilişkili domeyn (UBA)'dir (Lamb vd 2013). Seçici ofofaji tipleri de hedef alınan organel veya kargoya göre isimlendirilmiştir. Aşırı sayıdaki hasarlı mitokondrilerin ofofaji ile degradasyonu 'mitofaji', peroksizomların degradasyonu 'peksofaji', lipid damlalarının degradasyonu 'lipofaji', ER ve ribozomların degradasyonu 'retikülofaji ve ribofaji', pankreas hücrelerinde salgı granüllerinin degradasyonu 'zimofaji', nöral hastalıklarda çalışılan protein agregatlarının degradasyonu 'agrefaji', intraselüler istilacı patojenlerin degradasyonu ise 'ksenofaji' olarak spesifikleştirilmiştir (Reggiori vd 2012).

Makromoleküllerin ofofaji aracılığıyla geridönüşüme alınması, hücrelere besin yoksunluğu, oksidatif stres, hipoksi, ER stresi, metabolik stres gibi stres koşulları altında sağkalım avantajı sağlar (Kroemer ve Piacentini 2015). Ayrıca seçici ofofaji ihtiyaca göre organel sayısının kontrol altında tutulmasını, disfonksiyonel bileşenlerin eliminasyonunu, ubikutin-proteozom sistemiyle iş birliği yapıp patojenlerin uzaklaştırılmasını da gerçekleştirir. Ancak belirli koşullar altında ofofajinin aşırı ya da düzensiz aktivasyonu hücre ölümüne sebep olabilir. Bu yüzden hücre tipine, uyarana, koşullara ya da mevcut hastalık türüne bakılmaksızın ofofajiyi sadece bir ölüm ya da sağkalım yolağı olarak nitelendirmek doğru değildir. Hipoksi ve/veya besin yoksunluğu ya da oksidatif stres gibi stres koşulları altındaki bir tümör göz önüne alındığında kanser hücreleri ofofaji mekanizmasını kendi yararlarına kullanırlar (Kenific ve Debnath 2015). Ayrıca kanser hücreleri, metastazın adımları olan dolaşıma migrasyon, damar çeperine tutunma, ekstravazasyon ve kolonizasyon aşamalarında karşılaştıkları çevresel streslere direnmek için ofofajiden yararlanırlar. Yani

otofaji aracılığıyla sitoplazmik bileşenlerin geri dönüşümü kanser hücrelerine sağkalımı destekleyen esansiyel faktörleri ve sürekli enerji kaynağı sunar ve bu da tümörün metastatik gücünü ve rekürrensini destekler (J. Su vd 2015, Vera-Ramirez vd 2018).

2.2.2. Otofajinin fizyolojik rolleri

- Hücrel homeostazın korunması

Bazal şartlarda otofaji, uzun ömürlü ve yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonunu sağlayarak hücrel bileşenlerin kalite kontrolünü ve hücrel homeostazın korunmasını sağlar (Glick vd 2010). Bu kalite kontrolün önemini açıklayan bir örnek vermek gerekirse; otofaji mekanizmasındaki aksaklıklar nedeniyle nöronlarda protein agregatlarının ve hasarlı organellerin birikimi sonucu Alzheimer, Parkinson, Huntington ve amiotrofik lateral sklerozis gibi birçok nörodejeneratif hastalık ortaya çıkabilmektedir (Son vd 2012, Nixon 2013).

- Stres yanıtının düzenlenmesi

Besin yokluğu, oksidatif stres, hipoksi ya da enfeksiyon gibi hücrel stres şartlarında otofaji hücreyi koruyucu ve adaptif bir rol oynar.

- Starvasyona bağlı stres yanıtı

Starvasyon süresince otofaji DNA, RNA, karbohidratlar, proteinler ve trigliseridler gibi makromolekülleri degrade eder. Böylelikle, nükleozidler, amino asitler, şekerler ve serbest yağ asitleri daha sonrasında yeniden sentezlenecek olan biyomoleküllerin ve hücrel fonksiyonları için gerekli olan ATP'nin sentezinde kullanılmak üzere hücrede bulunabilecektir.

- Hipoksik koşullara yanıt

Otofaji, düşük oksijen seviyesinin neden olduğu stresi azaltmak için indüklenebilir (Karantza vd 2007). Oksijen yoksunluğunda indüklenen birincil faktör olan HIF-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α), Bcl-2/Beclin1 kompleksini bozarak otofajiyi indükleyen BNIP3 ekspresyonunu arttırarak bu yanıtı aracılık eder (Bellot vd 2009).

- Enfeksiyona yanıt

Otofaji hücre sel homeostazı korumasının yanından intraselüler mikrobiyal enfeksiyon durumunda da rol oynar. Otofaji mekanizması ile *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* ve Grup A *Streptococcus* gibi istilacı patojenler yakalanır ve bunlar degrade edilmek üzere lizozomlara gönderilir. İntraselüler patojenlerin bu şekilde uzaklaştırılması 'ksenofaji' olarak adlandırılan seçici otofajiye bir örnektir.

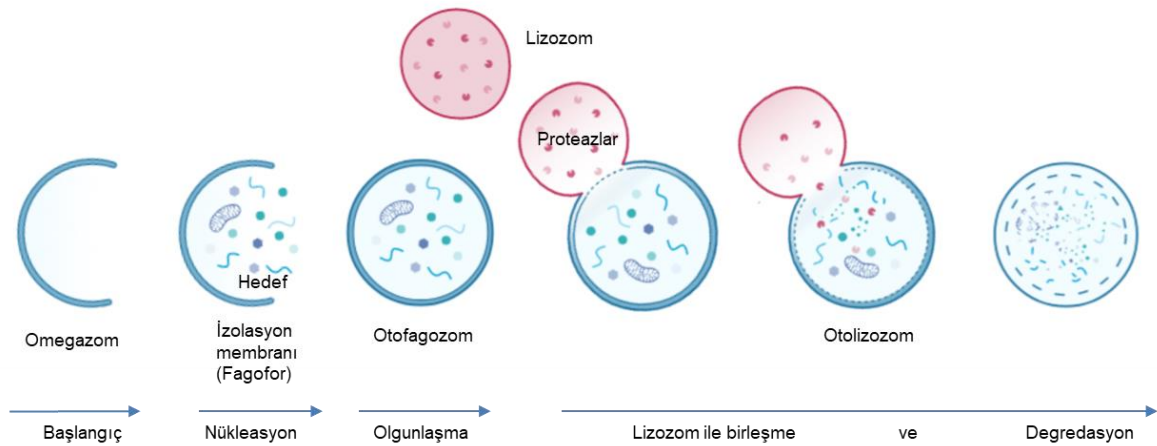
- Oksidatif stres ve mitokondriyal hasara yanıt

Serbest radikallerin aşırı üretimi hücre içi moleküllere ve organellere zarar verebilir. Oksidatif stres PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP yolağı ile aktive edilebilir ve otofajiyi indükleyebilir (B'Chir vd 2013). Serbest oksijen türlerinin (ROS) artan üretimi JNK1 gibi Bcl-2'yi fosforilleyerek otofajiyi indükleyen MAPK'ları (mitojen-aktive protein kinaz) aktive edebilir. Fosforillenen Bcl-2, Beclin1 ile kompleks oluşturamaz ve Vps34 kompleksine katılır ve otofagozom oluşumunun başlatılmasına neden olur (Liang vd 1998, Oberstein vd 2007, Son vd 2011). Ayrıca ROS hasarını sınırlandırmak için hasarlı mitokondriler seçici otofajinin türü olan 'mitofaji' ile degrade edilir (Kroemer vd 2010, Filomeni vd 2015).

2.2.3. Otofajinin regülasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar

Normal koşullar altında otofaji uzun ömürlü proteinlerin yıkımını sağlayan diğer yandan kısa ömürlü proteinlerin proteozomal yıkımına tamamlayıcı bir mekanizma olarak davranır. Otofaji açlık, hipoksi, mitokondriyal hasar gibi çeşitli stres koşullarında indüklendiğinde uzun ömürlü proteinleri ya da organelleri içeren sitoplazma içeriği "izolasyon membranı" olarak da isimlendirilen sisternal bir membran olan 'fagofor' ile çevrelenir. Fagoforlar, memelilerde orijinlendiği yapının ne olduğu konusu zamanında tartışmalı da olsa ER, trans-Golgi ya da endozomlardan köken alan çift katmanlı lipid yapıdadır. Ktistakis ve arkadaşları fagoforların, fosfotidil inositol 3-fosfat içeren 'C'-şeklindeki 'omegazom' adı verilen (' Ω ' omega işaretine benzediği için) ve ER ile dinamik şekilde bağlantılı yapılardan köken aldığını öne sürmüşlerdir (Axe vd 2008, Simonsen ve Tooze 2009). Elektron mikroskop analizleri fagofor ve ER arasındaki direkt bağlantıyı göstermiştir (Hayashi-Nishino vd 2009, Yla-Anttila vd 2009). Fagofor daha sonra 'otofagozom' olarak bilinen çift membranlı vakuelleri oluşturmak için uzar, genişler ve protein agregatları, organeller ve ribozom gibi yapıları içine alarak kapanır. Sitoplazmik kargo ile yüklü olan otofagozomlar, dinein motorlarını kullanarak mikrotübüller üzerinde mikrotübül organize edici merkeze doğru ilerler ve lizozom ile birleşir

ve bu füzyon yapıya 'otolizozom' adı verilir. Otofagozom içeriği lizozomal asit proteazlar tarafından degrade edilir. Lizozomal membrandaki permeazlar ve taşıyıcı proteinler aracılığıyla, degradasyon ürünleri ve amino asitler tekrar sitoplazmaya eksport edilerek yeniden makromolekül sentezi ve metabolizma için kullanıma sunulur (Mizushima 2007). Tüm bu süreç i) başlama ii) nükleasyon iii) olgunlaşma ve iv) lizozom ile birleşme ve degradasyon olarak temel 4 basamakta incelenebilir (Şekil 2.6). Bu basamakların regülasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar mayalardan insanlara kadar korunmuştur ve 40 farklı ATG geni bu mekanizmada rol oynar.



Şekil 2.6 Otofaji mekanizma basamaklarının şematik gösterimi

-Başlangıç aşaması

Otofagozomların oluşması için ilk adım olan başlangıç aşaması, memeli hücrelerinde amino asit yoksunluğu gibi güçlü bir uyarım sonrasında ER membranından köken alan omegazom oluşumu ile başlar (Axe vd 2008). TOR (target of rapamycin) proteini (memelilerde mTOR) otofajinin majör regülatörü olan bir serin-treonin kinazdır. mTOR, otofaji ile ilişkili olan iki farklı kompleks içerisinde yer alır: mTORC1 ve mTORC2. mTORC1 kompleksini oluşturan proteinler; ULK1/2, Atg13, Atg101, FIP200 ve RAPTOR iken mTORC2 kompleksi mLST8, RICTOR, mSIN1 ve PROTOR proteinlerinden oluşur. mTORC1 kompleksi besin-ilişkili sinyallere daha duyarlıdır ve otofaji çoğu durumda mTORC1-bağımlı olarak mTORC1'in inhibisyonu ile indüklenir (Ravanan vd 2017). AMPK (AMP-aktive protein kinaz), azalan ATP düzeyi sonucu biriken AMP ile etkileşime girerek

konformasyonel değişime uğrayan ve aktive olan heterotrimerik bir enzimdir. AMPK aktivasyonu, TSC2 kompleksini aktive ederek ve RAPTOR'u inhibe ederek mTORC1 aktivitesini bloke eder. Bunun yanında AMPK, ULK1'i fosforilleyerek aktive eder ve ULK1'in mTORC1 kompleksinden ayrılmasına neden olur. Bazal büyüme koşullarında lizozom membranıyla ilişkili olan mTORC1, ULK1/2-Atg13-FIP200 kompleksi ile birliktedir ve bu birliktelik ULK1/2 ve RAPTOR arasındaki doğrudan bağlantı sayesinde gerçekleşir. Aktif mTOR, Atg13 ve ULK1/2'yi fosforilleyerek ULK1/2'nin kinaz aktivitesini baskılar. Ancak besin yoksunluğu ya da kimyasal muamele sonucu mTOR'un inhibe olmasıyla ULK1/2, mTORC1 kompleksinden ayrılır ve otofosforillenir. Aktif ULK1/2, Atg13 ve FIP200'ü fosforilleyerek kompleks halde (ULK1/2-Atg13-FIP200-Atg101) pre-otofagozomal membrana transloke olur ve burda Atg9 ile etkileşim sonucunda Sınıf III fosfotidil inositol 3 kinaz (PI3K) kompleksi membranlara çağırılır ve aktive edilir. Atg9 çok geçişli bir transmembran proteindir ve Golgi kompleksinden membran yapılarını, oluşacak olan otofagozom bölgesine taşır (Li Yu vd 2018). Tüm bu süreç sonucunda otofaji indüklenmiş olur (Alers vd 2012, Ravanan vd 2017, Kocatürk vd 2019). Bu süreçte rol oynayan moleküler mekanizmalar Şekil 2.7'de özetlenerek gösterilmiştir.

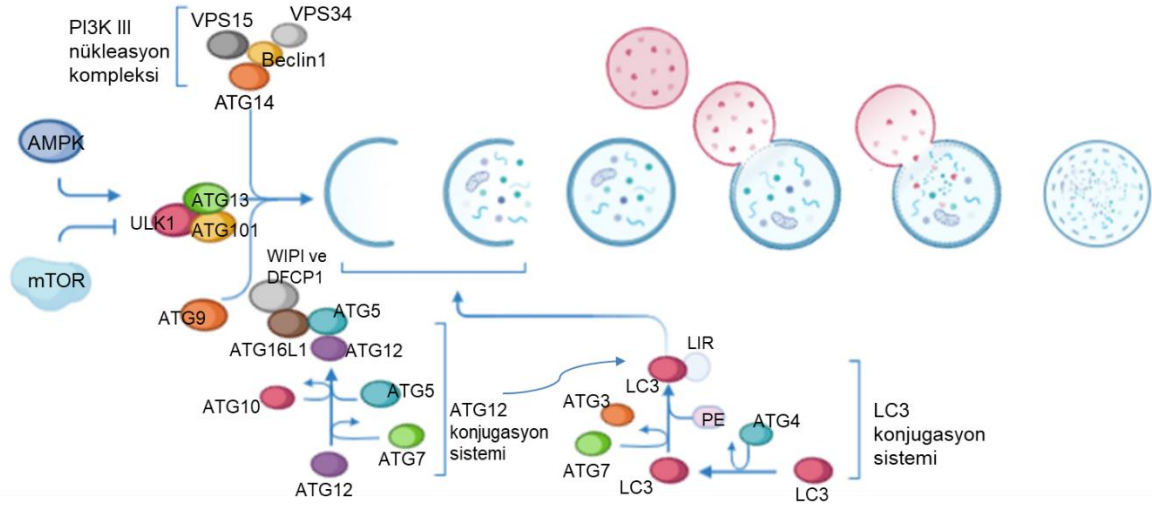
- Nükleasyon aşaması

Fagofor ya da izolasyon membranı olarak adlandırılan 'C' şekilli yapıların oluşumunu ifade eden otofajinin 'nükleasyon' adımı öncelikli rolü Sınıf III PI3K kompleksi oynar. Vps34 (vesicular protein sortin 34), Beclin1 (maya Atg6 ortologu), p150, AMBRA1, Atg14 ve Atg9 bu komplekste yer alan proteinlerdir. Vps34, substrat olarak kullandığı fosfotidilinositol lipidleri (PI) fosfotidil inositol trifosfata (PI3P) dönüştürür. PI3P'ler fagofor uzaması ve diğer Atg proteinlerinin fagofora çağırılması için esansiyeldir. Beclin1, BH3 domaini nedeniyle anti-apoptotik protein Bcl-2 ile etkileşimde olan bir proteindir ve bu etkileşimi otofajiyi inhibe eder. Ancak açlık indüklü sinyal sonrasında Bcl-2'nin Jnk-aracılı fosforilasyonu sonucu Beclin1 Bcl-2'den ayrılır ve Vps34 ile etkileşime girerek membran nükleasyonunu destekler. AMBRA1, ULK1 tarafından fosforillenerek dinein motor kompleksinden ayrılır ve sonra fagofor oluşum aşamasında Beclin1'e bağlanmak üzere ER'ye transloke edilir (Di Bartolomeo vd 2010). Vps34-Beclin1 kompleksinin aktivitesi Beclin1-bağımlı olarak Barkor (Atg14L), RUBICON (negatif regülatör), VMP1, Bcl-2 (negatif regülatör), BIF-1 ve UVRAG gibi proteinler aracılığıyla regüle edilir. Kompleksin diğer bir üyesi p150 (mayalardaki Vps15'e benzer) Vps34'ün düzenleyicisidir ve PI3K ile etkileşimi lipid kinaz spesifik aktivitesini artırır (Panaretou vd 1997). Vps34-aracılı PI3P'nin enzimatik üretimi, PI3P-

bağlayıcı domain içeren otofaji proteinleri (WIPI1-4 ve DFCP) için tutunma alanları sağlar ve süreç izolasyon membranının olgulaşma adımı yönünde işlemeye devam eder (Mauthe vd 2011).

-Olgunlaşma aşaması

Olgunlaşma adımı kimi kaynaklarda 'uzama' olarak da adlandırılan ve izolasyon membranının otofagozom oluşumu tamamlanana kadar genişleyerek degrade edilecek içerik etrafında uçlardan birleşip kapanması sürecidir. Bu sürecin yürütülmesini 2 ubikutin benzeri konjugasyon sistemi olan Atg5-Atg12 konjugasyon sistemi ve LC3-PE sistemi üstlenir. Atg5-Atg12 konjugasyon sistemi, Atg7 (E1-benzeri enzim), Atg10 (E2-benzeri enzim) ve Atg16L1 gibi üyeleri de barındırır. Atg7, Atg12'yi aktive ederek E2-benzeri ubikutin taşıyıcı protein olan Atg10'a transfer eder. Atg10, Atg12'nin Atg5'e lizin 130 (K130) rezidüsünden kovalent konjugasyonunu katalizler. Atg5-Atg12 konjugasyonunu takiben Atg16L1 çağrılarak konjugasyona dahil olur ve E3-benzeri fonksiyon gösteren Atg5-Atg12-Atg16L1 kompleksi (800 kDa) oluşur. Bu kompleks, ikinci konjugasyon sisteminin gerçekleşmesi için E3-benzeri enzim aktivitesine sahiptir ve fagofora, uygun bükey yapısını verir. İkinci sistem, LC3 proteinine bir lipid molekülü olan fosfotidiletanolaminin (PE) konjugasyonunu içerir. Öncül LC3 proteini Atg4 tarafından kesilir ve LC3-I olarak adlandırılan serbest sitozolik bir protein oluşur. Bu kesilme sonucu açığa çıkan karboksi ucundaki glisin rezidülerine PE konjugasyonu Atg7 ve Atg3 tarafından gerçekleştirilir. Oluşan PE takılı LC3 proteini LC3-II olarak adlandırılır ve çift katlı otofagozom membranının her iki katmanında da bulunur (Nakamura ve Yoshimori 2017). Bu yüzden de otofagozomların tespitinde dolayısıyla da otofajinin tespitinde bir belirteç olarak kullanılır (Kabeya vd 2000, Hanada vd 2007, Nakatogawa vd 2007).



Şekil 2.7 Otofaji mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynayan temel moleküler mekanizmaların şematik gösterimi

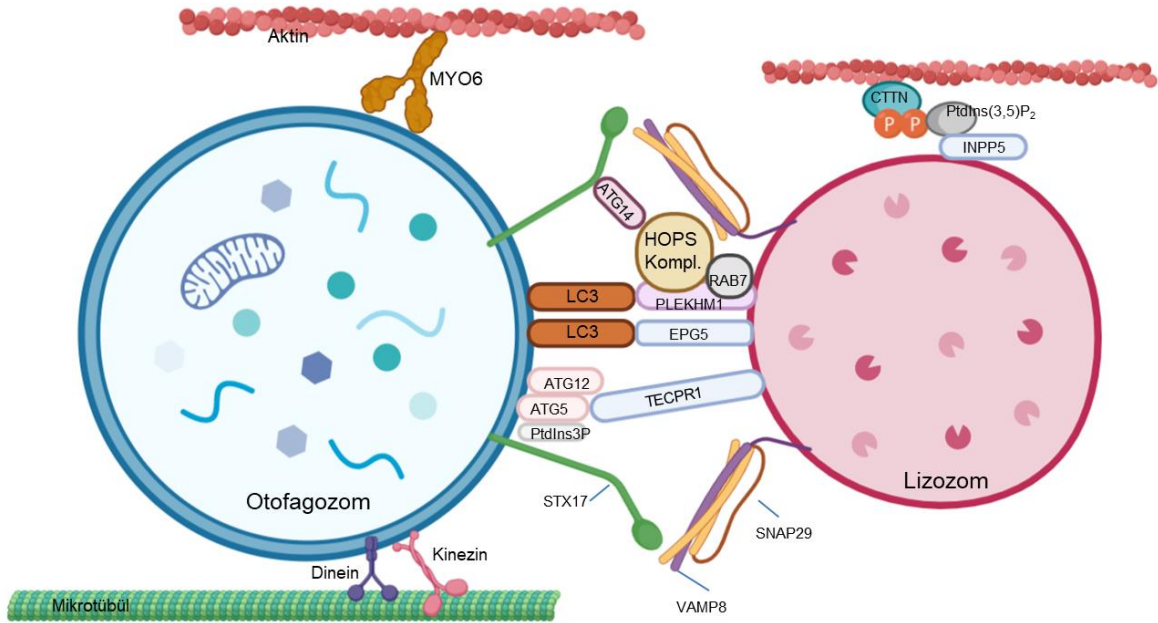
- Lizozom ile birleşme ve degradasyon aşaması

Otofagozom oluşumunun tamamlanmasından sonra degrade edilecek içeriği hapseden otofagozomların, degradasyonun gerçekleşeceği lizozomlarla birleşmesi gerekir ve oluşacak olan yeni yapı 'otolizozom' olarak adlandırılır (Mizushima 2007). Bunun için otofagozom ve lizozomlar birbirilerine doğru yaklaşmalıdır, daha sonra SNARE-aracılı füzyon gerçekleşir. Otofagozom-lizozom füzyonunun ilk adımında, dış otofagozomal membran tek katlı lizozom membranıyla birleşir. Tam birleşme iç otofagozomal membranın lizozomal hidrolazlar tarafından degradasyonu ve otofagozom içeriğinin lizozom lümenine maruz kalmasıyla gerçekleşir. Füzyonun tam olarak sağlanmasında sitoskelet elemanları ve ilişkili motor proteinleri, birleştirici faktörler, fosfolipidler ve spesifik SNARE kompleksleri rol oynar. Starvasyon koşullarında intraselüler pH'taki değişimler lizozomların perinükleer bölgede kümelenmesine, otofagozomların ise hücrenin periferisinde rastgele oluşmasına neden olur. Oluşumunu tamamlayan otofagozomlar mikrotübüllere bağlanarak mikrotübül boyunca transport edilir ve lizozomların bulunduğu perinükleer bölgelerde yoğunlaşırlar. Dinein ve kinezin motor proteinleri otofagozomların mikrotübül üzerinde lizozomlara doğru taşınmasını sağlar. Mikrotübül-kökenli motor proteinlerinin yanısıra MYO6/miyozin VI ve MYO1/miyozin I gibi aktin-kökenli motor proteinleri de otofagozom-lizozom füzyonunda rol oynar (Yu vd 2017).

Başlangıçta otofaji degrade edeceği içeriği rastgele seçen bir mekanizma olarak tanımlansa da son zamanlarda yapılan çalışmalar farklı otofaji reseptörlerinin spesifik

kargoları tanıyarak degradasyona seçtiğini göstermiştir. Bu da seçici ve seçici olmayan otofaji ayırımına neden olmuştur (Glick vd 2010, Ravanan vd 2017). SQSTM1 (p62), NBR1, NDP52 (CALCOCO2), OPTN ve BNIP3L seçici otofajide rol oynayan otofaji reseptörleridir. Bu reseptörlerden bazıları hedef kargoya bağlanıp ubiquitinleyebilir. Ayrıca bazı reseptörler LIR (LC3-etkileşim bölgesi) motifleri taşırlar ve bu motifler ile olgunlaşmaya devam eden henüz kapanmamış otofagozom membranının iç yüzeyindeki LC3'lere bağlanarak otofagozomun kendi etrafında oluşmasını sağlar. Bu otofaji reseptörleri genelde kargoyla birlikte lizozom füzyonundan sonra degrade olur ve bu yüzden hücresel düzeyleri otofaji aktivasyonunun artmasıyla düşer. Bu da onların otofajik aktivitenin ölçümü için belirteç olarak kullanımını sağlar (Lamb vd 2013, Akkoç ve Gözüaçık 2018).

Otofagozom-lizozom füzyonu sırasında SNARE proteinleri, integral proteinleri (ör: LAMP-2) ve RAB proteinleri (ör: RAB5 ve RAB7) gibi birçok protein kompleksi rol oynar. SNARE proteinlerinden olan STX17, SNAP29, VAMP8 ve HOPS (homotipik füzyon ve protein sınıflandırma) kompleksi bu proseste yer alır. Membran füzyonu boyunca farklı membranlar üzerindeki R-SNARE ve Q-SNARE proteinleri biraraya gelerek füzyon için gereken kuvveti sağlayacak trans-SNARE kompleksini oluşturur. Memelilerde otofagozomal Q-SNARE, STX17'dir. Otofajinin indüklenmesi ile normal şartlarda ER ve mitokondri membranında bulunan STX17, otofagozom oluşumunun bitmesine yakın otofagozom membranına çağırılır. Otofagozomal STX17, SNAP29 ve VAMP8 (lizozomal R-SNARE) ile etkileşerek trans-SNARE kompleksini oluşturur ve otofagozom-lizozom füzyonuna aracılık eder. Birleşme faktörleri bu aşamada rol oynayan diğer bir grup proteindir. Bunlar 3 kategoriye ayrılır: HOPS (homotipik füzyon ve protein sınıflama) kompleksi, RAB7 ve otofagozomal ve lizozomal komponentleri temel füzyon mekanizmasına bağlayan adaptörler. Otofagozom-lizozom füzyonundaki temel birleştirici faktörler HOPS kompleksidir. HOPS'lar; Vps11, Vps16, Vps18, Vps33A, Vps39 ve Vps41 proteinlerini kapsayan korunmuş bir komplekstir. HOPS kompleksi STX17 (Q-SNARE) ile etkileşir ve otofagozom-lizozom füzyonunu sağlayan *trans*-SNARE kompleksinin oluşumunu kolaylaştırır (Yu vd 2017). Bu aşamada rol oynayan birçok adaptör protein otofagozom membranı ve lizozom membranı üzerindeki füzyon proteinleri arasında bağlantı kurar (EPG5, PLEKHM1, TECPR1). Otofagozom-lizozom füzyonu dış otofagozom membranında tamamlanınca lizozom içeriği iki otofagozom membranı arasına geçer ve iç membranın degradasyonu gerçekleşir ve otofagozomal kargonun degradasyonu başlamış olur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Otofagozom ile lizozomun birleşmesinin ve bu aşamada rol oynayan başlıca proteinlerin şematize gösterimi (Yu vd 2017 kaynağından taslak alınarak çizilmiştir).

2.2.4. Programlı hücre ölüm mekanizması olarak “otofajik hücre ölümü”

1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından yayınlanan çalışmada araştırmacılar hücre ölüm mekanizmalarını iki başlık altında sınıflandırarak genetik olarak kontrol edilebilen hücre ölüm tipini ‘apoptoz’, pasif ve kazara olan hücre ölüm tipinin de ‘nekroz’ olduğunu belirttiler (Kerr vd 1972). 1990 yılında ise Clarke tarafından morfolojik değerlendirme sonucu hücre ölümü 3 alt kategoride incelendi. Tip I hücre ölümü olarak belirtilen apoptotik hücre ölümü, Tip II hücre ölümü olan otofajik hücre ölümü, Tip III hücre ölümü ise lizozomal olmayan vezikül degradasyonu olarak tanımlanmış ve Tip IIIA ve Tip IIIB olmak üzere 2 alt tipte incelenmiştir. Ancak Hücre Ölümü Komitesi’nin 2018 yılında, hücre ölüm tipi sınıflandırmasını sadece morfolojik olarak değil moleküler, genetik, biyokimyasal, farmakolojik ve fonksiyonel mekanizmalarıyla da değerlendirerek güncellemiştir. Bu güncelleme sonucu; intrinsik apoptozis, ekstrinsik apoptozis, immunojenik hücre ölümü, otofaji-bağımlı hücre ölümü, lizozom-bağımlı hücre ölümü, NETotik hücre ölümü, entotik hücre ölümü, parthanatos, piroptozis, ferroptozis, nekroptozis, MPT-güdümlü nekrozis olarak 12 başlık altında sınıflandırma yapılmıştır (Galluzzi vd 2018). Yine 2018 yılında farklı iki çalışma grubu iki yeni hücre ölüm tipini (alkaloptozis ve okseiptozis) de sınıflandırmaya

dahil ederek bu sayıyı 14'e çıkarmıştır (Holze vd 2018, Song vd 2018). Görüldüğü gibi ilk çalışmalarla bir sağkalım destekleyici mekanizma olarak ortaya çıkan otofaji güncel veriler ile aynı zamanda programlı hücre ölüm mekanizmalarından biri olarak kabul görmüştür. Bu konudaki ilk çalışmalarda, ölen hücrelerin sitoplazmasında otofagozom ve otolizozomların birikimi gözlenmiştir ve 'otofajik hücre ölümü' terimi literatüre girmiştir (Schweichel ve Merker 1973). Otofajinin hücre ölümüyle ilişkisi bilimsel komiteler tarafından üç ayrı şekilde ele alınmıştır:

- i) Otofaji-ilişkili hücre ölümü: otofajinin indüklenmesi apoptozun (ya da diğer ölüm yollarının) indüklenmesi ile çakışır ancak otofaji bu ölümden aktif rol oynamaz, otofaji mekanizması çalışmaya devam eder
- ii) Otofaji-aracılı hücre ölümü: otofajinin indüksiyonu apoptozu uyarır ve sistem apoptoz ile devam eder.
- iii) Otofaji-bağımlı hücre ölümü: hücre ölümü apoptoz ve nekrozdan bağımsız olarak otofaji indüksiyonu ile gerçekleşir.

Otofajik hücre ölümünün morfolojik karakteristiklere göre tespiti yapılabilir de bunun nedensel özellikleri hala tam olarak netleştirilememiş bir konudur. Otofaji ve diğer ölüm yolları arasındaki etkileşim ve iş birliği otofajinin hücre ölümünde oynadığı rollerin tespitini zorlaştırmaktadır. Bir hücre ölümü otofajinin baskılanması ile önlenirse dahi buna 'otofaji-bağımlı hücre ölümü' diyebilmek için hem apoptozun hem de nekrozun bu hücre ölümüyle ilişkili olmadığını gösteren kanıtlar olması gerekmektedir.

Otofaji-bağımlı hücre ölümünün bir formu olarak adlandırılan 'otozis', starvasyon ya da Beclin1-türevli peptid muamelesi sonucu plazma membranındaki Na^+/K^+ -ATPaz'lara bağlı olarak meydana gelir ve ölen hücreler apoptotik ve nekrotik morfolojik karakteristikler göstermez. Ayrıca bu hücre ölümü Atg13 ve Atg14'ün knockdownu ya da otofagozom oluşumunun kimyasal inhibisyonu ile önlenir (Liu vd 2013, Xie vd 2016). Otozis, hipoksi-iskemik hasar sonucu yeni doğan farelerin beyinlerinde meydana gelir. Otofaji-bağımlı hücre ölümünün apoptoza gidemeyen memeli hücrelerinde meydana geldiğini gösteren kanıtlar da mevcuttur (Shimizu vd 2004, Arakawa vd 2017, Lamy vd 2013). Otofaji-bağımlı hücre ölümü gözlenen hücreler starvasyon-indüklü otofaji sürecindeki hücrelerle kıyaslandığında otofajik veziküllerin sayıca ve boyutça çok arttığını ve bir otofajik hiperaktivasyon sözkonusu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ölen hücrelerde degrade olmuş mitokondri, intraselüler membranlar ve sitoplazmik materyaller olduğu saptanmıştır. Bu bulgular aşırı otofaji aktivasyonunun sitoplazmik bileşenlerin aşırı tüketimine neden olarak hayati organların degradasyonu ile hücrenin ölüme gitmesine neden olduğunu göstermektedir. Otofajik hücre

ölümüne bir diğer örnek de katalazların otofajik degradasyonu sonucu artan reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu otofajik hücre ölümüdür (Yu vd 2006). Otofaji ya da apoptoz regülasyonunda rol oynayan bazı proteinler bu iki yolak arasında bağlantı sağlamaktadır. Örneğin p53, apoptozun indükleyicisi olmakla birlikte DRAM adlı hedef proteininin artan ekspresyonuyla otofajiyi indükler (Crichton vd 2006). Beclin1, otofaji regülasyonunda rol oynayan anahtar proteinlerden biridir ve antiapoptotik protein olan Bcl-2 ve Bcl-xL ile ayrı ayrı kompleks oluşturabilir. Bu etkileşim ile otofaji baskılanırken apoptoz indüklenir. Ancak kompleksin dağılmasıyla Beclin1-bağımlı otofaji indüklenirken apoptoz baskılanır (Patingre vd 2005).

2.2.5. Otofaji ve kanser

Otofaji, kanser progresyonunda karmaşık ve paradoksal bir role sahiptir. Tümör hücresinin kaderinin otofaji tarafından belirlenmesi kanserin türüne, evresine ve genetik özelliklerine bağlıdır (Eisenberg-Lerner ve Kimchi 2009). Bir sağkalım yolağı olarak otofaji yanlış katlanmış proteinleri, hasarlı organelleri ve ROS'u uzaklaştırarak hücreyi koruyucu etki gösterir ve bunun sonucunda mutasyonlara ve bu mutasyonların birikimi sonucunda oluşabilecek kansere bir engel teşkil eder. Fakat kanserin ilerleyen evrelerinde otofaji hala daha hücrenin sağkalımını destekleyici etkisini göstermeye devam ederse ve kanser hücresi otofaji-bağımlı hücre ölümüne de yönelmiyorsa kanser hücreleri için otofaji mekanizması metabolik ihtiyaçları karşılayan ve hızlı proliferasyonu destekleyen onkogenik bir mekanizma haline gelecektir (Yang vd 2011, White 2012). Otofaji, kanser progresyonunda rol oynayan hücre proliferasyonu, hücre döngüsü kontrolü, anjiyogenez, invazyon ve metastaz, apoptozdan kaçış ve metabolizma regülasyonu gibi belli başlı mekanizmaların regülasyonuna katılarak progresyonu iyi ya da kötü yönde etkileyebilir. Çalışmaların çoğunluğunda otofajideki fonksiyon bozukluklarının genomik instabilite, tümörögenез ve malign transformasyonla ilişkilendirildiği için otofaji bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak ele alınmıştır (White 2012). Otofaji ilişkili gen olan Beclin1'de monoallelık delesyon bulunan farelerde tümör gelişimi saptanmıştır ve meme, over ve prostat kanserlerinin %40-75'inde Beclin1'in allelik kaybı gözlenmiştir (Aita vd 1999, Liang vd 1999, Shen vd 2008). Bu nedenle kanıtlar Beclin1'in bir tümör baskılayıcı olarak rol oynadığını ortaya koymaktadır. Beclin1 regülasyonunda pozitif regülatör olan UVRAG ve BIF-1 proteinlerinin de kolon, gastrik, meme, prostat ve böbrek kanserlerinde monoallelık delesyonları ya da mutasyonları tespit edilmiştir (Kung vd 2011). Bir diğer otofaji düzenleyici protein Atg4C, farelerde kimyasal

olarak indüklenen fibrosarkomaların çoğunda düşük ekspresyon göstermiş ve aday bir tümör baskılayıcı olarak raporlanmıştır (Kimmelman 2011). Hem tümörögenizde hem de otofaji regülasyonunda önemli rol oynayan PI3K/Akt yolağında rol oynayan birçok üyenin fonksiyon kaybı da bu iki hücrel mekanizmayı birbirine bağlayabilmektedir (Roy ve Debnath 2010, Noguchi vd 2014). Bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN'de meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları ve anormal PI3K-Akt-mTOR sinyalleri malignant hücrelerde otofajide düşüşe sebep olabilir. Bu da mTOR'un inhibe ettiği AMBRA-1 tarafından defosforile olan c-myc sonucu düzenlenen hücre proliferasyonunda artışa sebep olur ve sonuç olarak otofajideki baskılanma tümör progresyonuna neden olabilir. Ayrıca otofaji inhibisyonuyla biriken p62 agregatları sitotoksisiteye, oksidatif strese ve DNA hasarına yol açar. Bu fenomen birçok kanser türünde saptanmış ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Kimmelman 2011, Noguchi vd 2014). Tüm bu çalışmaların sonuçları otofajinin tümör baskılayıcı olarak rol oynadığını ve otofaji mekanizmasında meydana gelen anormalliklerin tümörögeneze neden olabileceğini göstermektedir.

İleri evre tümörlerde ise durum farklılık gösterebilir, çünkü otofaji proliferasyon yeteneği artmış olan tümör hücrelerinin yüksek enerji ihtiyacını karşılama yönünde davranır. Otofaji-aracılı makromoleküler degradasyon temel yapıtaşlarının geridönüşümünü sağlayarak kanser hücrelerinde artan metabolizmayı destekler ve bu sayede tümör hücrelerini metabolik stres-indüklü nekrozdan korur (Liu ve Ryan 2012). Ayrıca düşük oksijen miktarı HIF-1 α -bağımlı ve bağımsız otofaji indüksiyonunu uyararak tümör progresyonunu destekler (Bellot vd 2009). Bu nedenle otofajinin kimyasal inhibisyonu ya da esansiyel otofaji genlerinin knockdownu tümör hücrelerinin apoptoz sonucu ölmesiyle sonuçlanabilir. Örneğin farelerdeki genetik çalışmalar otofajik bir gen olan FIP200'ün delesyonunun meme tümörlerinde büyümeyi baskıladığını göstermiştir (Wei vd 2011). HRAS, KRAS, BRAF mutasyonu gözlenen kanserler otofajiye bağımlıdır ve büyüme koşullarında dahi bazal otofaji düzeyi yüksektir (Kim vd 2011). Bu hücrelerde otofajinin kimyasal ve genetik olarak inhibisyonu sağlandığında pankreatik ksenograft modellerinde ve genetik fare modellerinde tümör regresyonu bildirilmiştir (Kimmelman 2011, Yang vd 2011, Yang vd 2011). Yani otofaji ileri evre ve/veya belirli mutasyonları taşıyan kanserler için strese toleransı arttırması, besin ve enerji ihtiyacını karşılaması nedeniyle tümör hücrelerinin sağkalımını arttıran onkogenik bir mekanizma olarak da davranabilir.

2.2.5.1. Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde otofaji mekanizması

Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinin (KHDAK) progresyonunda otofajinin oynadığı rol diğer kanser türlerindeki gibi kanserin evresine ve sahip olduğu genetik değişimlere göre çift yönlüdür ve apoptotik yollar ile etkileşim söz konusudur. 2018 yılında Nakashima ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen klinik bir çalışma sonucunda 67 KHDAK hastasından alınan tümör dokularında yapılan bir çalışma sonucuna göre bu dokularda gözlenen yüksek otofaji düzeyi, artan tümör proliferasyonu ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

Otofaji Akt, PI3K, Bcl-1 ve mutant p53 gibi farklı onkoproteinler tarafından her zaman inhibe edilir ve degrade edilmesi gereken proteinlerin (örn: hücre proliferasyonuna neden olanlar) hücrede aşırı ekspresyonu gözlenir. Diğer taraftan otofajinin sürekli aktivasyonu otofajik hücre ölümüne ya da apoptoza neden olabilir. KHDAK hastalarında en yaygın görülen mutasyonlardan biri adenokarsinomalarda %45-70, skuamoz hücre karsinomalarında %60-80 sıklıkla p53 mutasyonları ve EGFR, KRAS, LKB1, PIK3CA ve PTEN gibi genlerdeki diğer sık görülen mutasyonlar mTOR düzenleme mekanizmalarıyla yakın ilişkilidir.

Normal şartlarda sitoplazmada lokalize olan p53, hücresel stres şartlarında fosforillenerek nükleusa transloke olur (Kruse ve Gu 2009). Nüklear p53, otofajiyi desteklerken, sitoplazmik p53 otofajiyi inhibe eder. Stres şartlarında nükleusa geçen p53, sestrin1 ve sestrin2 proteinlerinin ekspresyonlarını arttırarak AMPK-TSC2-mTOR yoluyla aracılığıyla otofajiyi uyarır (Budanov ve Karin 2008). Sitozolik p53 otofaji ilişkili bir protein olan FIP200 ile etkileşir ve yarışmalı olarak otofajiyi inaktive eder. p53'ün anti-otofajik rolü AMPK'nin inhibisyonu ve mTORC1 aktivasyonu ile de gerçekleşebilir (Tasdemir vd 2008).

mTOR yolagındaki fonksiyon bozuklukları skuamoz akciğer karsinomalarında ve adenokarsinomalarda sıklıkla gözlenir (Han vd 2013, Fumarola vd 2014). Ayrıca EGFR mutasyonu taşıyan hastalarda anormal PI3K-Akt-mTOR aktivasyonu saptanmıştır. Bu da klinikte EGFR-tirozin kinaz inhibitörü (EGFR-TKI) tedavisine direnç gelişimine neden olur (Fumarola vd 2014). mTOR'u dolayısıyla da otofajiyi regüle eden yollardan biri de PI3K-Akt yolagıdır. PI3K'ların aktive olan reseptörler (IGF-1, EGFR, VEGFR gibi) tarafından uyarımı sonucu membran fosfolipid bileşeni PIP2, PIP3'e dönüştürülür. PIP3 önemli bir sekonder mesajcıdır ve Akt gibi hedef proteinleri aktive eder ve Akt aktivasyonu sonucu mTORC1'in aktivasyonu dolayısıyla otofajinin baskılanması gerçekleşir. PI3K adenokarsinomalarda %2 sıklıkla skuamoz hücre karsinomlarında ise %2-18 sıklıkla mutasyona uğramıştır, %25-45 sıklıkla da amplifiye olmuştur (Liu vd 2017). mTOR, Akt-

bağımsız şekilde LKB1-AMPK yolağı üzerinden de regüle edilebilir. KHDAK hastalarında LKB1 mutasyon ya da delesyon sonucu tümör baskılayıcı fonksiyonunu kaybeder ve LKB1-AMPK-mTOR yolağı aracılığıyla tümör büyümesini desteklerken otofajiyi de baskılar (Mendoza vd 2011). Raf-MEK-ERK yolağı da mTOR regülasyonunda rol oynayan ve KHDAK hastalarında fonksiyonu bozulan yolaklardan biridir.

2.2.5.2. KHDAK tedavisinde otofaji mekanizmasını hedefleyen terapötik yaklaşımlar

KHDAK ile mücadelede tedavi yaklaşımları temel olarak kanser evresine bağlıdır. Ancak bunun yanında, kişinin genel sağlık durumu, akciğer fonksiyonları ve kanserin kendine has diğer özellikleri de tedavi seçimini etkileyen faktörlerdir. Birçok vakada farklı tedaviler kombine olarak kullanılır. Günümüzde sıklıkla kullanılan tedaviler, cerrahi müdahale, radyofrekans ablasyonu (RFA), radyasyon terapisi, kemoterapi, hedefleyici tedavi yaklaşımı, immunoterapi ve palyatif prosedürlerdir. Hücre proliferasyonunu yöneten ve tümör büyümesini destekleyen sinyal moleküllerini kodlayan mutant onkogenlerin tanımlanması akciğer kanser hastaları için daha az toksik ve daha efektif ilaçların geliştirilmesine imkan sağlamaktadır.

KHDAK tedavisinde sıkça kullanılan kemoterapötik ajanların çoğunun otofajiyi indüklediği gösterilmiştir (Kaminsky vd 2012, Liu vd 2013, Cho vd 2014). Ancak kemoterapi-indüklü otofajinin inhibisyonunun ilaç ve radyasyona direnç geliştiren kanserlerin tedavisi için yararlı bir strateji olabileceği çokça tartışılmaktadır (Duffy vd 2015). Platin bazlı bileşikler, taksanlar ve EGFR inhibitörleri gibi geleneksel kemoterapötiklerle kombinasyon halinde otofaji inhibitörlerinin, özellikle klorokin ve hidrosiklorokin kullanımını değerlendiren bir dizi klinik çalışma devam etmektedir (WEB_6). Birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan cisplatin DNA molekülüyle intra- ve interstrand çapraz bağlar oluşturarak sitotoksik etki yaratır ve doz bağılı olarak hücre döngüsünün durdurulmasına ve apoptoza yol açar. H460 KHDAK hücre hattıyla yapılan bir çalışmada 5-20 µM konsantrasyonunda cisplatin kullanımının otofajiyi indüklediği raporlanmıştır (Cho vd 2014). Çalışmada otofaji inhibitörü 3-metiladenin (3-MA) ile cisplatinin kombine kullanımı sonucu anti-tümör etkinin ve apoptozun arttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmaların genelinde cisplatin sıklıkla hücre koruyucu otofajiyi başlatmakta ve bu otofaji bloke edilirse hücrelerin duyarlılığı artmaktadır. Ancak tüm bu çalışmalar hücre kültüründe farklı hücre hatlarıyla gerçekleştirildiği için zıt sonuçlar ortaya çıkabilmekte ve klinik yanıtlar için ileri çalışmalar gerekmektedir.

mTOR inhibitörü olan rapamisin ile diğer anti-kanser ilaçların kombine kullanımı üzerine yapılan çalışmalarda ilacın tek başına kullanımına kıyasla etkisinin artırılabilirdiği gösterilmiştir. Örneğin, Bcl-2 inhibitörü ABT-737, rapamisinle kombine kullanıldığında hücre kültürü ve ksenograft modellerinde apoptoz ve otofajiyi indükleyerek radyasyon terapisinin etkisini arttırmaktadır (Kim vd 2009). KHDAK'de rapamisinin haricinde mTOR'un upstreaminde rol oynayan proteinleri hedef alan başka ajanlar üzerine de çalışmalar mevcuttur. Örneğin AZD8055 (PI3K inhibitörü), otofaji aktivasyonu gerçekleştiren bir ajandır ve KHDAK ksenograft modellerinde güçlü büyüme inhibisyonuna ve tümör regresyonuna neden olmuştur (Jordan vd 2014). KHDAK'de mTOR yolağını hedef alan çoklu klinik çalışmalar devam etmektedir. Örneğin ABBV-221, Navitoclax, Selumetinib ve INK128 adlı ajanlar KHDAK klinik denemelerinde faz I aşamasındadırlar (Dhloria vd 2016). 2019 yılında faz II aşaması tamamlanan bir çalışmada karboplatin, paklitaksel ve hidrosiklorokin (otofaji inhibitörü) kombine olarak kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre ortalama sağkalım süresi 3,3 ay, KRAS mutasyonu bulunan hastalarda ise 6,4 ay olarak saptanmıştır. Araştırmacılar ileri evre KHDAK hastalarında gelişen kemoterapi direncine otofaji inhibisyonuyla engel olunabileceği ve ileri çalışmaların KRAS-pozitif tümörlerle gerçekleştirilmesinin yararlı olacağını söylemişlerdir (Malhotra vd 2019).

2.3. Transkripsiyon Faktörü NFκB

Nüklear Faktör Kappa B (NFκB) transkripsiyon faktörü ailesi, hemen hemen tüm multiselüler organizmada gelişim, hücre proliferasyonu, sağkalım, inflamasyon, immun yanıt ve yaşlanma gibi önemli hücresel süreçlerde rol oynayan birçok genin ekspresyonlarını regüle eder (Gerondakis vd 2006, Hayden ve Ghosh 2012, Hoffmann ve Baltimore 2006). NFκB sistemi sıkı şekilde kontrol edilir ve regülasyonunda oluşan herhangi bir aksaklık kanser, inflamatuvar ve immun hastalıklara sebebiyet verebilir. Memelilerde NFκB ailesi 5 üyeden oluşur: RelA (p65), c-Rel, RelB, p50 ve p52 ve bu proteinler sırasıyla RELA, REL, RELB, NFKB1 ve NFKB2 genlerinden kodlanır (Hoffmann ve Baltimore 2006, Perkins ve Gilmore 2006, Vallabhapurapu ve Karin 2009). NFKB1 ve NFKB2 sırasıyla p105 ve p100 prekürsörleri olarak eksprese olur ve sonrasında kırılarak fonksiyonel transkripsiyon faktörleri p50 ve p52'ye dönüştürülür (Hoesel ve Schmid 2013). NFκB aile üyeleri, homo- ve heterodimerizasyonları için ve hedef genlerinin promoterlarındaki 'κB bölgesi' olarak adlandırılan spesifik DNA yanıt dizilerine bağlanmaları için esansiyel olan N-terminal

bölgelerinde 'Rel homoloji domainleri' (RHD) içerirler. Transkripsiyonal aktivasyon domaininin (TAD) bulunduğu C-terminal bölgeleri NF κ B üyeleri arasında korunmamıştır çünkü kısmi proteoliz ile oluşan p50 ve p52, TAD yerine glisin-zengin bölge içerir (Gupta vd 2010, Zheng vd 2011). Bu beş üyenin herbiri hücre tipine ve uyarın çeşidine bağlı olarak belirli bir gen setinin aktivasyonunu indükler. Herbir üye birbiriyle heterodimer oluşturabilir ancak bazılarının birbirine afinitesi yapıları nedeniyle daha güçlüdür. Örneğin p65/p50 ve RelB/p52 birbiriyle daha kararlı dimerler oluşturur (Huang vd 1997, Huang vd 2005). Çoğu hücrede NF κ B dimerleri sitoplazmada NF κ B inhibitörleri (I κ B) olarak adlandırılan protein ile üyeleri (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ) ile kompleks halde bulunurlar ve nükleusa translokasyonları böylece önlenir (Hayden ve Ghosh 2008).

Uyarana ve hücre türüne bağlı olarak NF κ B aktivasyonu iki farklı yolak aracılığıyla sağlanır: kanonikal yolak (NF κ B esansiyel modülatör (NEMO)-bağımlı yolak) ve non-kanonikal yolak (NEMO-bağımsız yolak). İki yolda da NF κ B aktivasyonu, I κ B kinaz (IKK) komplekslerinin aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir. IKK kompleksleri ya katalitik kinazlar IKK α , IKK β ve düzenleyici protein NEMO (IKK γ) tarafından ya da IKK α homodimerleri tarafından oluşturulur (Israel 2010, Arkan ve Greten 2010). Kanonikal yolak öncelikli olarak TNF reseptör aile üyeleri, Toll reseptör aile üyeleri ve antijen reseptörleri gibi pro-inflamatuar reseptörlerin uyarılması aracılığıyla aktive edilir. Ayrıca belirli anti-kanser terapileri de bu yolağı aktive edebilir. Bu reseptörler IKK kompleksini (IKK α , IKK β ve NEMO) aktive eder ve aktive olan IKK kompleksi I κ B ubiquitinasyonunu kolaylaştırır ve fosforilleyerek 26S proteozom tarafından degradasyonunu sağlar. Sonrasında p65/p50 ve c-Rel/p50 dimerleri nükleusa geçer ve hedef genlerinin ekspresyonunu aktive eder (Gupta vd 2010, Chen ve Chen 2013). Non-kanonikal yolak LT β R, CD40 ve BAFFR'den oluşan spesifik TNF reseptörlerinin uyarılması ile aktive edilir ve lenfoid organların üretimi, B-hücre olgunlaşması ve adaptif immünitede rol oynar (Israel 2010, Espinosa vd 2011). Non-kanonikal yolda 'NF κ B-indükleyici kinaz' (NIK) birikimi ve stabilizasyonu, IKK α homodimerlerinin aktivasyonunu uyarır. Bunun üzerine sitoplazmada inaktif olarak bulunan RelB/p100 kompleksindeki p100, C-terminalindeki glisin-zengin rezidülerine fosfat grubu transferi sonucu ubiquitinlenir ve p52'ye dönüştürülür. Aktive olan RelB/p52 heterodimeri nükleusa transloke olarak hedef genlerinin ekspresyonlarını indükler (Gupta vd 2010, Sun 2011). Normal hücrelerde NF κ B aktivasyonu, çoğunlukla aktivasyonu sonlandıran bir feedback döngüsü nedeniyle geçicidir. Sürekli NF κ B aktivasyonunun önlenmesi hem kanonikal hem de non-kanonikal yolda IKK inaktivasyonu ile sağlanır. Bunun için upstream

NF κ B yolağında rol oynayan aktivatörlerin (kanonikal yolakta RIP, non-kanonikal yolakta NIK) IKK-aracılı fosforilasyonu gerçekleştirilerek proteozomal degradasyonları sağlanır. IKK'lar kendilerini de fosforilleyerek inhibe edebilirler (Israel 2010, Arkan ve Greten 2010). NF κ B aktivasyonunun diğer represörleri A20 ve CYLD'dir. Bu iki protein, K-63 deubikütinasyonuna aracılık eder ve sonrasında TRAF (TNF-associated factor), RIP ve IKK γ gibi NF κ B aktivasyonu için gereken sinyal moleküllerinin inaktivasyonunu gerçekleştirir (Wertz ve Dixit 2010, Harhaj ve Dixit 2010). Bu NF κ B represörleri aynı zamanda NF κ B hedef genleri arasında olduğu için negatif feedback mekanizmasıyla fonksiyon gösterirler. Ayrıca NF κ B'nin p65 altbiriminde meydana gelen post-translasyonel modifikasyonların (fosforilasyon, ubikütinasyon ve metilasyon) IKK/NF κ B sinyalleşmesini etkilediği gösterilmiştir (Perkins 2006).

Nükleusta NF κ B kompleksi, DNA molekülü üzerinde hedef genlerin promoter bölgelerindeki ' κ B bölgeleri' olarak adlandırılan özel bağlanma motiflerini tanır ve bağlanır. Bu bağlanma motifi 5'-GGGRNYYYCC-3' (R: pürin; Y: pirimidin, N: herhangi nükleotid) olarak saptanmıştır. Bazal transkripsiyon mekanizmaları bu motif üzerinde birleşir ve hatta AP-1, CBP gibi kromatin remodelleyici proteinler ve p300 gibi diğer transkripsiyon faktörleri ile NF κ B bu motif üzerinde etkileşim kurabilir (Hoesel ve Schmid 2013). Diğer transkripsiyon faktörleri ile fiziksel etkileşim NF κ B'nin DNA'ya bağlanma ve gen ekspresyonunu aktive etme yeteneğini etkileyebilir. Aktivasyonunu ve fonksiyonunu etkileyen bu çok sayıdaki faktör nedeniyle NF κ B bazı durumlarda pro-inflamatuar ya da anti-inflamatuar düzenleyici olarak karşıt roller oynayabilir (Pires vd 2018).

2.3.1. NF κ B ve kanser

Hücre sağkalımında, invazyonda, anjiyogenezde ve metastazda rol oynayan genleri upregüle etmesi nedeniyle NF κ B yolağı, birçok kanser türünün başlamasında ve progresyonunda önemli rol oynayabilmektedir. Çeşitli tipteki malignansilerde NF κ B'nin sürekli aktivasyonu görülür. Bunun nedeni NF κ B aile üyelerini ya da onların negatif regülatörlerini kodlayan genlerin ekspresyonlarındaki değişimler ya da pro-inflamatuar sitokinler gibi NF κ B indükleyicilerin tümör mikroçevresindeki sürekliliği olabilir (Perkins 2007). Uzun süreli kronik inflamasyon, hasarlı dokularda ve mikroçevresinde genetik dizilerin ve epigenetik profilin değişimine yol açarak DNA hasar birikimine neden olduğu için tümörögenizde rol oynar. İnflamasyon immün sistemin tümör hücrelerine saldırmasını

engeller ve hücre proliferasyonunu ve genetik kararsızlığı indüklediği için onkogenik mutasyonlara neden olur (Xia vd 2014). NF κ B, kanser ve inflamasyon arasındaki ilişkiye birçok adımda aracılık eden başlıca yolaktır. Tümör dokularında artan NF κ B aktivitesi ve pro-inflamatuar sitokinlerin birikimi tümörogenik mikroçevrenin oluşumunu destekler. Diğer yandan, kronik inflamatuvar mikroçevre immünbaskılanmaya neden olur ve tümörün immüngözetimden kaçışını destekler. İnflamasyonun olduğu bölgedeki nötrofil ve makrofajlar tarafından salınan ROS nedeniyle genomik kararsızlık ve DNA hasarı desteklenir. Ayrıca immün hücrelerden salınan ROS ve sitokinler NF κ B yolağını aktive edebilir ve pozitif feedback döngüsüne neden olabilir. Bunun yanında ROS, sitokinler ve diğer bir inflamatuvar regülatör prostaglandin E2 (PGE2), DNA tamir mekanizmalarını da baskılayarak genetik mutasyonların birikimine yol açar (Collata vd 2009). NF κ B yolağının kanser gelişimindeki öncelikli rolü kronik inflamasyonu indüklemesi ve desteklemesiyle olsa da hücre proliferasyonunu uyararak, apoptozu baskılayarak, anjiyogenezi regüle ederek, metaztazi destekleyerek ve tümör metabolizmasının remodellenmesinde doğrudan rol oynayarak farklı hücreyel yollar üzerinden de tümörögenez sürecine katılır.

Apoptozun NF κ B-aracılı önlenmesi tümör gelişimini destekleyen ve kanser terapilerine direnç gelişimine neden olan mekanizmalardan biridir (Nakanishi ve Toi 2005, Ralhan vd 2009). NF κ B'nin anti-apoptotik rolü üzerine yapılan çalışmalar bu transkripsiyon faktörünün Bcl-2 aile üyeleri, c-Flip ve IAP'lar (apoptoz inhibitörleri) gibi anti-apoptotik proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (Karin 2006). Ayrıca NF κ B aktivasyonu ROS-bağımlı apoptozu ve nekrozu baskılayan anti-oksidan proteinlerin ekspresyonunu upregüle eder (Naugler ve Karin 2005, Luo vd 2008). NF κ B'nin onkogenik rolüne ilk kanıt c-Rel'in retroviral bir gen olan v-Rel onkogenine homolojik benzerlik gösterdiğinin anlaşılmasıyla ortaya çıkmıştır (Basseres ve Baldwin 2006). Daha sonra da birçok kanser türünde NF κ B'nin sürekli aktivasyonu saptanmıştır. Ancak NF κ B'nin kanser üzerindeki rolü her koşulda tümörögenez destekleyici yönde değildir. Örneğin araştırmacılar NF κ B-Snail yolağının upstream düzenleyicisi olan LCN2'nin p65 fosforilasyonunu inhibe ederek p65'in ve Snail'in nüklear birikimine yol açtığını ve NF κ B yolağını inhibe ettiğini, böylelikle kolorektal kanser hücrelerinin epitelyalden-mezenşimale geçişini (EMT) ve metastazını inhibe ettiğini göstermişlerdir (Feng vd 2016). Sonuç olarak NF κ B yolağı farklı kanser türlerinde farklı etkilere sebep olabilir.

2.3.2. NFκB ve otofaji sinyal yolları arasındaki etkileşim

2.3.2.1. NFκB sinyal yolağı bileşenlerinin otofaji aracılı degradasyonu

Belirli sinyal yollarındaki proteinlerin doğru katlanmasından ve olgunlaşmasından sorumlu olan şaperon proteini 'ısı şok proteini 90' (Hsp90)'nın fonksiyonu kimyasal yolla inhibe edildiğinde IKKα, IKKβ ve IKKγ otofaji aracılığıyla degrade edilir (Qing vd 2006, Yan vd 2007). Otofaji inhibe edildiğinde ise IKK degradasyonu önlenir ancak Hsp90'nın diğer bir substratı olan ve proteozomal yolak aracılığıyla gerçekleşen Akt degradasyonu bu durumdan etkilenmez. Ayrıca non-kanonik NFκB yolağında rol oynayan IKKα aktivatörü NIK, Hsp90 ile etkileşim kuran bir proteindir. NIK/Hsp90 etkileşiminin bozulması NIK'in otofaji-aracılı degradasyonu ve dolayısıyla NFκB aktivitesinin inhibisyonuyla sonuçlanır (Qing vd 2007). Bu kanıtlar Hsp90'nın otofaji ve NFκB yolları arasında düzenleyici bir köprü görevinde olduğunu göstermektedir (Xiao 2007). Otofaji ile NFκB ilişkisinde rol oynayan bir diğer protein Keap1'dir (Kelch-benzeri ECH-ilişkili protein 1). TNF uyarımına yanıt olarak Keap1, IKKβ fosforilasyonunun inhibisyonu ve otofaji-aracılı IKKβ degradasyonuna neden olarak NFκB aktivasyonunu negatif yönde regüle eder (Yu vd 2011). Colleran ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla NFκB inhibitörü IκBα'nın yeni bir otofaji substratı olduğu ortaya konmuştur. TNF uyarımını takiben IκBα'nın degradasyonu otofaji-aracılı olabilmektedir. Sonuç olarak otofaji IKK degradasyonunu gerçekleştirerek NFκB inhibisyonuna ya da IκBα degradasyonunu gerçekleştirerek NFκB'nin sürekli aktivasyonuna neden olabilir (Colleran vd 2011). Ro52 proteini IKKβ'yi otofaji-aracılı degradasyon için hedefleyen bir diğer sinyal molekülüdür (Niida vd 2010). Tüm bunları özetleyecek olursak Hsp90, Keap1 ve Ro52, IKK'lar (özellikle IKKβ) ile etkileşerek NFκB ve otofaji yolları arasındaki etkileşime aracılık ederler. Farklı uyarılara karşı IKK'lar ile kurdukları spesifik etkileşimler, otofaji-aracılı IKK degradasyonunu baskılayarak ya da aktive ederek NFκB aktivitesini regüle ederler. Bazı otofaji regüle eden proteinlerin de aynı zamanda NFκB aktivitesini regüle ettikleri raporlanmıştır. Örneğin kargo reseptör proteini p62 (SQSTM1); TNF, IL-1 RANK ligandı gibi uyarılara yanıt olarak NFκB aktivasyonu sağlar (Moscat ve Diaz-Meco 2009). Ancak bazı çalışmalarda da p62'nin negatif NFκB regülasyonunda rol oynadığı gösterildiği için bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Mathew vd 2009). Esansiyel otofaji ilişkili protein olan Beclin1'in de sigara dumanına maruz kalan hücrelerde

NF κ B aktivitesini regüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca farelerde Beclin1'in heterozigot knockoutu p65 fosforilasyonunu artırır (Kim vd 2008).

2.3.2.2. Otofajinin NF κ B-aracılı regülasyonu

TNF uyarımına yanıt olarak çoğu hücrede kanonikal NF κ B aracılığıyla NF κ B aktive edilir ve birçok anti-apoptotik ve anti-oksidan genlerin aktivasyonuna neden olur (Dutta vd 2006, Karin ve Gallagher 2009). NF κ B'nin TNF-bağımlı aktivasyonu, Ewing sarkomalarında, meme ve lösemi kanser hücre hatlarında otofajiyi baskımlarken, bu hücrelerde NF κ B aktivasyonunun kaybı otofaji reaktivasyonuna neden olur (Djavaheri-Mergny vd 2007, Djavaheri-Mergny vd 2007). TNF ile uyarılan hücrelerde otofajinin baskılanması mTOR yolağının aktivasyonu ile ilişkilidir. Bununla tutarlı olarak IKK aktivasyonunun belirli hücre tiplerinde mTOR aktivasyonu için gerekli olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Lee vd 2007, Dan vd 2007, Dan ve Baldwin 2008). Otofajinin NF κ B-aracılı negatif regülasyonunu destekleyen diğer bir çalışmada da NF κ B aktivitesinin inhibisyonu kötü prognozlu myelodisplastik sendromlu hastalarda starvasyon-indüklü otofajiyi desteklemektedir (Fabre vd 2007). Bunun yanında NF κ B'nin otofajiyi desteklediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin; ısı-şok stresi süresince NF κ B aktivasyonu, otofajiyi indükleyerek biriken agregat ve yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonunu sağlar ve böylece hücre sağkalımını destekler (Nivon vd 2009). Diğer bir çalışmada da glangliosid-astrofit aktivasyonu kapsamında NF κ B aktivasyonunun otofaji-bağımlı hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir (Hwang vd 2010). Toll-like reseptör-aracılı otofaji ve NF κ B sinyal yolağı arasındaki ilişkiyi TLR4 agonisti lipopolisakkarit kullanarak makrofaj hücre hattında gösteren bir çalışma TLR4-sinyal kompleksinin NF κ B upstreamindeki aktivatör TRAF6 aracılığıyla Beclin1 ubiquitinasyonuna yol açarak otofajiyi desteklediğini göstermiştir. Ancak diğer bir NF κ B hedef gen ürünü olan A20 adlı deubikütinasyon enzimi ise Beclin1 deubikütinasyonu ile otofajiyi sınırlandırır. Bu çalışma NF κ B'nin otofajinin ya aktivatörü ya da inhibitörü olarak davranabildiğini ve bunun sinyal süresine ve hücre tipine göre değişebildiğini gösteren bir çalışmadır (Shi ve Kehrl 2010).

İnsan *Beclin1* geninin promoter bölgesindeki dizi analizleri bu bölgede birkaç NF κ B bağlanma motifi bulunduğunu göstermiştir. Bu da NF κ B'nin *Beclin1* gen ekspresyonunu regüle edebildiği anlamına gelir. Özellikle NF κ B aile üyelerinden p65'in, *Beclin1* promoterındaki κ B bölgesine spesifik olarak bağlandığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla

gösterilmiştir (Copetti vd 2009). Ancak p65-bağımlı Beclin1 upregülasyonu, uyarıcı çeşidine ve hücre çeşidine bağlıdır (Nivon vd 2009). Bunun yanısıra NFκB aile üyeleri diğer transkripsiyon faktörleri ile iş birliği içerisinde de pro-otofajik genlerin ekspresyonlarını regüle edebilir. Örneğin; *Skp2* (S-phase kinase-associated protein 2) geni bir NFκB hedef genidir ve bu genin ürünü ubiquitin ligaz kompleksinde yer alarak otofaji yolağını aktive eder (Barre ve Perkins 2010). NFκB up- ya da downstreaminde yer alan bazı proteinler de otofaji regülasyonunda rol oynar. Örneğin; IKK kompleksinin upstream kinazı olan TAK1 (Transforming growth factor-β activating kinase 1) meme epitelyal hücrelerinde AMP-aracılı mTORC1 inhibisyonu aracılığıyla otofajiyi destekler (Herrero-Martin vd 2009). Sonuç olarak NFκB doğrudan kendisi pro-otofajik genlerin transkripsiyonunu regüle ederek, NFκB yolağında regüle edici rol oynayan proteinler aracılığıyla dolaylı yoldan ya da diğer transkripsiyon faktörleriyle iş birliği içerisinde yer alarak otofajiyi inhibe ya da aktive edebilir. Otofajinin NFκB-aracılı inhibisyonu ya da aktivasyonu hücre tipine ve uyarıcının türüne bağlıdır.

2.3.3. Kanser tedavisi yaklaşımı olarak NFκB ve otofaji arasındaki ilişkinin hedeflenmesi

Mevcut kullanılan anti-kanser terapileri arasında hem otofaji mekanizmasını hem de NFκB yollarını etkileyebilen yaklaşımlar bulunmaktadır (Tablo 2.4). Otofaji ve NFκB yolları arasındaki fonksiyonel etkileşime ilişkin temel bilgiler, kanser tedavilerinin etkinliğini arttırmak için her iki yolağı da hedefleyen ilaçların kombine kullanımına yönelik yeni stratejiler geliştirilmesine ipuçları sağlayabilir. Örneğin multiple myeloma hastalarında otofajinin inhibitörü olan hidroksiklorokin, bortezomib adlı NFκB yolağını hedefleyen bir molekülle birlikte kullanımına yönelik Faz I-II klinik çalışmaları tamamlanmış ve bu iki ilacın birlikte kullanımının hastalarda tolere edilebilir olduğu ve proteazom inhibisyonu ve otofajinin son basamağında inhibisyonu ile kanser hücrelerinde biriken otofagozom nedeniyle artan hücre ölümüne neden olduğu raporlanmıştır (Vogl vd 2014). Klorokin adlı otofaji inhibitörünün anti-tümör etkisi birçok farklı çalışmayla da gösterilmiştir. Otofajiyi inhibe ederek tümör hücre ölümünü indüklemesinin yanında tümör hücrelerinde direnç yollarını da indükleyebilir. Melanoma ve skuamöz karsinoma hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada klorokin otofagozom birikimine, p62 upregülasyonuna ve JNK sinyal yolağı aktivasyonuna neden olarak NFκB'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle NFκB yolağını bloke etmenin klorokin anti-kanser etkisini arttıracığı ortaya konmuştur (Yang vd 2017).

Tablo 2.4 Günümüzde kullanılan anti-kanser ilaçları arasında otofaji mekanizmasını ve NF κ B sinyal yollarını hedefleyenler ve etki mekanizmaları (Trocoli ve Djavaheri-Mergny 2011)

İlaç	Etki Şekli	NF- κ B üzerine etkisi	Otofaji üzerine etkisi
Otofajiyi hedefleyen ilaçlar			
Rapamisin ve analogları (CCI-779, RAD001, AP23573)	mTOR inhibisyonu	İnhibisyon /aktivasyon	Aktivasyon
Hidroksiklorokin	Lizozom ile otofagozom birleşmesini engeller	İnhibisyon /aktivasyon	İnhibisyon
NF-κB'yi hedefleyen ilaçlar			
Bortezomib (PS-341, Velcade)	I κ B'nin proteozomal degradasyonunu inhibe eder	İnhibisyon	İnhibisyon/aktivasyon
Doğal ürünler (kurkumin, resveratrol)	IKK aktivitesini inhibe eder	İnhibisyon	Aktivasyon

2.4. Hipotez

Doktora tez çalışmamızın literatür taraması kapsamında sunulan bilgiler doğrultusunda hipotezleri şu şekildedir:

1. Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde, birçok önemli selüler proseste düzenleyici rol oynayan NF κ B sinyal yolağının otofaji mekanizması üzerinde de düzenleyici rolü olduğu öngörülmektedir.
2. Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde olası NF κ B-aracılı otofaji regülasyonunun aydınlatılması ve rol oynayan aracı genlerin tespit edilmesi literatüre önemli bir katkı sunacak ve bu iki mekanizmayı hedefleyen tedavi stratejilerine ışık tutabilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında deneysel model olarak H1299 KHDAK hücre hattı kullanıldı. Kültür şartları %10 Fetal Bovine Serum ve %0,5'lik penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 (Kat. No:52400-025, Gibco) besiyerinde, 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava içeren şartlarda gerçekleştirildi.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışması süresince kullanılan kimyasalların marka isimleri ve katalog numaraları aşağıda belirtilmektedir.

Torin1 (Kat. No: #14379) adlı kimyasal Cell Signaling Technology'den temin edilmiş olup otofajiyi indüklemek için kullanıldı.

LC3B (Kat. No: #3868), Phospho-NFκB (Kat. No: #3033) ve GAPDH (Kat. No: #5174) antikorları Cell Signaling Technology'den, NFκB (Kat. No: sc-372) antikoruna ise SantaCruz Biotechnology'den temin edildi. HRP-konjuge anti-rabbit sekonder antikor (Kat. No: 5450-0010) Seracare Inc.'den temin edildi. İmmünfloresans deneylerinde kullanılan Alexa Fluor-488-konjuge anti-rabbit (Kat. No: A27034) sekonder antikor Thermo Fisher Scientific'den temin edildi.

NFκB overekspresyonu için kullanılan pcDNA3.1 ve p65 plazmid vektörleri Prof. Dr. Osman Nidai Özeş'ten temin edildi.

NFκB mRNA'sını özgün olarak hedef alan small interfering-RNA (NFκB p65 siRNA) (Kat. No:6261) ve hiçbir mRNA'yı hedef almayan negatif kontrol siRNA (Kat. No:6568) Cell Signaling Technology'den alındı.

Plazmid vektör transfeksiyonları ve siRNA transfeksiyonları için Lipofectamin 2000 (Kat. No:11668019, Thermo Fisher Scientific) ve Opti-MEM besiyeri (Kat. No: 31985062, Thermo Fisher Scientific) kullanıldı.

3.3. H1299 Hücreleri için Optimum Torin1 Dozunun Ayarlanması

H1299 hücreleri, otofajinin negatif regülatörü mTOR'un inhibitörü olan "Torin1" ile 24 saat muamele edilerek otofajinin maksimum düzeyde olduğu Torin1 konsantrasyonu LC3BII antikoruna (otofaji tespitinde kullanılan belirteç) kullanılarak western blot yöntemi ile saptandı. Bunun için 6-kuyucuklu plakalara kuyu başına $0,5 \times 10^6$ hücre olarak ekilen H1299 hücreleri %80-85 yoğunluğa ulaştığında artan konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 100, 250 nM) Torin1 uygulanarak ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler RIPA tamponu ile toplandı. Toplanan hücrelerden elde edilen protein lizatları ile %12'lik SDS PAGE jelinde yürütme sonrası western blot analizi yapıldı. Otofaji çalışmalarında otofagozom membranında bulunması nedeni ile otofaji belirteci olarak kullanılan LC3BII proteinine özgün antikor kullanılarak protein ekspresyon düzeyleri saptandı. Bundan sonraki denemelerde bu optimum konsantrasyon değerinde Torin1 kullanıldı.

3.4. Plazmid Vektörü ve siRNA Transfeksiyonları

NFκB overekspresyonunu gerçekleştirmek için pcDNA3.1-p65 vektörünün transfeksiyonu için aşağıdaki protokol uygulandı. Negatif kontrol grubuna ise pcDNA3.1-Mock vektörü transfekte edildi.

1. 10ml'lik petri kaplarında kültüre edilen H1299 hücre hatları, konfluent olduklarında tripsin edilerek 6-kuyucuklu plakalara $0,5 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde ekildi ve bir gece %5 CO₂ ve %95'lik nem ve 37°C'de inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrası transfeksiyon işlemi için A tüpü (3 µg plazmid ve Opti-MEM ile 125 µl tamamlandı) ve B tüpü (5 µl Lipofectamine 2000 ve 120 µl Opti-MEM) olacak şekilde iki adet tüp hazırlandı.

3. A tüpündeki plazmid+Opti-MEM, Lipofectamine 2000+Opti-MEM karışımını içeren B tüpüne aktarıldı ve nazikçe pipetaj yapıldı ve 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Transfeksiyon için ekilen hücrelerin besiyerleri çekildi ve yerine 1750  l taze besiyeri eklendi.
5. Inkübasyon süresi biten transfeksiyon karışımı 6-kuyucuklu platelerdeki hücrelerin besiyerine nazikçe ilave edildi.

NFkB ekspresyonunun geçici baskılanması için siRNA transfeksiyonu aşağdaki protokol izlenerek gerçekleştirildi. Negatif kontrol olarak hiçbir mRNA'yı hedef almayan siRNA kullanıldı.

1. 10ml'lik petri kaplarında kültüre edilen H1299 hücre hatları, konfluent olduğunda tripsin ile kaldırılarak 6-kuyucuklu platelere $0,5 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde ekildi ve bir gece %5 CO₂ ve %95'lik nem ve 37°C'de inkübe edildi.
2. Inkübasyon sonrasında transfeksiyon işlemi için A tüpü (10  M ana stoktan 5  l siRNA ve 120  l Opti-MEM) ve B tüpü (5  l Lipofectamine 2000 ve 120  l Opti-MEM) olacak şekilde iki adet t p hazırlandı.
3. A tüpündeki siRNA+Opti-MEM, Lipofectamine 2000+Opti-MEM karışımını içeren B tüpüne aktarıldı ve nazikçe pipetaj yapıldı ve 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Transfeksiyon için ekilen hücrelerin besiyerleri çekildi ve yerine 1750  l taze besiyeri ile eklendi.
5. Inkübasyon süresi biten transfeksiyon karışımı 6-kuyucuklu platelerdeki hücrelerin besiyerine nazikçe ilave edildi.

3.5. Western Blot Analizi

3.5.1. Protein izolasyonu

Western blot analizleri için protein izolasyonu aşağıdaki protokol izlenerek gerçekleştirildi.

1. İnkübasyon süresini tamamlayan hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve soğuk fosfatla tamponlanmış tuzlu su (PBS) ile 2 defa yıkandı.
2. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin bulunduğu kültür kapları buzun üstüne alındı ve önceden hazırlanan 1X proteaz (Kat. No: 5871, Cell Signaling Technology) inhibitör kokteyli içeren RIPA (Kat. No: 9806, Cell Signaling Technology) tamponu hücre yoğunluğuna bağlı olarak 250-300 µl olacak şekilde hücrelerin üzerine eklendi.
3. RIPA tamponu eklenen hücreler 5-10 dakika buz üstünde inkübe edildi.
4. Sonrasında %95 güçte ve saniyede 1 döngü olacak şekilde ayarlanan sonikatör cihazı (Serie 2000.2, Bandelin Sonoplus) kullanılarak örnekler yaklaşık 30 saniye sonikasyon işlemine tabi tutuldu.
5. Sonikasyon işlemi sonrasında örnekler, 12.000 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatant temiz bir tüpe alınarak protein saflaştırıldı ve örnekler kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.5.2. Protein miktar tayini

Saflaştırılan protein miktarı Bradford protein miktar tayini yöntemi ile ölçüldü. 1/1000 sulandırılan 800 µl olacak şekilde hazırlanan örneklerden ve BSA standartları için 25, 12,5, 5, 2,5 ve 1 µg/ml olacak şekilde sulandırılan 800 µl hacminde BSA solüsyonlarından hazırlandı ve her birine 200 µl Bradford reaktifi (Kat. No:500-0006, BioRad) eklendi. Hazırlanan örnekler ve standartlar üç tekrarlı olarak 96-kuyucuklu plakelere konuldu ve 595 nm dalga boyunda Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı ile absorbans değerleri ölçüldü.

3.5.3. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve PVDF membrana transferi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (SDS-PAGE) kullanılan jelin elde edilmesi için gereken solüsyonların hazırlanışı aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir. Separating (Ayrıştırma) ve Stacking (Yükleme) jellerinin dökümü, yürütme ve transfer işlemleri için kullanılan kimyasalların oranları ve miktarları Tablo 3.1'de belirtilmiştir.

1. Separating (Ayrıştırma) Tamponu: 1,5 M Tris bazı (pH: 8,8). Tris (Kat. No: TRS001, BioShop) kimyasalından 18,17 gr tartılarak yaklaşık 80 ml distile su ile çözüldü pH: 8,8'e ayarlandı, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0,8 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.
2. Stacking (Yükleme) Tamponu: 0,5 M Tris bazı (pH: 6,8). Tris (Kat. No: TRS001, BioShop) kimyasalından 6,04 gr tartılarak yaklaşık 80 ml distile su ile çözüldü pH: 6,8'e ayarlandı, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı ve 0,8 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.
3. %10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 10 gr SDS tartılarak 100 ml distile su ile çözüldü ve 0,8 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.
4. %10 Amonyum persülfat (APS): Her jel dökümü için taze hazırlandı. 0,1 gr APS (Kat. No:1610700, BioRad) tartılarak 1 ml distile su ile çözüldü ve kullanılıncaya kadar +4°C 'de saklandı.
5. 4X Yükleme tamponu: 900 µl Laemli Tamponu (Kat.No: 1610747, BioRad), 100 µl β-merkaptotanol (Kat. No:805740, MerckMillipore)
6. Running (Yürütme) Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0,1 SDS): 3,03 gr Tris bazı, 14,26 gr Glisin (Kat. No: GLN002, BioShop) ve 1 gr SDS (Kat. No: SDS001, BioShop) tartılarak dH₂O ile çözüldü.
7. Transfer Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0,05 SDS): 2,42 gr Tris bazı, 11,41 gr Glisin ve 0,4 gr SDS tartılarak dH₂O ile çözüldü. Aynı bir mezüre 200 ml metanol konuldu. Transfer işlemine kadar hem tampon hem de metanol +4°C'de soğutuldu. Transfer işleminden hemen önce tampon ve metanol karıştırıldı.

Tablo 3.1 Separating (Ayrıştırma) ve Stacking (Yükleme) jel formülasyonları.

	Separating (Ayrıştırma) Jeli %12	Stacking (Yükleme) Jeli %4
dH ₂ O	5 ml	4.77 ml
%30 Akrilamid/bis-akrilamid (29:1, Kat. No: 1610156, BioRad)	6 ml	1,1 ml
1,5 M Tris pH: 8.8	3,75	-
0,5 M Tris pH: 6.8	-	2 ml
%10 SDS	150 µl	80 µl
%10 Amonyum persülfat	45 µl	40 µl
TEMED (Kat. No:1610800, BioRad)	7,5 µl	8 µl
TOPLAM	~15 ml	~8 ml

Western blot analizleri Mini-PROTEAN (BioRad) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Jel dökümü için sistemin kalın ve ince camları saf su ile yıkanıp %70'lik etanol ile temizlendikten sonra sistemin jel dökme aparatına yerleştirildi. Yüklemeye ve ayrıştırma jelleri Tablo 3.1'de verilen formülasyona göre gradient jel elde etmek için eş zamanlı olarak 2 ayrı tüpte hazırlandı. Temed kimyasalı iki tüpe de konulduktan sonra vakit kaybetmeden ve mümkün olduğunca köpürtmeden karıştırıldı. 10 ml'lik bir pipet ile önce ayrıştırma jel solüsyonundan 3 ml sonra yüklemeye jel solüsyonundan 10 ml çok yavaş ve hava kabarcığı oluşturmamaya özen göstererek çekildi. Sonrasında pipet yaklaşık 45°'lik açıyla eğik tutularak pipet içerisine hava çekildi ve oluşan kabarcık pipet içerisinde yukarı doğru çıkarken %12'lik jel solüsyonundan %4'lük solüsyona doğru gradient azalan bir jel solüsyonu oluşumu sağlandı. Bu %4-12 jel solüsyonu kalın camın üst kısmından yavaşça döküldü. Ardından taraklar nazikçe yerleştirildi ve jelin polimerize olması beklendi.

Dökülen ayrıştırma jeli polimerize olurken örnekler jele yüklenmek üzere hazırlandı. Daha önceden konsantrasyonları belirlenen örneklerden 50 µg olacak şekilde alınarak steril bir eppendorfa aktarıldı. Örnek hacminin 1/3'ü oranında 4X yüklemeye tamponu eklendi ve 95°C'de 5 dakika kaynatıldı. Tamamen polimerize olan SDS-PAGE jel, sistemin yürütme tankına alındı ve yürütme tamponu eklendi. Hazırlanan örnekler kuyulara yüklendi ve 100

voltta 90 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi ile jel içerisinde ayrışan protein örnekleri, SDS-PAGE jelden PVDF (polyviniliden difluorür) membrana (Kat. No: IPVH00010, Merck Millipore) daha önceden hazırlanan transfer tamponu içerisinde 4°C'de 90 mAmp'de yaklaşık 16 saat boyunca ıslak transfer yöntemi ile transfer edildi.

3.5.4. İmmunoblotlama

PVDF membrana transfer olan protein örnekleri immünoblotlama için ilgili primer antikorla işaretlendi. Bunun için, membran %5'lik yağsız kuru süt tozu (Kat. No: 170-6404, BioRad) içeren 25 mM Tris pH:7,6, 34 mM NaCl (Kat. No: SOD001, BioShop), %1 Tween20 (Kat. No:1706531, BioRad) TBS-T çözeltisi içerisine alınarak oda sıcaklığında 1 saat bloklama işlemi yapıldı. Daha sonra membran, 1:1000 oranında ilgili primer antikor içeren %5'lik süt tozu içeren TBS-T solüsyonuna alınarak 4°C'de gece boyu çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membran oda sıcaklığında TBS-T solüsyonu içerisinde 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez çalkalanarak yıkandı. Yıkama işleminin ardından membran 1:5000 oranında ilgili HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor (Kat. No: 5450-0010, Seracare) ve %5'lik süt tozu içeren TBS-T solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membran oda sıcaklığında TBS-T solüsyonu ile 10'ar dakika süresince 3 kez çalkalanarak yıkandı. Bu işlemler sonrasında Enhanced Chemiluminescence (ECL Kat. No: WBLUF0500, Millipore) solüsyonu kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatıldı ve spesifik protein bantları Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) görüntüleme cihazı ile elde edildi.

3.6. İmmunofloresans

İnkübasyon süreleri biten hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı. Ardından hücreler %4 taze hazırlanmış formaldehit (Kat no: 252549, Sigma) ile fikse edildi ve hücre membranı geçirgenliğinin sağlanabilmesi için %0,1 Triton X-100 (Kat no: 28314, Thermo Fisher Scientific) içeren PBS ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitince Triton X-100 solüsyonu uzaklaştırıldı ve 1:100 oranında ilgili antikor, %3 BSA (Kat no: sc-2323, Santa Cruz) ve %0,08 glisin içeren PBS içerisinde 4°C'de 1 gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitince, 1:300 oranında Alexa Fluor-488-konjuge anti-rabbit (Kat. No: A27034, Thermo Fisher Scientific) (kırmızı), %3 BSA ve %0,08 glisin içeren PBS

içerisinde 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler flouresans mikroskop ile görüntülendi ve 20X büyütmede fotoğrafları alındı.

3.7. Total RNA İzolasyonu

H1299 hücrelerinde plazmid vektörü ile NFκB overeksprese edilerek ve siRNA-aracılı NFκB susturulması sağlanarak bu hücrelerden QIAGEN miRNAeasy kit ile total RNA izolasyonu firmanın protokolüne uygun olarak aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

1. Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve soğuk PBS ile yıkandı.
2. 500 µl Qiazol Lysis Reagent ile hücreler pipetajlanarak toplandı ve steril bir eppendorfa aktarıldı.
3. Örnekler 30 saniye vortekslenerek homojenize edildi ve 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
4. Homojenize olan örneklere 125 µl kloroform eklendi, 20 saniye şiddetli şekilde vortekslendi ve 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında örnekler 15 dakika 4°C'de 12000 g'de santrifüj edildi.
5. Akışkan faz, beyaz renkte ve orta kısımda bulunan DNA içeren faza temas etmeden pipet yardımıyla alınarak steril bir eppendorfa aktarıldı ve üzerine alınabilen akışkan faz hacminin 1,5 katı kadar %100'lük etanol nazikçe pipetaj yapılarak eklendi.
6. Karışım bekletilmeden RNeasy MinElute spin kolona aktarıldı ve 15 saniye oda sıcaklığında 8000 g'de santrifüj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
7. Ardından kolona 700 µl RWT tamponu eklendi, 15 saniye 8000g'de santrifüj edildi, yeni toplama tüpüne alındı. Sonrasında 500 µl RPE tamponu eklenerek 15 saniye 8000 g'de santrifüj edildi ve filtre yeni bir toplama tüpüne alındı.
8. Ardından kolona 500 µl %80 etanol eklendi ve 2 dakika 8000 g'de santrifüj edildi.
9. Kolon, tekrar yeni bir toplama tüpüne aktarılarak kurutulması için 5 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
10. Son olarak kolon steril bir eppendorf tüpe alındı ve kolonun tam ortasına denk gelecek şekilde 14 µl nükleaz içermeyen dH₂O eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 1 dakika oda sıcaklığında 16000 g'de santrifüj

edildi. Total RNA örnekleri kalite ve miktarları Nanodrop cihazı ile ölçüldükten sonra kullanılıncaya kadar -80°C 'de saklandı.

3.8. Total RNA'dan cDNA Sentezi

qRT-PCR analizi gerçekleştirmek üzere örneklerden izole edilen total RNA'ların cDNA'ya dönüşümleri High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Kat. No:00342824) aracılığıyla gerçekleştirildi. Tüm örneklerin konsantrasyonları ölçülerek 2 μg olacak şekilde reaksiyon karışımında kullanıldı. Reaksiyon koşulları Tablo 3.2'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2 Total RNA'yı cDNA'ya dönüştürme reaksiyon bileşenleri ve koşulları

Total RNA (2 μg olacak şekilde konuldu)	x μl
10X RT Buffer	2 μl
25X dNTP Karışımı (100mM)	0,8 μl
10XRT Random Primerler	2 μl
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1 μl
Nükleaz içermeyen su	4,2 μl
TOPLAM	10 μl
Reaksiyon koşulları: 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk, 4°C'de ∞	

3.9. RNA Sekanslama (RNA-seq)

H1299 hücreleriyle oluşturulan NF κ B overeksprese edilen ve NF κ B susturulan normal şartlardaki ve otofaji indüklü şartlardaki 8 örnek grubunun total RNA'ları RNA sekans analizi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmek üzere Macrogen Inc. (Güney Kore) firmasına gönderildi. Öncelikle örneklerin total RNA'ları izole edildi ve RNA'ların kalitesi ve miktarları ölçüldü. Firma gönderdiğimiz RNA örneklerinden kontaminat DNA'nın DNaz ile uzaklaştırılması, rRNA'ların uzaklaştırılması, RNA fragmentasyonu, cDNA'ya reverse transkripsiyon, dizilere adaptörlerin bağlanması, PCR sonrası belirli uzunluktaki

fragmentlerin seçilimi ve cDNA uçlarının dizilenmesi temel adımlarını Novaseq 6000 (Illumina) cihazıyla uygulayarak RNA sekanslama gerçekleştirdi.

3.10. Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR)

RNA-seq sonuçlarının teyit edilmesi için saptadığımız genlerin mRNA ekspresyonlarının belirlenmesi için qRT-PCR işlemi, Bio-Rad CFX96 Touch cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tezimizde Tablo 3.3'te gösterilen qRT-PCR reaksiyon bileşenleri ve şartları sağlanarak Tablo 3.4'te primer dizileri yer alan 24 tane genin ve normalizasyon için de β -Aktin (*ACTB*) geninin relatif mRNA ekspresyon seviyeleri KiloGreen 2X qPCR MasterMix (abm, Kat. No: MasterMix-KS) kiti kullanılarak belirlendi

Tablo 3.3 qRT-PCR reaksiyon bileşenleri ve koşulları

cDNA (nükleaz içermeyen su ile 5 kat seyreltilmiş olarak)	4 μ l
Forward (ileri) primer (10 μ M)	0,5 μ l
Reverse (geri) primer (10 μ M)	0,5 μ l
KiloGreen 2X qPCR MasterMix	10 μ l
Nükleaz içermeyen su	5 μ l
TOPLAM	20 μ l
PCR şartları: 95°C'de 10 dakika 1 döngü, (95°C 10 saniye, 60°C 60 saniye) 45 döngü ve 65-95 °C arası 0,5°C hassasiyette erime eğrisi (melting curve)	

Tablo 3.4 qRT-PCR ile mRNA ekspresyonları değerlendirilen genler ve primer dizileri

Genler	İleri (Forward) primer (5→3)	Geri (Reverse) primer (5→3)
<i>EGR3</i>	GCTATGACCGGCAAACCTCG	CTCGGGGTACAGATTGTCAGG
<i>EBI3</i>	GAAGTACTGGATCCGTTACAAGC	GAAGGACGTGGCTTCAATG
<i>MMP15</i>	AGACGGTCGTTTTGTCTTTTTC	GTCAGCGGCTGTGGGTAG
<i>FBLN5</i>	GCGTACACAGAGAAGGCTATGTAA	CATGGTTTTGAAACACATTCTCTAA
<i>UNC13A</i>	GCAAGGGATTAGAAAAGGGCA	ATCATCTGGGTTCCGTCTGAG
<i>STK32A</i>	TCACAGGGATATGAAGCCTGAC	TCGGTCTCCTGAAACTCCAA
<i>BDH1</i>	CACAGAAAGCCTGGAAAAGGT	GACCAGCCGGATCCTCTTAAT
<i>LOC100996724</i>	TTTGATGCTGGAACTTTGGTGT	AGACACTGAGGTTGAGTGGTG
<i>LOC102724593</i>	AGGAGCATCCAAGCAGATGA	AGCTTGATCCAATCCCTCGTC
<i>MMP1</i>	CAGCTTCCCAGCGACTCTA	TTCTCCGCTTTTCAACTTGCC
<i>AP1M2</i>	CCTTTCAGGCAGCAAGAACAAA	CGTTGTCAAAGCGAGAGAGC
<i>LOC100129617</i>	ACGGTGCTGTTCTGGGATTT	CTCATCCGTGAAAGGGAGCA
<i>CSPG4</i>	ACAGAGGAACCCTGGATGGA	CCGTCACTCGGAAGAAGTGT
<i>SERINC4</i>	AGACTGTAGCTGGTTCCTGG	CCGTCACTCGGAAGAAGTGT
<i>DNAH17</i>	TGGTCTCACCAGTGGACTTCCT	GCTTGGCAGATCCTTCGATGTC
<i>TNFSF15</i>	TCACAAAGGGCCGTCTTCAT	GGCTTATCTCCGTCTGCTCT
<i>SPOCK2</i>	TCCAATAGCCAGCTCCGTG	AGTGGTTGGCACCAATACAGA
<i>TGFβ1</i>	CTCCCTGGTCAGCAATGTCA	CTCATCAGTCAGGACTCGCC
<i>SPTB</i>	AGGTGAAGCAGTACCAGGACCA	CTCCTCGCAATCTACGCAGTAG
<i>ZNF33BP1</i>	TGCCTTACACAAAAAGTTCCAAT	TGAAGGTTCTGCCACACTGA
<i>NLRP3</i>	CATTTCTCTCTAGCTGTTCTCTG	ACAGAAAGTTCTCCTGTTGGC
<i>CDRT3</i>	GACAGCTGCTTTATAGGGGGT	CATGGTCTGGACTGAACCGA
<i>MYRFL</i>	GTGTCAGGAGACTTATTGCTGC	GTCTTCTGACCATCGCCTCTGA
<i>β-ACTIN</i>	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

3.11. Biyoinformatik Araçların Kullanımı

KHDAK hücre hatlarında NFκB-aracılı otofajinin pozitif regülasyonunda rol oynayan genlerin mRNA ekspresyon profillerini belirlemek amacıyla yapılan RNA-seq analizi sonucunda elde edilen verilerin işlenmeden önceki kalite kontrolü FastQC v0.11.7 adlı program aracılığıyla gerçekleştirildi. Sonrasında ham veriler Trimmomatic 0.38 programı ile adaptör dizileri ve 36 baz çiftinden daha kısa okumalar uzaklaştırılarak işlenmiş veri haline getirildi. HISAT2 versiyon 2.1.0 programı okunan dizileri referans genom hg19 ile eşleştirip haritalama için kullanıldı. StringTie versiyon 1.3.4d programı referans genom ile eşleştirilen okunan dizilerden bilinen genleri ve potansiyel transkriptleri oluşturmak için kullanıldı. Örnek

grupları arasında ekspresyon karşılaştırmaları (DEG analizi), tespit edilen genlerin ve transkriptlerin genel yer aldığı biyolojik prosesler ve rol oynadığı moleküler fonksiyonlar için gen set zenginleştirme analizleri (GSEA) Gene Ontology veritabanı kullanılarak yapıldı (WEB_10). RNA-seq ve qRT-PCR analizleri sonucunda saptanılan genlerin tahmini promoter bölgelerindeki NF κ B bağlanma bölgelerinin tespiti "Eukaryotic Promoter Database (EPD)" adlı internet sitesi üzerinden yapıldı (WEB_12). Saptanılan genlerden eksprese olan proteinlerin NF κ B, otofaji ilişkili genler ve kendi aralarındaki olası etkileşimi STRING versiyon 11.0 adlı database kullanılarak analizlendi.

'BULGULAR' bölümünde yer alan heat map haritasında ve grafiklerde (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9) örnek isimleri kısaltılarak verilmiştir. Kısaltmaların karşılığı olan örnek grubu isimleri şu şekildedir:

Csi_T_plus: Kontrol siRNA otofaji indüklü grup
 MOCK_T_plus: kontrol vektörü otofaji indüklü grup
 P65si_T_plus: p65siRNA otofaji indüklü grup
 P65_T_plus: p65 overekspresyon vektörü otofaji indüklü grup,
 MOCK_T_minus: kontrol vektörü normal grup
 P65_T_minus: p65 overekspresyon vektörü normal grup
 P65si_T_minus: p65siRNA normal grup

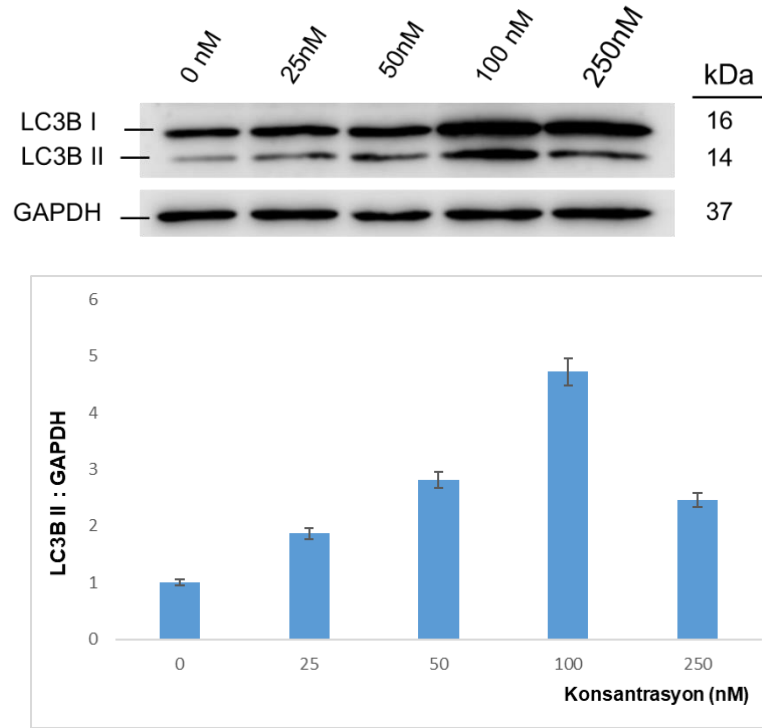
3.12. İstatistiksel Analiz

Çalışma boyunca gerçekleştirilen western blot analizi, qRT-PCR sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlılıkları, IBM-SPSS 23.0 kullanarak Student's t-test yöntemi ile analiz edildi. $p < 0.05$ değerine sahip sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçların ortalama değerleri \pm standart sapmaları belirtilerek gösterildi. RNA-seq analizi ile okunan bazların doğruluğu için Phred kalite skorlaması kullanılarak 1000 bazda 1 hatalı baz okuması anlamına gelen Phred skoru 30 (Q30, %99,9 doğruluk) değerlendirmesine uyan okumalar değerlendirmeye alındı. RNA-seq analizi sonrası yapılan DEG analizi için karşılaştırma grupları arasındaki ekspresyon farklarının değerlendirilmesi için kullanılan istatistiksel metodlar Fold Change analizi, edgeR kullanılarak exactTest ve hiyerarşik sınıflandırma metodlarıdır.

4. BULGULAR

4.1. H1299 Hücreleri İçin Torin1 Optimum Dozunun Belirlenmesi

Tez çalışmamızın ilk deneysel aşamasına deneylerimiz süresince kullanılacak olan Torin1'in (#14379 CST) H1299 hücrelerinde otofaji indüksiyonu için optimum konsantrasyonunu belirleyerek başladık. Torin1, otofajinin negatif regülatörü olan mTOR'un inhibitörüdür ve bu sayede otofajiyi indüklemek için kullanılan bir kimyasaldır. H1299 hücreleri farklı dozlardaki Torin1 ile 24 saat muamele edilerek otofajinin maksimum düzeyde olduğu Torin1 konsantrasyonu LC3BII antikorunu (otofagozom membranında bulunması nedeniyle otofaji düzeyinin tespitinde kullanılan belirteç) kullanılarak western blot yöntemi ile saptandı. Bunun için tezimizin 'GEREÇ ve YÖNTEMLER' bölümünde "3.3. H1299 hücreleri için optimum Torin1 dozunun ayarlanması" başlığı altında belirttiğimiz deneysel prosedür gerçekleştirildi. Farklı dozlarda Torin1 uygulanan H1299 hücrelerinde otofajinin düzeyi LC3BII proteinine spesifik antikor kullanılarak saptandı. Bunun sonucunda en fazla LC3BII ekspresyon artışı kontrole kıyasla 4,72 kat artış ile 100nM Torin1 kullanımında gözlemlendi (Şekil 4.1). Bundan sonraki denemelerde bu optimum konsantrasyon değerinde Torin1 kullanıldı.

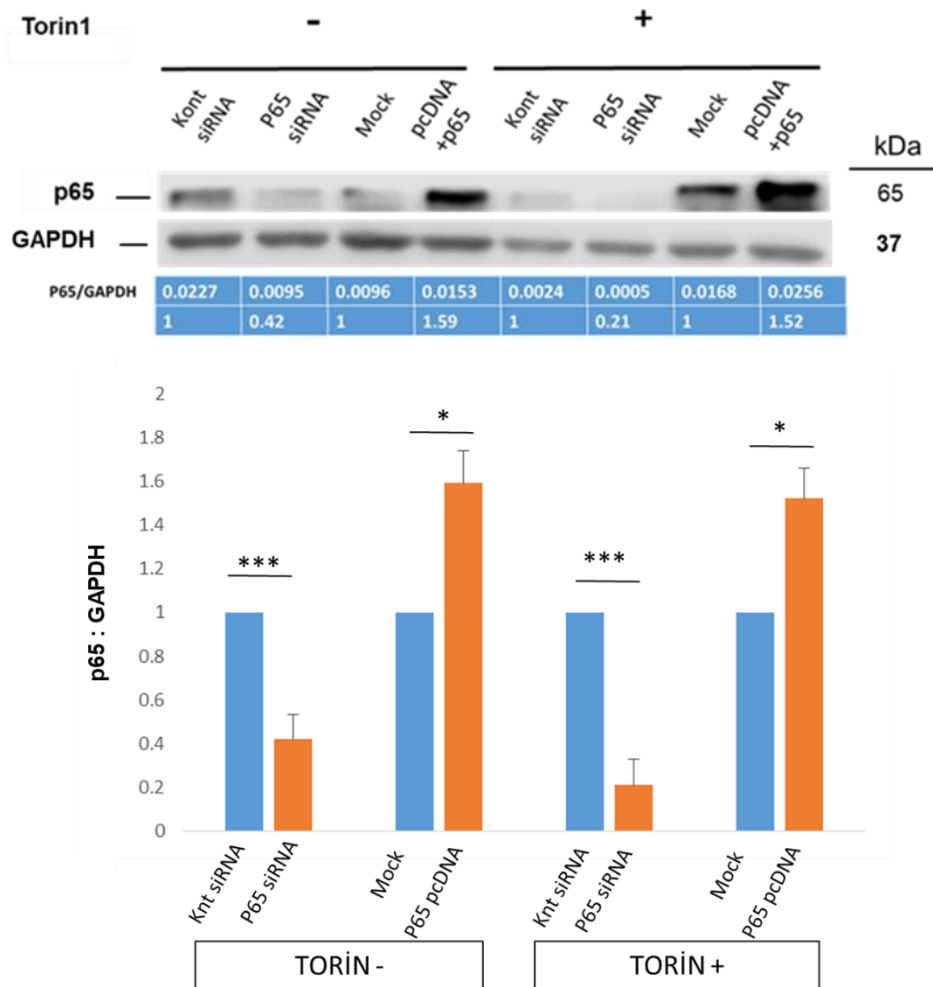


Şekil 4.1 H1299 hücrelerinde 24 saat sonunda en yüksek otofaji düzeyini sağlayan optimum Torin1 konsantrasyonunun western blot analizi ile tespit edilmesi ve dansitometrik ölçüm ile elde edilen LC3BII OD değerlerinin GAPDH OD değerlerine göre normalize edilerek sonuçların grafik şeklinde gösterimi. \pm SD değerleri birbirinden bağımsız 3 deneyin ortalama değerleridir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.01$.

4.2. Plazmid Vektörü ile NF κ B Overekspresyonu ve siRNA-aracılı NF κ B Knockdownu Sonucunda Otofaji Düzeyinin Western Blot Analizi ile Değerlendirilmesi

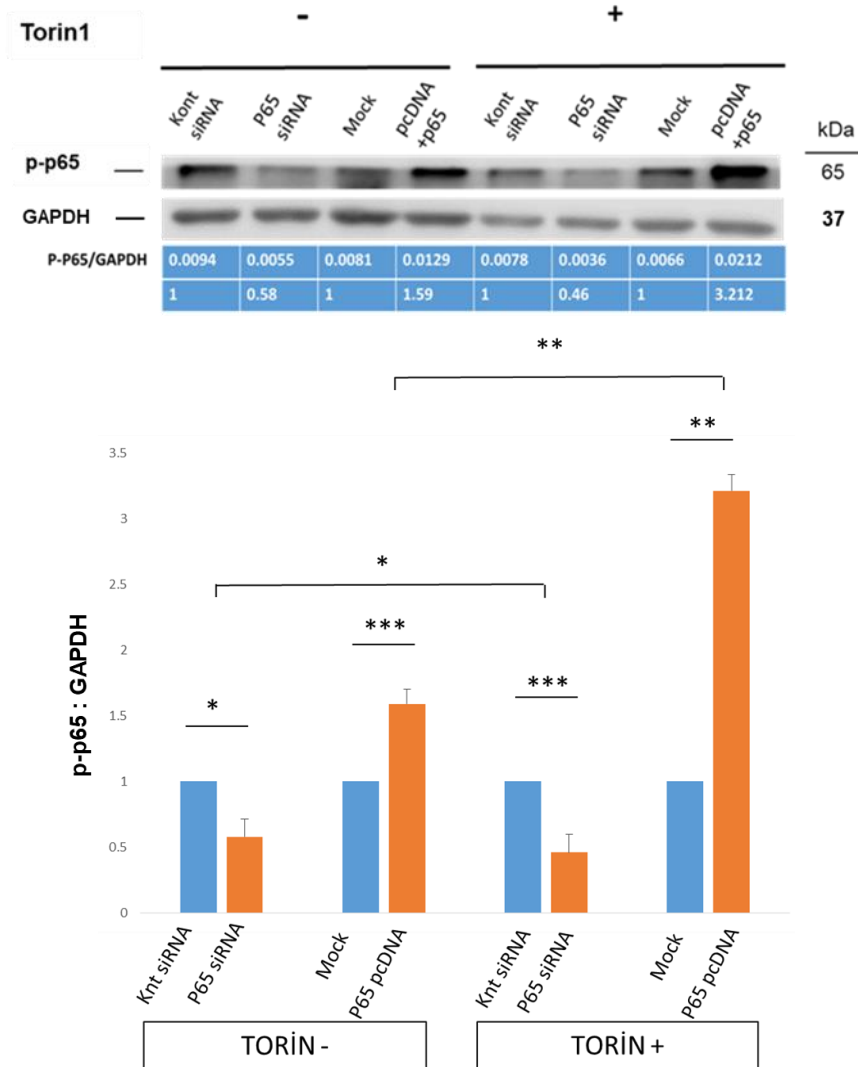
6-kuyucuklu plakelere her bir kuyucuğa $0,5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde H1299 hücre ekimi yapıldı ve hücreler yaklaşık %80'lik yoğunluğa ulaştıklarında bir grup hücreye Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) aracılı p65 overekspresyon vektör transfeksiyonu yapılırken diğer gruba da NF κ B knockdownu için p65 siRNA'sı transfekte edildi. Bu transfeksiyon işlemleri 'Torin1 uygulanmayan normal şartlardaki' hücre grubuna ve 'Torin1 uygulanan otofaji indüklü şartlardaki' hücre grubuna ayrı ayrı yapıldı. Hücreler RIPA tamponu ile toplandı ve ardından da LC3BII, NF κ B (p65), p-NF κ B (p-p65) ve normalizasyon için de GAPDH antikorları kullanılarak western blotlama gerçekleştirildi. Protein ekspresyon düzeyleri için Image Studio 5.2 programı kullanılarak dansitometrik ölçüm gerçekleştirildi ve GAPDH protein ekspresyon düzeyi normalizasyon için kullanıldı.

Torin1 uygulanmayan 'normal şartlardaki' ve Torin1 uygulanan 'otofaji indüklü şartlardaki' H1299 hücre hatlarına pcDNA3.1+p65 overekspresyon vektörü ve p65 siRNA transfeksiyonu sonrasında p-p65, p65, LC3BII protein düzeyleri ayrı ayrı değerlendirilerek grafiğe aktarıldı. Şekil 4.2'de gösterilen sonuçlara göre Torin1(-) normal şartlarda ve Torin1(+) otofaji indüklü şartlarda overekspresyon vektörü transfekte edilen gruplarda anlamlı p65 ekspresyon artışı (sırasıyla 1,59 ve 1,52 kat), siRNA transfekte edilen gruplarda ise anlamlı düzeyde p65 protein ekspresyon baskılanması sağlandı (sırasıyla 2,38 ve 4,76 kat). Yani NFκB overekspresyonu ve knockdownu protein düzeyinde tespit edilebilir şekilde gerçekleştirildi.



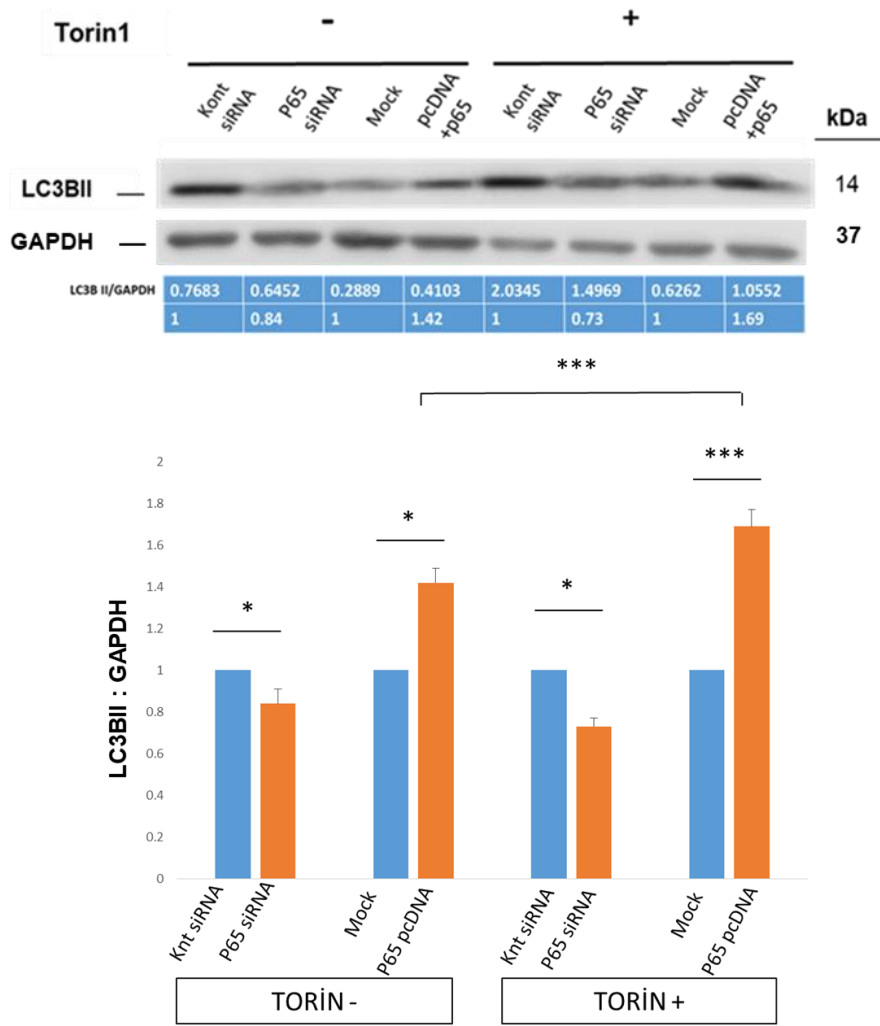
Şekil 4.2 Torin1(-) normal şartlardaki ve Torin1(+) otofaji indüklü şartlardaki H1299 hücre hatlarına pcDNA3.1+p65 overekspresyon vektörü ve p65 siRNA transfeksiyonu sonrasında p65 protein düzeyleri ve dansitometrik ölçüm sonucu elde edilen OD değerlerinin GAPDH ile normalize edilerek grafik şeklinde gösterimi. \pm SD değerleri birbirinden bağımsız 3 deneyin ortalama değerleridir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.01$.

NF κ B knockdown edilen Torin1(-) normal şartlardaki grupta ve Torin1(+) otofaji indüklü grupta aktif p65 (p-p65) ekspresyon düzeyi düşerken (sırasıyla 1,72 ve 2,17 kat) NF κ B overeksprese edilen grupta p65 aktivasyonu arttı (sırasıyla 1,59 ve 3,2 kat) (Şekil 4.3). NF κ B aktivasyonundaki bu değişimler Torin1 uygulanarak otofaji indüklenen grupta anlamlı olarak daha fazladır. Bu sonuç göstermektedir ki Torin1(+) otofaji indüklü şartlarda da NF κ B overeksprese edilebilmekte ve overeksprese edilen NF κ B nükleusa geçip hedef genlerinin ekspresyonunu arttıracak şekilde fosforile olabilmektedir. H1299 hücrelerinde pro-otofajik proteinlerin NF κ B'nin aktivasyonu üzerinde herhangi baskılayıcı bir etkisi yoktur.



Şekil 4.3 Torin1(-) normal şartlardaki ve Torin1(+) otofaji indüklü şartlardaki H1299 hücre hatlarına pcDNA3.1+p65 overekspresyon vektörü ve p65 siRNA transfeksiyonu sonrasında p-p65 protein düzeyleri ve dansimetrik ölçüm sonucu elde edilen OD değerlerinin GAPDH ile normalize edilerek grafik şeklinde gösterimi. \pm SD değerleri birbirinden bağımsız 3 deneyin ortalama değerleridir. *p<0.05, **p<0.03, ***p<0.01.

Aynı gruplarda otofaji düzeyi LC3BII protein ekspresyon düzeyine bakarak değerlendirildi. LC3BII daha önce de belirttiğimiz üzere otofagozom membranında yerleşik bir proteindir. Serbest sitozolik LC3BI öncül proteinine fosfotidiletanolamin molekülünün konjugasyonu ile LC3BII proteini oluşur ve otofaji mekanizmasının belirlenmesinde en yaygın kullanılan belirteçtir. Şekil 4.4'te görüldüğü üzere siRNA-aracılı p65 susturulmasıyla NFκB inaktivasyonu sağlanan gruplarda LC3BII ekspresyonu düşerken (sırasıyla 1,2 ve 1,4 kat) p65 overekspresyonu ile NFκB aktivasyonu sağlanan gruplarda LC3BII ekspresyonu arttı (sırasıyla 1,42 ve 1,69 kat). Torin1 uygulanarak otofajinin indüklendiği grupta LC3BII ekspresyon artışı, normal şartlardaki gruba kıyasla anlamlı olarak daha yüksektir.

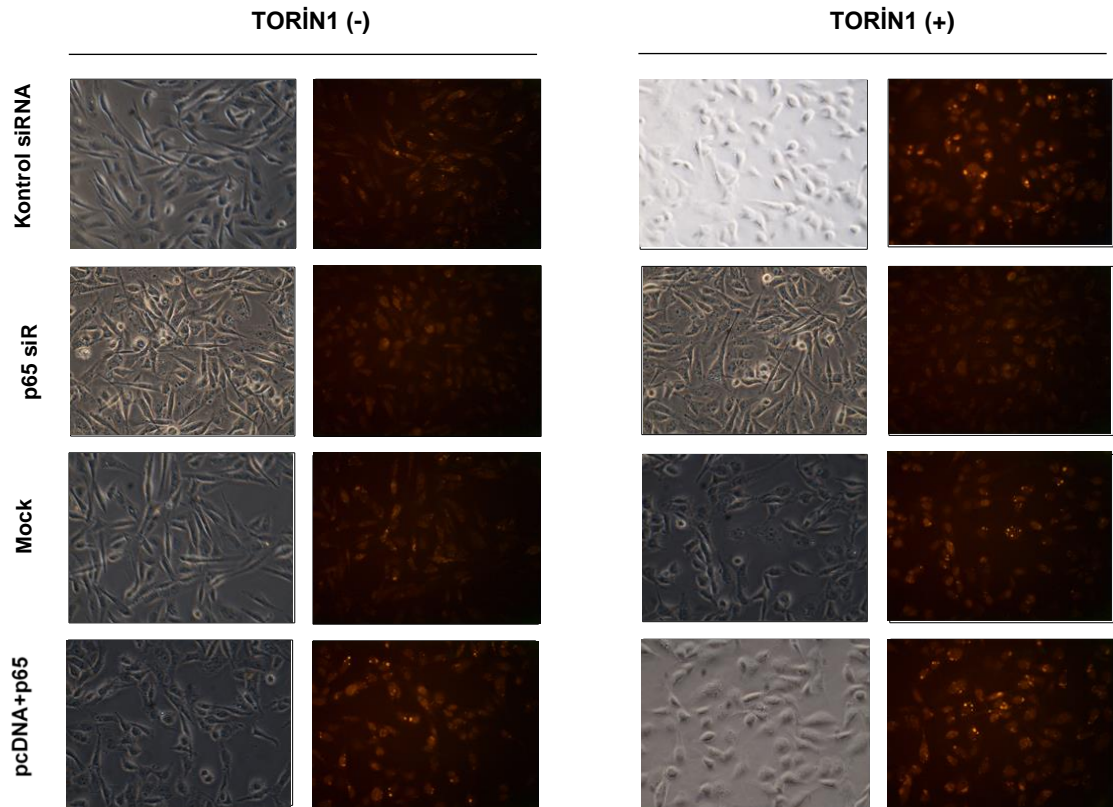


Şekil 4.4 Torin1(-) normal şartlardaki ve Torin1(+) otofaji indüklü şartlardaki H1299 hücre hatlarına pcDNA3.1+p65 overekspresyon vektörü ve p65 siRNA transfeksiyonu sonrasında LC3BII protein düzeyleri ve dansitometrik ölçüm sonucu elde edilen OD değerlerinin GAPDH ile normalize edilerek grafik şeklinde gösterimi. \pm SD değerleri birbirinden bağımsız 3 deneyin ortalama değerleridir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.01$.

Yaptığımız bu analizler sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar; H1299 hücrelerinde NF κ B aktive olunca otofajinin indüklendiğini göstermektedir. Dolayısı ile bir transkripsiyon faktörü olan NF κ B, otofajiyi indükleyen genlerin ekspresyonunu artırarak H1299 hücrelerinde otofajiyi indüklüyor olabilir.

4.3. NF κ B-aracılı Otofaji Regülasyonunun İmmunoflouresans Görüntüleme ile Değerlendirilmesi

H1299 hücreleri 'Torin1(-) normal grup' ve 'Torin1(+) otofaji indüklü grup' olarak iki ayrı gruba ayrılmış ve grupların ikisinde de NF κ B susturulmuş grup hem de NF κ B overeksprese edilmiş gruplar oluşturulmuştur. Bu gruplarda otofaji düzeyi immunoflouresans özellikli LC3B antikoruna (#3868 CST) kullanılarak flouresans mikroskopi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 4.5 Torin1(-) normal şartlarda ve Torin1(+) otofaji indüklü şartlarda NF κ B overeksprese edilmiş ve susturulmuş gruplarda LC3B proteininin beyaz ışık ve 588nm dalga boyundaki immunoflouresans görüntüsü.

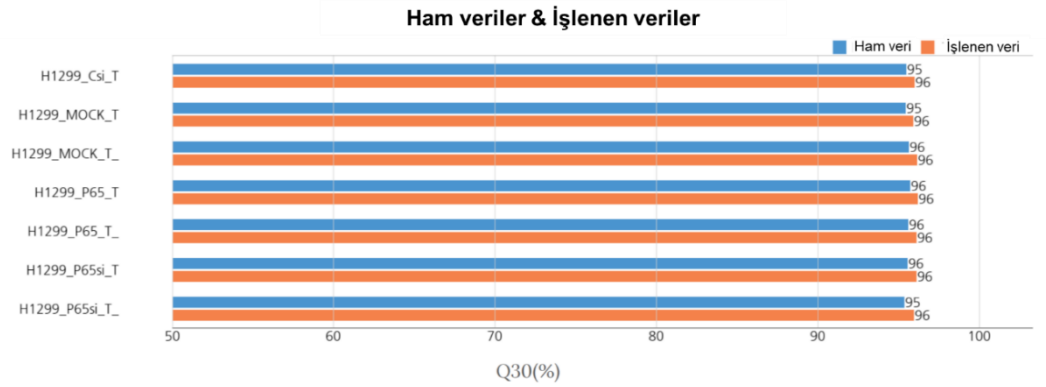
İmmunoflouresans görüntüleme sonucunda daha önceki western blot sonuçlarımızla tutarlı olarak ‘Torin1(-) normal şartlardaki’ H1299 hücrelerinde NF κ B susturulduğunda LC3B proteinin sinyali göreceli olarak düşmekte ancak NF κ B overeksprese edilen grupta LC3B sinyali arttı. ‘Torin1(+) otofaji indüklü grupta’ da sonuçlar aynı şekilde fakat LC3B sinyallerinin NF κ B-bağımlı artış ve azalışı nispeten daha belirgindir.

4.4. RNA-seq Analizi ile NF κ B-bağımlı Otofaji Regülasyonunda Rol Oynayan Genlerin Belirlenmesi

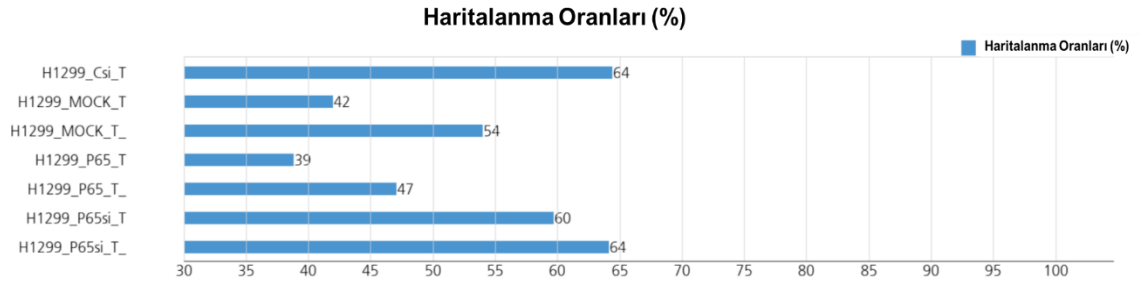
H1299 hücrelerinde NF κ B overekspresyonu ve knockdownu gerçekleştirilerek “Torin1(-) normal grup” ve “Torin1(+) otofaji indüklü grup” olarak iki ana grup tekrardan oluşturuldu ve bu hücrelerin total RNA’ları Macrogen (Güney Kore) firmasının koşullarına uygun olarak RNA-seq analizi yapılmak üzere ‘GEREÇ ve YÖNTEMLER’ bölümünde ‘3.7 Total RNA İzolasyonu’ başlığı altında belirtilen deney prosedürüne göre izole edildi. Toplam 8 adet örnek grubumuzdan 7 tanesi sekanslama yapılmak üzere gönderildi. Macrogen firması bu örneklerde ‘NovaSeq 6000’ protokolünü kullanarak farklı gen ekspresyon profillerini belirlemek için *Homo sapiens* tüm transkriptom dizilemesi gerçekleştirdi (Deney prosedürü ‘3.9. RNA Sekanslama (RNA-seq)’ başlığı altında belirtilmiştir). (Örnek gruplarının isimleri Şekil 4.6-7-8-9’da kısaltılarak verilmiştir, uzun isimleri “GEREÇ VE YÖNTEMLER” bölümünde “3.11 Biyoinformatik Araçların Kullanımı” başlığı altında açıklanmıştır.)

4.4.1. RNA-seq analizi için oluşturulan grupların ve analiz verilerinin doğruluğu

RNA-seq analizi yapılan 7 örnek grubunun her birinden elde edilen verilerin kalitesini gösteren değerler Şekil 4.6’da ve her bir örneğin haritalanma oranı ise Şekil 4.7’de gösterilmektedir. İşlenen veriler HISAT2 adlı program aracılığıyla referans genoma haritalandı.

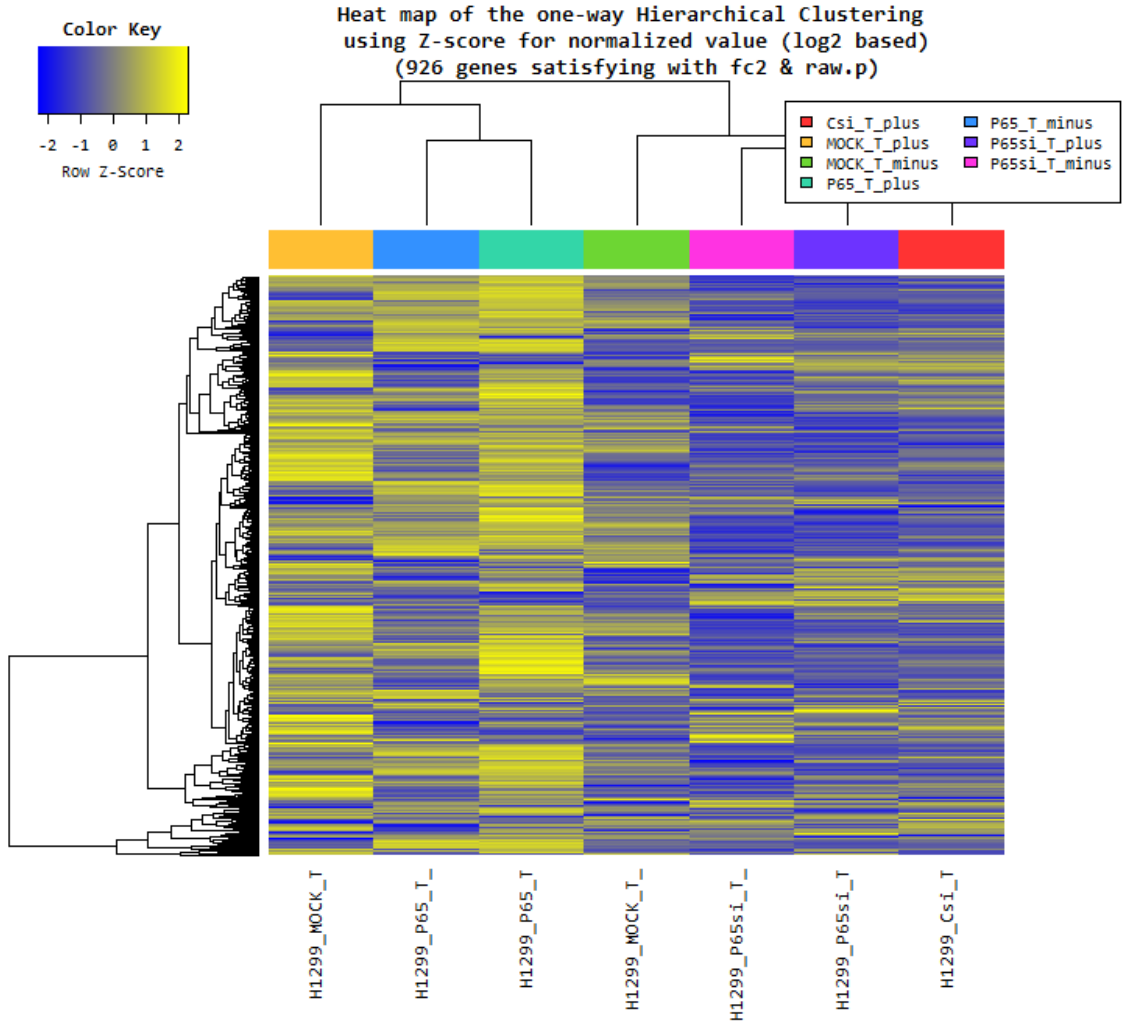


Şekil 4.6 Sekanslanan örneklerden elde edilen verilerin Q30 skoruna göre doğruluğu



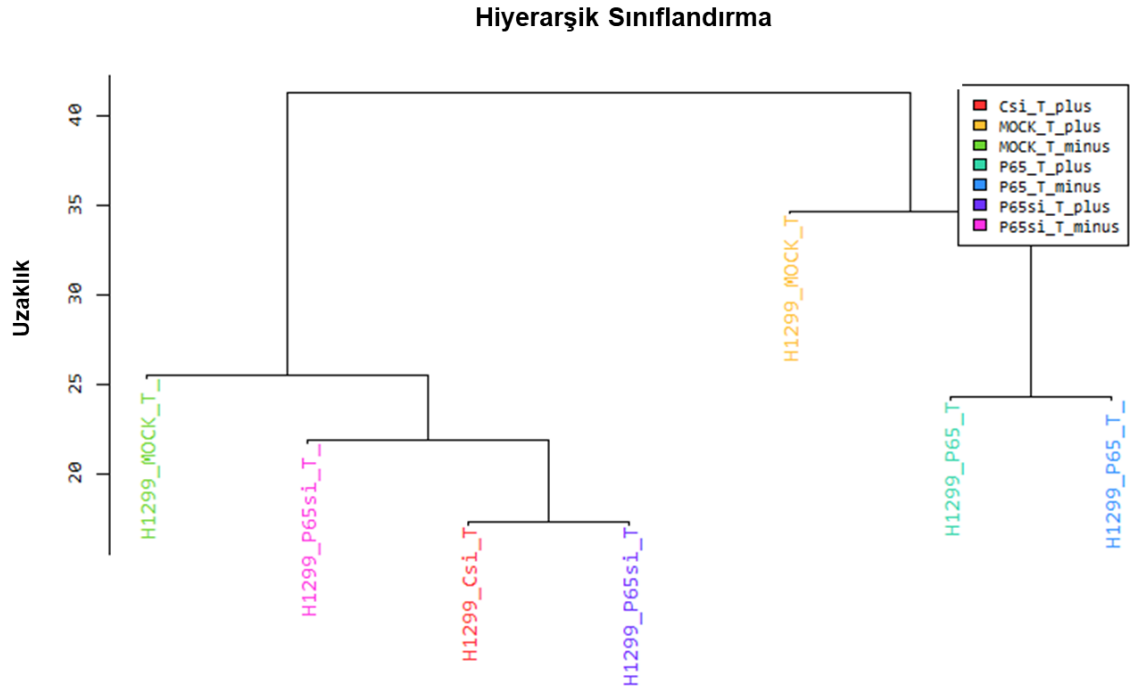
Şekil 4.7 Örneklerin haritalanma oranları

Bu sekans analizi sonucunda örneklerimizde toplam 27.685 gen değerlendirmeye alındı ancak bu genlerin 14.806 tanesi istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Haritalama sonrasında StringTie adlı programla transkriptler oluşturuldu. Örnek grupları arasında gen ekspresyon farklarını belirlemeye yarayan DEG (Differantially Expressed Genes) analizi edgeR adlı program aracılığıyla gerçekleştirildi. DEG analizi sonucunda 926 adet farklı ekspresyon değerlerine sahip gen tespit edildi. Bu 926 genin karşılaştırma grupları arasındaki ekspresyon düzeyi farkı en az 2 kattır ($p < 0.05$). Örnekler ve genler arasındaki ekspresyon patern benzerlikleri heat map grafiği ile gösterilmektedir (Şekil 4.8). Grafiğe bakıldığında NF κ B overeksprese edilen ve susturulan gruplar arasındaki gen ekspresyon farklılığı göze çarpmaktadır.



Şekil 4.8 Örnekler ve genler arasındaki ekspresyon patern benzerliğini gösteren heat map haritası.

Ayrıca Şekil 4.9'da da gruplar arasındaki ekspresyon patern benzerliği hiyerarşik sınıflandırma grafiği ile de gösterilmiştir.



Şekil 4.9 Gruplar arası ekspresyon farklılıklarının hiyerarşik sınıflandırma grafiği ile gösterimi

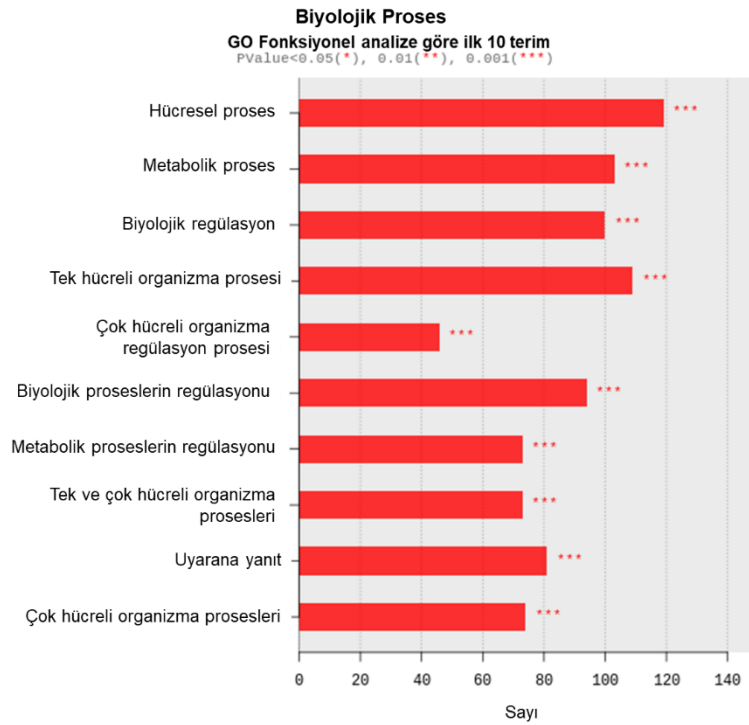
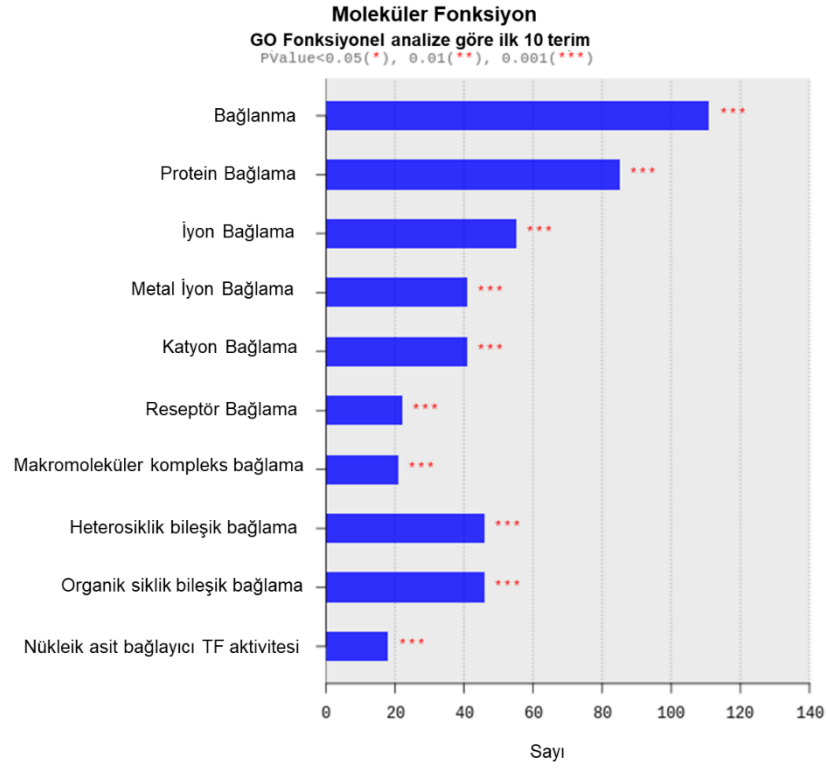
4.4.2. DEG analizi ile gruplar arasında farklı eksprese olan genlerin saptanması

DEG analizi sonucunda gruplar arası farklı eksprese olan genler belirlendi. Öncelikle bu sonuçlar arasında p65 ekspresyon durumunu değerlendirdik (Tablo 4.1). Sonuçlara göre; H1299 hücre hattında otofaji indüklendiğinde p65 ekspresyonu normal şartlardakine göre yaklaşık 1,4 kat arttı. Otofaji indüklü grupta overekspresyon vektörüyle eksternal p65 ekspresyonu sağladığımızda p65 ekspresyonu yaklaşık 67 kat artış gösterdi. p65 ekspresyonu siRNA-aracılı susturulduğunda ise yaklaşık 4 kat bir ekspresyon baskılanması sağlandı.

Tablo 4.1 RNA-seq analizi sonucunda karşılaştırılan gruplar arasındaki NF κ B (p65) ekspresyon değışim oranları

Gen Adı	Torin1(+) / Torin1(-) (Fold Change)	p65 (+) Torin1(+) / Torin1(+) (Fold Change)	p65 (-) Torin1(+) / Torin1(+) (Fold Change)
RELA	1.398949	67.458973	-3.614150
		p65 (+) Torin1(-) / Torin1(-) (Fold Change)	p65 (-) Torin1(-) / Torin1(-) (Fold Change)
		65,73681952	-3,358954084

RNA-seq analizi sonucunda 14.806 adet gen istatistiksel olarak anlamlı bulundu ve bunlar arasından 926 gen tüm gruplarda karşılaştırılabilir sonuçlar verdi. Gene Ontology veri tabanında dayanarak bu genlerin hangi biyolojik proseslerde yer aldığı ve hangi moleküler fonksiyonlarda görevli oldukları genel olarak enrichment analizi ile değerlendirildi. Şekil 4.10'da p65 overeksprese edilen 'Torin1(+) otofaji indüklü grupta' kontrole kıyasla farklı ekspresyon profiline sahip genlerin genel olarak yer aldığı biyolojik prosesler ve moleküler fonksiyonları gösterilmektedir. Ekspresyonu otofaji indüklü şartlarda p65-aracılı artan genlerin daha çok makromoleküller ile kompleks bağlanma, reseptör bağlama ve nükleik asit bağlayıcı transkripsiyon aktivitesi gibi moleküler fonksiyon gösterdikleri gözlemlendi. Bu genlerin yer aldığı başlıca biyolojik prosesler ise metabolik prosesler, metabolik proseslerin regülasyonu ve uyarana yanıt gibi proseslerdir. Bu sonuçlar otofaji mekanizması ile NF κ B transkripsiyon faktörü arasındaki ilişkiyi anlayabilmek adına anlamlıdır.



Şekil 4.10 p53 overekspresyon eden Torin1(+) otofaji indüklü H1299 hücrelerinde kontrole kıyasla ekspresyon farklılığı gösteren genlerin moleküler fonksiyonları ve yer aldığı biyolojik prosesler Gene Ontology veri tabanına dayanarak enrichment analizi ile belirlenmiştir.

RNA-seq sonucunda tüm karşılaştırma grupları arasında farklı ekspresyon profiline sahip 926 gen arasından, otofaji indüklü şartlarda NF κ B-aracılı ekspresyonu artan ve azalan genler sıralaması yapılarak, bu genler 'otofaji indüklü şartlarda en az 1,5 kat anlamlı ekspresyon değişimi gösterme', 'karşılaştırma grupları arasında tutarlı sonuç verme', 'literatürde henüz kesin bir hücresel prosesle ilişkilendirilmemiş olma' ve 'otofaji ile ilişkili olma' kriterleri değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda gruplar arası ekspresyon profil farkları qRT-PCR ile doğrulanmak üzere 20'si otofaji indüklü şartlarda ekspresyon artışı gösteren, 3'ü otofaji indüklendiğinde ekspresyon düşüşü gösteren olmak üzere toplam 23 gen seçildi. Tablo 4.2'de bu 23 gen ve otofaji indüklü gruptaki ekspresyon düzeyi değişimleri gösterilmektedir.

Tablo 4.2 Torin1(+) otofaji indüklü H1299 hücre hatlarında p65 overeksprese edilen ve susturulan gruplarda anlamlı ekspresyon düzeyleri saptanarak qRT-PCR ile ekspresyon düzeyleri doğrulanmak üzere seçilen genler

Gen Adı	Torin1(+)/Torin1(-) (Fold Change)	p65 overeksprese Torin1(+)/Torin1(+) (Fold Change)	p65 susturulan Torin1(+)/Torin1(+) (Fold Change)
UNC13A	6.310211	25.306432	-1.049492
EGR3	5.351772	6.879454	-3.135480
MMP1	4.794975	1.859751	-4.084858
EBI3	4.293846	21.608422	-3.106794
SERINC4	4.068319	1.602545	-1.517221
TNFSF15	3.915883	4.013105	-1.876773
DNAH17	3.079106	2.170327	-3.851241
MMP15	2.761695	11.893093	-3.851241
SPOCK2	2.761695	2.083800	-2.344034
TGFBI	2.452309	1.824240	-2.148817
SPTB	2.436122	1.951221	-1.861553
LOC102724593	2.428279	1.103697	-1.511832
ZNF33BP1	2.335304	2.290009	-2.491863
NLRP3	2.324882	2.606038	-1.835754
LOC100996724	2.204752	1.933209	-1.072106
CDRT3	2.074559	2.112276	-1.951821
BDH1	2.044964	1.598995	-4.360007
FBLN5	1.937116	6.759901	-2.721803
STK32A	1.636926	1.584919	-1.575418
MYRFL	6,938660	1,523636	-2,216962
CSPG4	-1.531934	-1.565258	9.803545
LOC100129617	-1.761824	-1.787833	1.612720
AP1M2	-2.482285	-3.184524	1.215864

4.5. qRT-PCR ile RNA-seq Analizi Sonucunda Saptanan Genlerin Ekspresyon Düzey Değişimlerinin Doğrulanması

RNA-seq sonuçlarını doğrulamak amacıyla H1299 hücre hatlarıyla deney grupları tekrar oluşturuldu ve Torin1(+) otofaji indüklü ve Torin1(-) normal gruplarda transfeksiyon aracılığı ile NFκB overeksprese edildi ve susturuldu. Bu örnek gruplarından toplanan total RNA'ların konsantrasyonları ölçüldükten sonra eşit konsantrasyondaki RNA izolatları cDNA'ya çevrildi. cDNA'lar ile KiloGreen 2X qPCR MasterMix-No Dye kiti (Applied Biological Materials abm) kullanılarak qRT-PCR reaksiyonları 3'lü tekrarlar şeklinde hazırlandı ve uygun reaksiyon koşullarında Biorad CFX96 Touch cihazında qRT-PCR işlemi gerçekleştirildi. qRT-PCR sonucunda her bir genden elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te listelenmiştir.

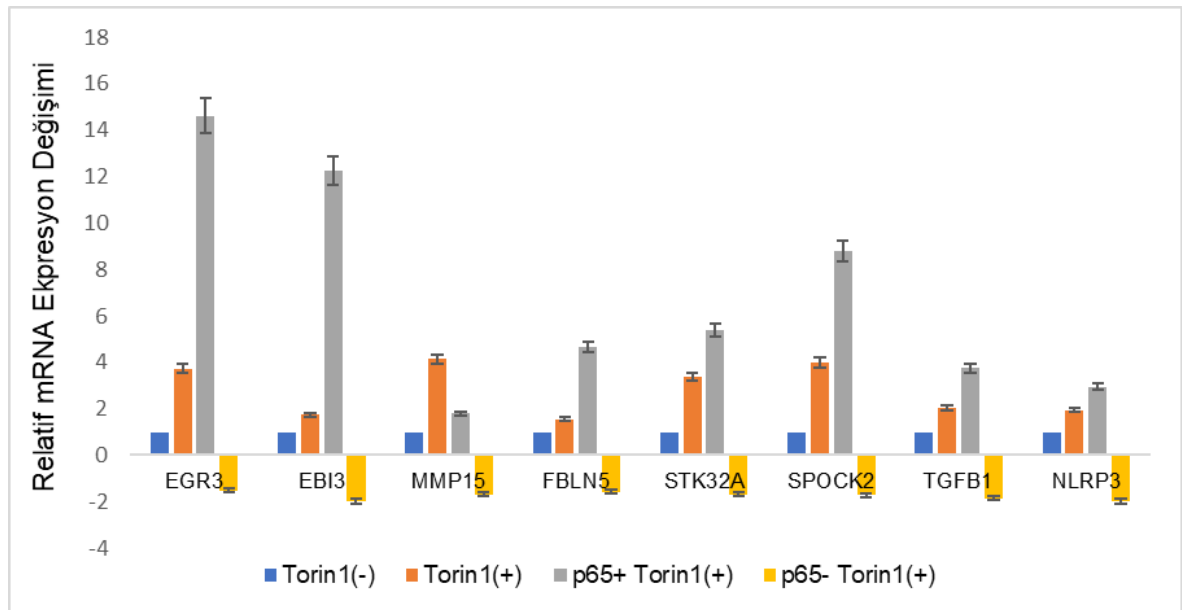
Tablo 4.3 RNA-seq sonucuna göre belirlenen genlerin qRT-PCR analizi sonucunda saptanan ekspresyon düzey değişimleri ve istatistiksel anlamlılıkları. *p<0.05, **p<0.03, ***p<0.01

Gen adı	Torin1(+)/Torin1(-)		p65 overeks. Torin1(+)/Torin1(+)		p65 susturulan Torin1(+)/Torin1(+)	
	(Fold Change)	p-değeri	(Fold Change)	p-değeri	(Fold Change)	
EGR3	3,73	0,036854	3,92	0,000048	-1,51	
EBI3	1,73	0,020709	7,09	0,038198	-2	
MMP15	4,14	0,003521	1,79	0,047233	-1,69	
FBLN5	1,55	0,04923	3	0,000552	-1,58	
UNC13A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
STK32A	3,38	0,000262	1,59	0,04134	-1,68	
BDH1	1,07	0,707333	4,08	0,022847	-8,92	
LOC10096724	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
LOC102724593	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
MMP1	-2,19	0,00001	1,11	0,047568	-3,66	
SERINC4	1,59	0,003447	1,42	0,028068	-2,44	
DNAH17	6,32	0,001005	2,51	0,000099	-1,87	
TNFSF	-6,5	0,000012	5,46	0,003361	-10,4	
SPOCK2	3,99	0,00002	2,2	0,000003	-1,72	
TGFB1	2,03	0,01	1,85	0,0191456	-1,86	
SPTB	1,14	0,08	-1,32	0,675912	-2,11	
ZNF33BP1	-1,18	0,07	1,74	0,000409	-1,24	
NLRP3	1,94	0,0001	1,52	0,0378691	-1,97	
CDRT3	1,65	0,61	2,02	0,11597	-1,34	
MYRFL	-1,37	0,202107	2,45	0,011405	1,09	
AP1M2	-1,77	0,000001	1,87	0,00128	-1,81	
LOC100129617	-1,6	0,028589	3,32	0,000018	-1,56	
CSPG4	-2,62	0,01	1,67	0,102926	-3,08	

qRT-PCR analiz sonucunda belirlenen ekspresyon değişimleri RNA-seq sonuçlarıyla korele olan genler Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Bu genlerin p65 overeksprese edilen ve susturulan Torin1(-) normal grupta ve Torin1(+) otofaji indüklü gruptaki relatif mRNA ekspresyon değişimleri ise Şekil 4.11'de grafik şeklinde gösterilmiştir.

Tablo 4.4 qRT-PCR analizi sonucunda RNA-seq sonuçları ile korele ekspresyon düzey değişimi saptanan genler. *p<0.05, **p<0.03, ***p<0.01

Gen adı	Torin1(+)/Torin1(-) (Fold Change)	p-değeri	p65 overeks. Torin1(+)/Torin1(+) (Fold Change)	p-değeri	p65 susturulan Torin1(+)/Torin1(+) (Fold Change)
EGR3	3,73	0,036854*	3,92	0,000048***	-1,51
EBI3	1,73	0,020709**	7,09	0,038198*	-2
MMP15	4,14	0,003521***	1,79	0,047233*	-1,69
FBLN5	1,55	0,04923*	3	0,000552***	-1,58
STK32A	3,38	0,000262***	1,59	0,04134*	-1,68
SPOCK2	3,99	0,00002***	2,2	0,000003***	-1,72
TGFB1	2,03	0,01***	1,85	0,0191456**	-1,86
NLRP3	1,94	0,0001***	1,52	0,0378691*	-1,97



Şekil 4.11 qRT-PCR analizi sonucunda RNA-seq sonuçları ile korele ekspresyon düzey değişimi saptanan genlerin relatif ekspresyon değişimlerinin grafiği. \pm SD değerleri birbirinden bağımsız 3 deneyin ortalama değerleridir.

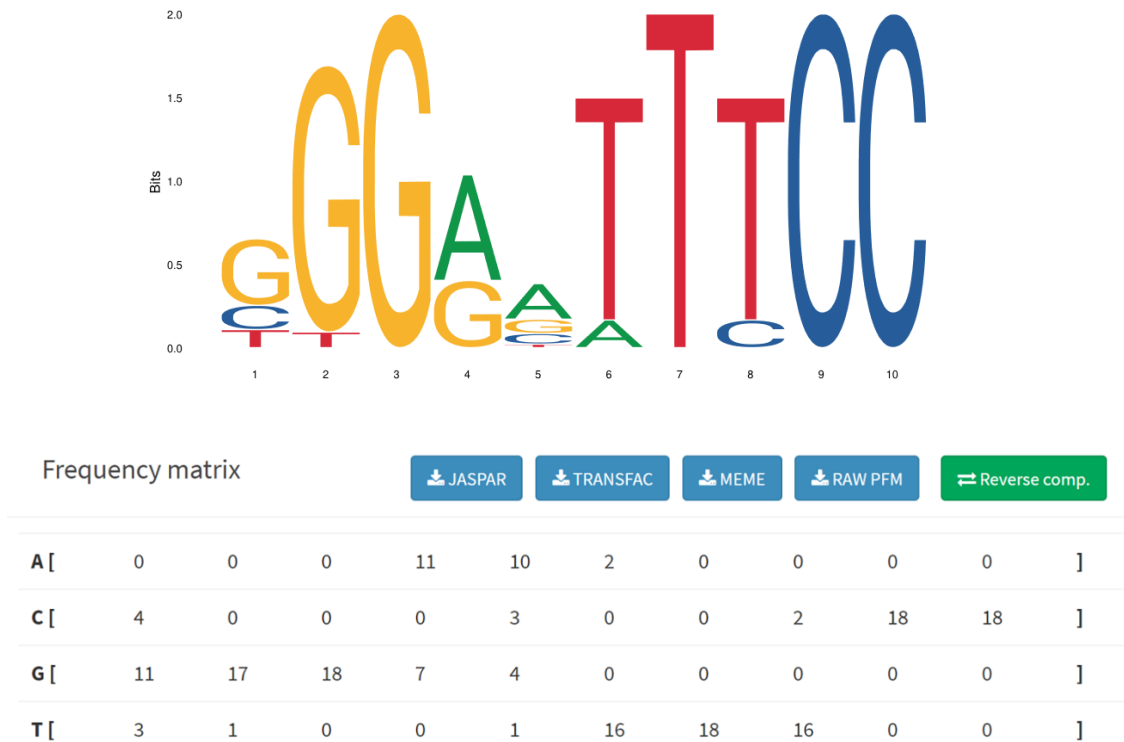
Sonuçlarımıza göre; Tablo 4.4'te listelenen genler Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NF κ B transkripsiyon faktörünün regülasyonu aracılığı ile otofaji mekanizmasının düzenlenmesinde rol oynuyor olabilirler. Bu 8 gen ile otofaji mekanizması arasındaki etkileşim ile ilişkili literatür ve veritabanı bilgisi Tablo 4.5'te özetlenmiştir. Tezimizin 'TARTIŞMA' bölümünde bu genlerin rol oynadığı başlıca hücresel prosesler, bunların otofaji ile etkileşimleri ve daha önce yapılmış çalışmalarla elde edilmiş literatür bilgileri detaylıca değerlendirilmiştir.

Tablo 4.5 Tezimizde saptadığımız NF κ B-aracılı pozitif otofaji regülasyonunda rol oynayan genler ve otofaji mekanizması arasındaki etkileşim ile ilişkili literatür ve veritabanı bilgisi

Gen Adı	Otofaji mekanizması ile etkileşim	Referans
EGR3	TF olarak otofagozom oluşumda rol oynayan ATG12'yi hedef alır	WEB_8
EBI3	Alt ünitesi olduğu IL-27 otofajiyi negatif regüle eder.	Sharma vd 2014
MMP15	Literatür bilgisi bulunmamakta	-
FBLN5	Starvasyon-indüklü otofaji şartlarında FBLN5 birikimi gözlenmiştir (Eksfaliyasyon sendromu)	Want vd 2016
STK32A	GO:0006914 ID koduyla kayıtlı otofaji prosesinde rol oynayan gen setinin içerisinde yer alır. GO:0016236 ID koduyla kayıtlı makrotofaji prosesinde rol oynayan gen setinin içerisinde yer alır.	WEB_10
SPOCK2	Literatür bilgisi bulunmamaktadır	-
TGFβ1	Mutant-TGF β 1 protein birikimi otofaji mekanizmasında duraksamaya neden olur (Granüler korneal distrofi tip 2)	Choi vd 2012, Choi vd 2014
NLRP3	Otofajiyi indükler	Shi vd 2012

4.6. NF κ B-aracılı otofaji regülasyonunda rol oynadığı belirlenen genlerin promoter bölgelerinde κ B motifi varlığının *in silico* incelenmesi

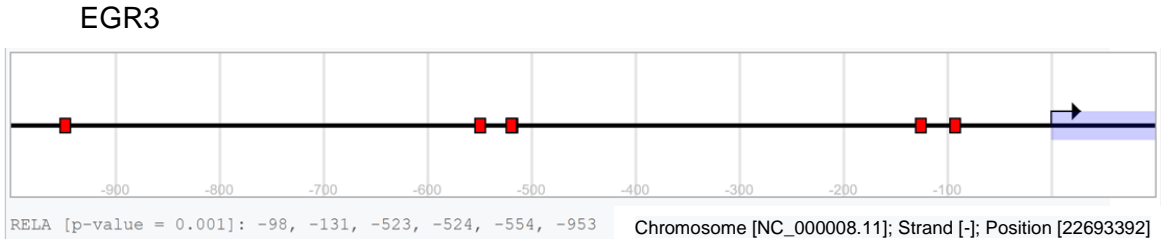
NF κ B transkripsiyon faktörü hedef genlerinin promoterlarındaki bağlanma motifini (κ B motifi) tanıyarak ekspresyonlarını regüle eder. Bu bağlanma motifinin dizi bilgisi JASPAR veritabanından elde edilmiş olup Şekil 4.12'de dizi logosu ve bazların dizilim olasılığı ile ilgili puanları gösterilmektedir (WEB_7).



Şekil 4.12 NF κ B (RelA/p65) 'nin bağlanma motifi logosu ve bazların dizilim olasılığı puanlaması (WEB_7).

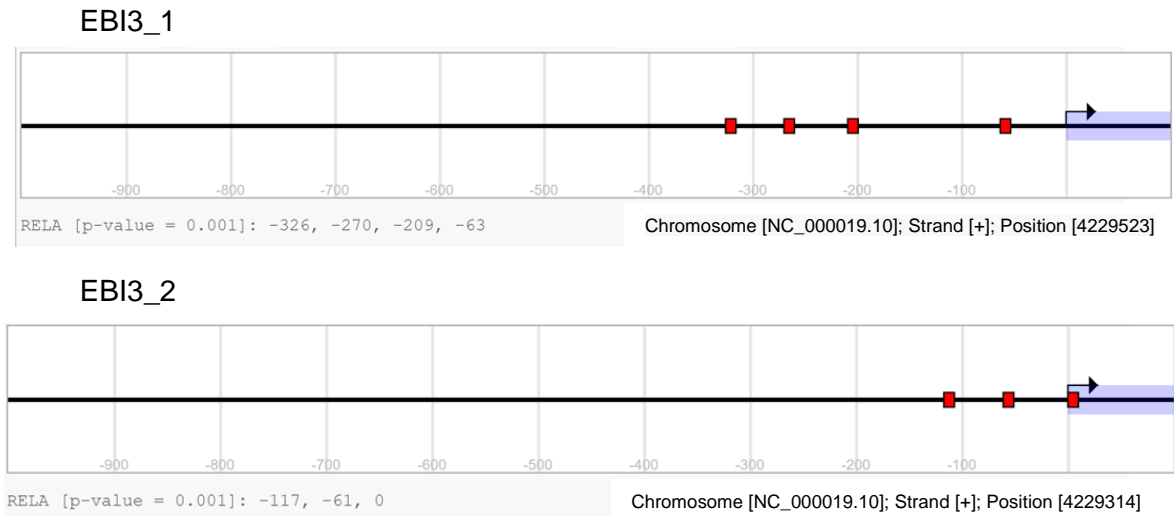
Tezimizde saptamış olduğumuz genlerin promoter bölgelerinde NF κ B bağlanma bölgesinin olup olmadığını incelemek için EPD-Eukaryotic Promoter Database veritabanı kullanıldı. Bu veri tabanı genlerin tahmini promoter bölgelerindeki transkripsiyon başlangıç bölgesinin (TSS) -1000 ve 100 bp'lik alanında JASPAR veritabanındaki bağlanma dizilerinin komplementerliğini gösteren bir veritabanıdır.

EGR3 geninin tahmini promoter bölgesinde TSS'den -98, -131, -523, -524, -554 ve -953 bp uzaklıkta 6 adet NF κ B bağlanma bölgesi saptandı (Şekil 4.13).



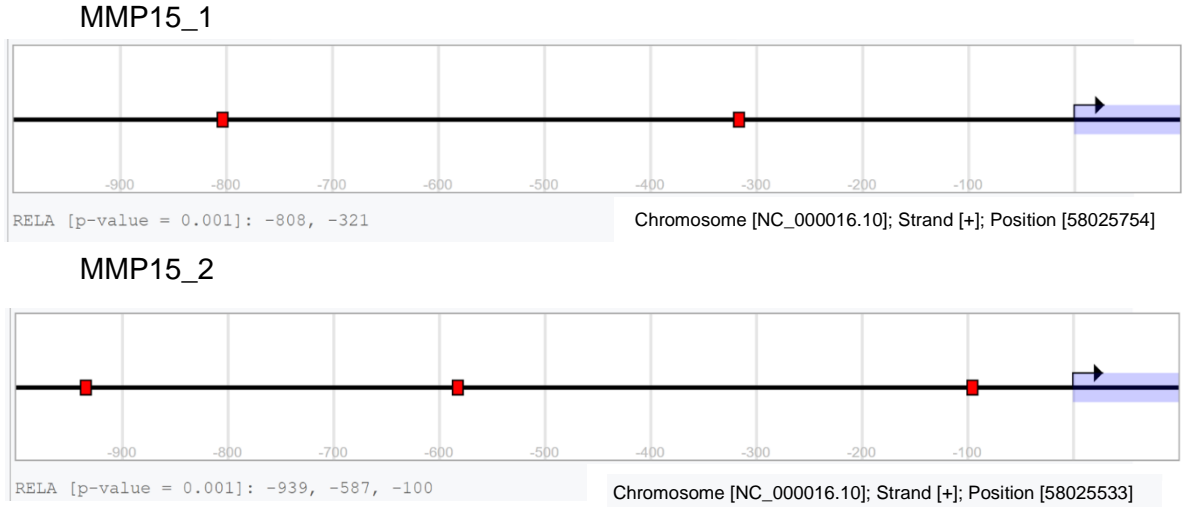
Şekil 4.13 *EGR3* promoterındaki tahmini NF κ B bağlanma bölgeleri

EBI3 geni için 2 farklı tahmini promoter bölgesi saptanmıştır ve ilk promoterdaki TSS'den -326, 270, -209 ve -63 bp uzaklıkta 4 adet, ikinci promoterde ise TSS'den -117, -61 bp uzakta ve tam TSS üzerinde yer alan 3 adet NF κ B bağlanma bölgesi saptandı (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 2 farklı tahmini *EBI3* promoterı üzerindeki NF κ B bağlanma bölgeleri

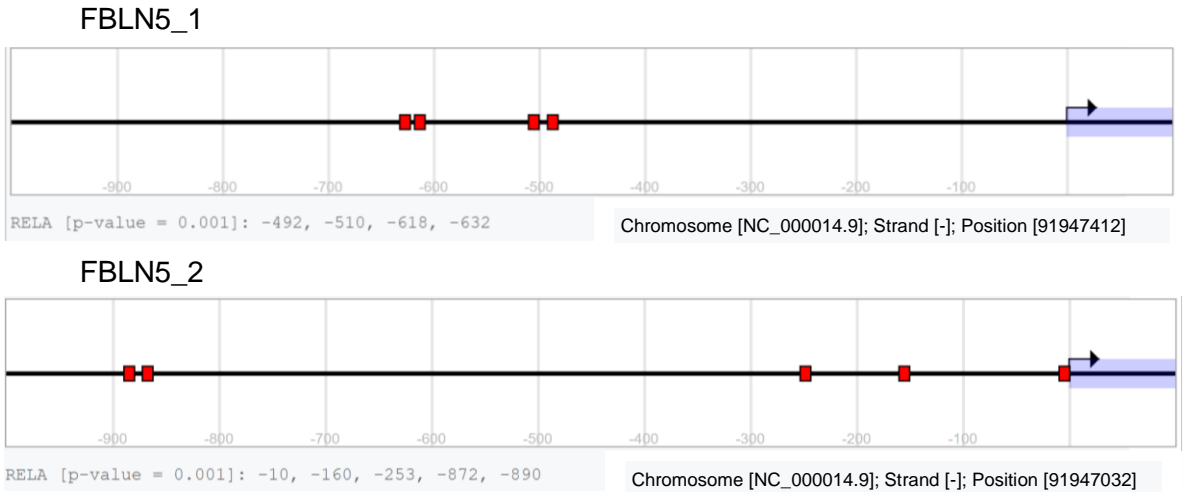
MMP15 geni için 2 farklı tahmini promoter bölgesi saptanmıştır ve ilk promoterdaki TSS'den -808, -321 bp uzaklıkta 2 adet, ikinci promoterde ise TSS'den -939, -587 ve -100 bp uzakta yer alan 3 adet NF κ B bağlanma bölgesi saptandı (Şekil 4.15).



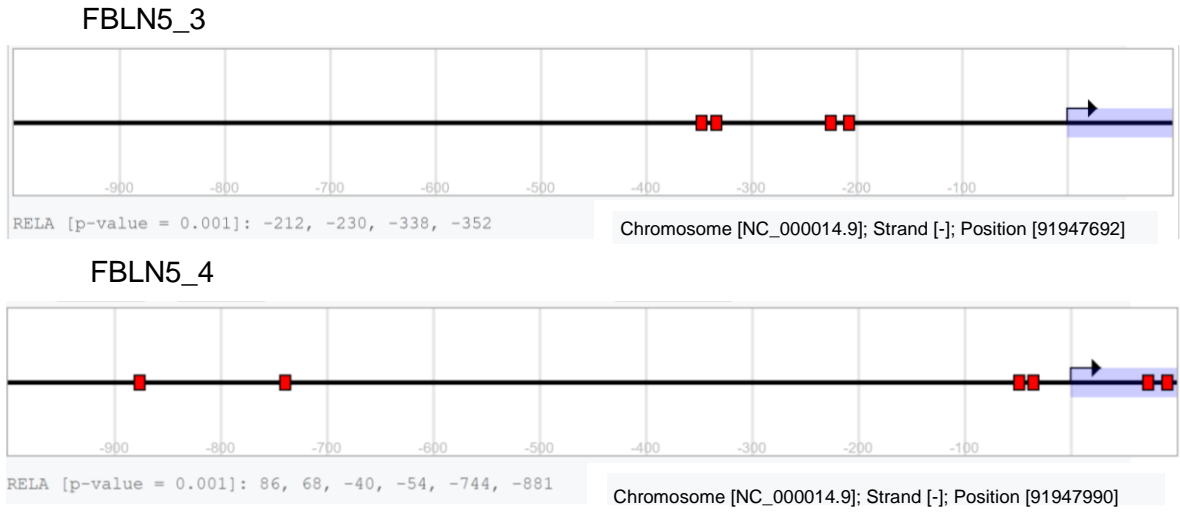
Şekil 4.15 2 farklı tahmini *MMP15* promoterı üzerindeki NFκB bağlanma bölgeleri

FBLN5 geninde 5 farklı tahmini promoter bölgesi saptanmıştır.

1. promoterın TSS'inden -492, -510, -618 ve -632 bp uzaklıkta 4 adet;
2. promoterın TSS'inden -10, -160, -253, -872 ve -890 bp uzaklıkta 5 adet;
3. promoterın TSS'inden -212, -230, -338 ve -352 bp uzaklıkta 4 adet;
4. promoterın TSS'inden 86, 68, -40, -54, -744, -881 bp uzaklıkta 6 adet NFκB bağlanma bölgesi saptandı (Şekil 4.16).

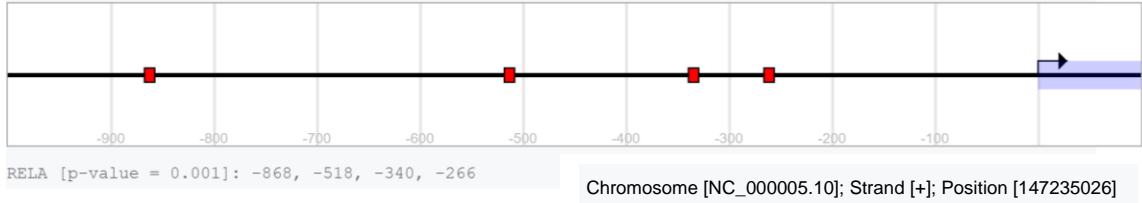


Şekil 4.16 4 farklı tahmini *FBLN5* promoterı üzerindeki NFκB bağlanma bölgeleri (devamı sonraki sayfada)



Şekil 4.16 (devamı) 4 farklı tahmini *FBLN5* promotörü üzerindeki NF κ B bağlanma bölgeleri

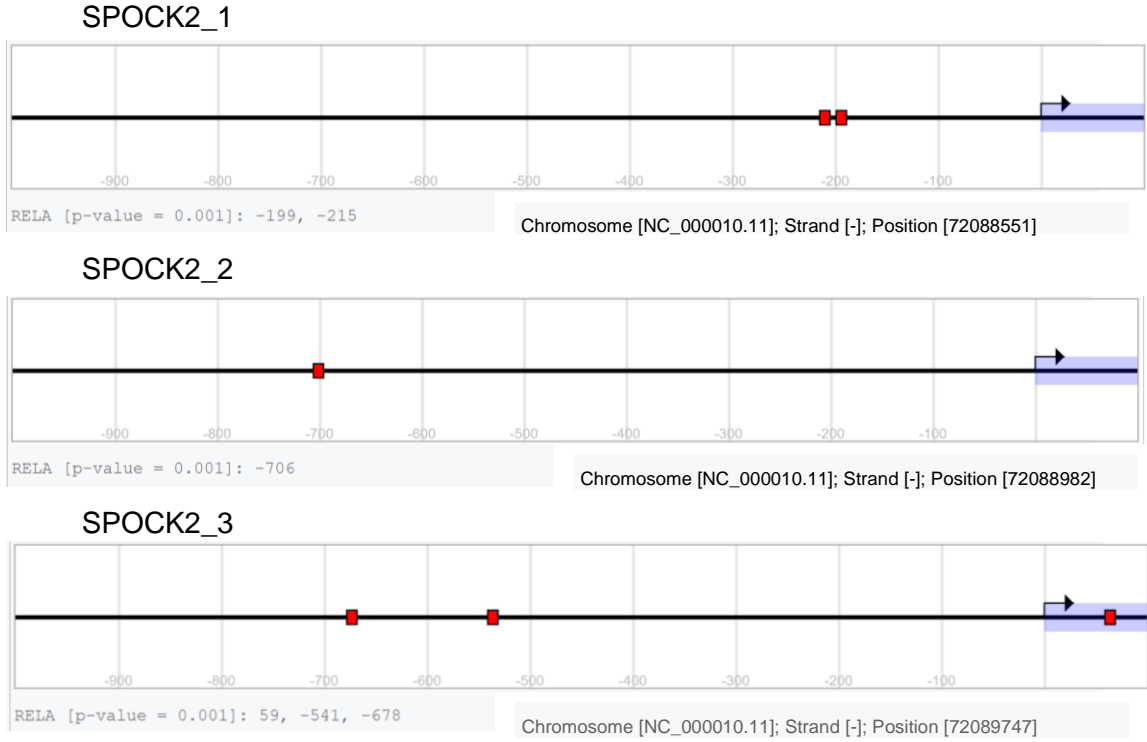
STK32A geninin tahmini promoter bölgesinde TSS'inden -868, -518, -340 ve -266 bp uzaklıkta 4 adet NF κ B bağlanma bölgesi saptanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Tahmini *STK32A* promotörü üzerindeki NF κ B bağlanma bölgeleri

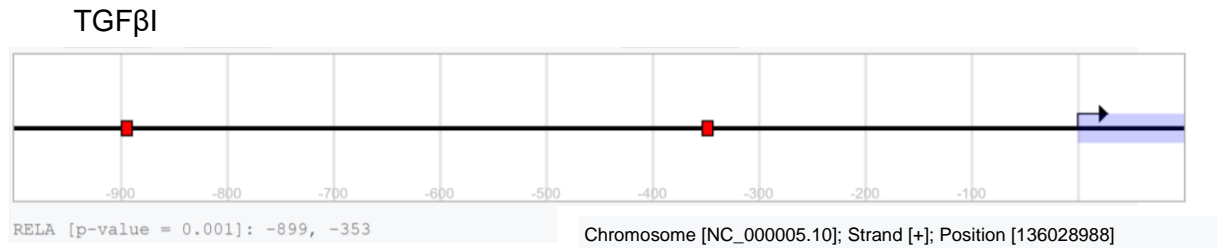
SPOCK2 geninde 3 farklı tahmini promoter bölgesi saptanmıştır.

1. promotörün TSS'sinden -199 ve -215 bp uzaklıkta 2 adet;
2. promotörün TSS'sinden -706 bp uzaklıkta 1 adet;
3. promotörün TSS'sinden 59, -541 ve -678 bp uzaklıkta 3 adet NF κ B bağlanma bölgesi saptandı (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 3 farklı tahmini *SPOCK2* promoterları üzerindeki NF κ B bağlanma bölgeleri

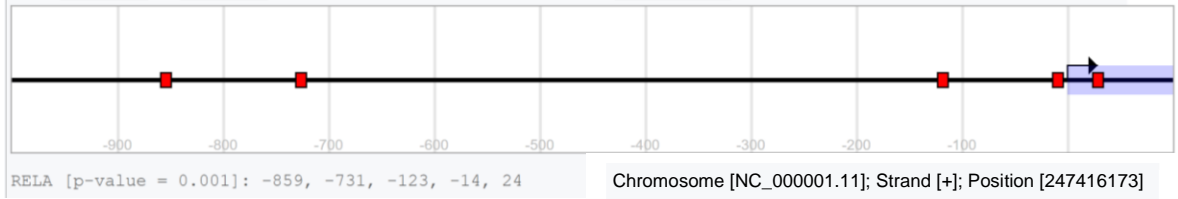
TGF β 1 geninin tahmini promoterının TSS'sinden -899 ve -353 bp uzaklıkta 2 adet NF κ B bağlanma bölgesi saptandı (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Tahmini *TGF β 1* promoterı üzerindeki NF κ B bağlanma bölgeleri

NLRP3 geninin tahmini promoterının TSS'sine -859, -731, -123, -14 ve 24 bp uzaklıkta 5 adet NF κ B bağlanma bölgesi saptandı (Şekil 4.20).

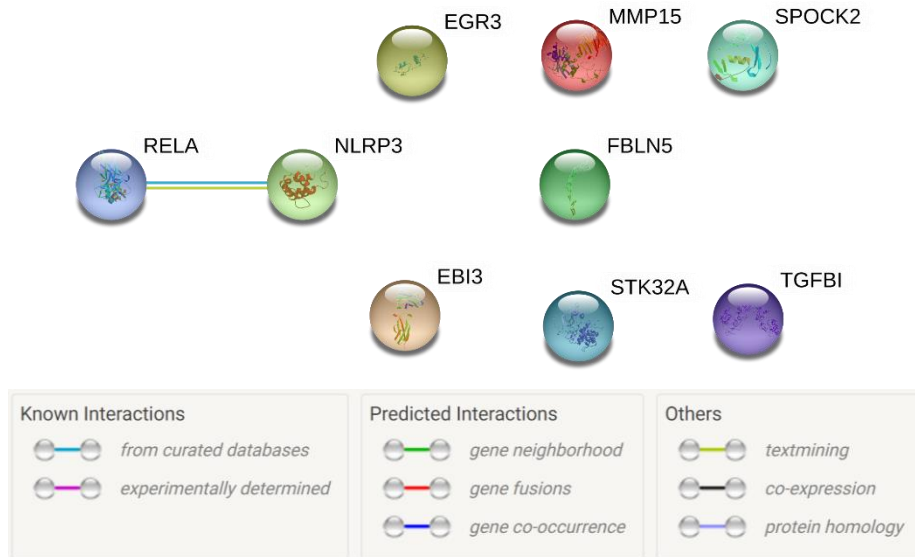
NLRP3



Şekil 4.20 Tahmini *NLRP3* promotörü üzerindeki NFκB bağlanma bölgeleri

4.7. Saptanan Genlerden Eksprese Olan Proteinlerin NFκB ve Kendi Aralarındaki Fonksiyonel Etkileşimlerin *In Silico* İncelenmesi

RNA-seq ve qRT-PCR analizleri ile saptamış olduğumuz *EGR3*, *EBI3*, *MMP15*, *FBLN5*, *STK32A*, *SPOCK2*, *TGFβ1* ve *NLRP3* genlerinden eksprese olan proteinlerin NFκB (RELA/p65) ve kendi aralarındaki fonksiyonel etkileşimleri STRING veritabanında analizlendi. STRING veritabanınının hem literatürde yer alan çalışmaları hem de diğer veritabanlarındaki bilgileri derleyerek ortaya koyduğu analiz sonucunda bu 8 protein arasından sadece *NLRP3*'ün 0,930 skor ile NFκB ile etkileşim içerisinde olduğu bilgisine ulaşılmıştır (WEB_11).



Şekil 4.21 Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde otofajinin NFκB-aracılı pozitif regülasyonunda rol oynadığını saptadığımız genlerin STRING veritabanına göre NFκB ve kendi aralarındaki fonksiyonel etkileşimleri (WEB_11).

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri Dünya genelinde ölüme sebep olan kanserler arasında birinci sırada yer alır. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) akciğer kanser vakalarının %85'ini oluşturan ve adenokarsinoma, skuamoz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinoma olmak üzere 3 majör histopatolojik alt sınıfta incelenen bir akciğer kanser türüdür. Adenokarsinomalar ve büyük hücreli karsinomalar KHDAK vakalarının %70-80'nini oluştururlar ve akciğerin dış yüzeyinde orjinlenirler. Skuamoz hücreli karsinomalar ise vakaların yaklaşık %10'unu oluştururlar (Chiu vd 2018). Tezimizde hücre kültürü çalışmalarında kullandığımız H1299 hücre hattı büyük hücreli karsinoma sınıfına dahildir. Büyük hücreli karsinoma kötü farklılaşma, hızlı büyüme ve erken metastatik özelliklerle karakterize olan agresif bir KHDAK türüdür. 3 ve 4. evredeki büyük hücreli karsinoma hastalarında 5 yıllık sağkalım oranı %10'un altındadır (Zhang vd 2017). Günümüzde artan genetik araştırmalar, kişiselleştirilmiş onkoloji, hedefleyici tedavi yaklaşımlarındaki gelişmeler KHDAK tedavisinde ve hastaların yaşam kalitesinin iyileştirilmesinde önemli kazanımlar sağlasa da akciğer kanser heterojenitesi, tedaviye karşı gelişen direnç, rekürrens ve hala tam aydınlatılmamış moleküler mekanizmalar yeni tedavi stratejilerinin ortaya konması için aşılması gereken engellerdir.

Otofaji, starvasyon (açlık), hipoksi, reaktif oksijen türleri (ROS), ve DNA hasarı gibi stres koşullarına yanıt olarak indüklenen hücresel degradasyon prosesidir. Bu mekanizma mayalardan insanlara kadar korunmuş ve fonksiyonlarını kaybetmiş ya da hücre için gereksiz organellerin, agregatlaşmış ya da yanlış üretilmiş proteinlerin eliminasyonunu sağlayarak hücre içi homeostazı sağlar. Otofaji üzerine yapılmış ilk çalışmalar bu mekanizmayı bir hücre sağkalım yolağı olarak tanımlamış olsa da günümüze kadar elde edilen bilgiler doğrultusunda otofajinin sağkalım yolağı olmasının yanında koşullara, uyarana türü ve süresine bağlı olarak hücre ölüm yolaklarından biri olduğu ortaya konmuştur. Otofaji mekanizmasında meydana gelen aksaklıklar nörodejeneratif hastalıklar, metabolik hastalıklar ve kanser gibi çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmiştir. Otofajinin karsinogenez sürecinde oynadığı rol kanser evresine, kanser türüne bağlı olarak onkogenik ya da tümör

baskılayıcı bir mekanizma olarak karşımıza çıkar. Yapılan çalışmaların genelinde erken evre kanserlerde otofaji, DNA hasarı gibi durumlarda hücre ölümüne sebep olarak kanserli hücreyi ölüme yönlendiren ya da hücrede fazla ya da yanlış üretilen protein eliminasyonu ile oluşan stresi ortadan kaldırarak kanser hücresinin agresif yetenek kazanmasına engel olduğu için tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak davranır. Ancak ileri evre kanserlerde DNA tamir mekanizmasında yer alan proteinlerin de eliminasyonuna neden olarak mutasyon birikimine neden olduğu için ya da migrasyon yapma yeteneği kazanan hücrelerde besin yokluğu durumunda hücreye enerji kaynağı sağlayabildiği için onkogenik bir mekanizma olarak davranabilir. Kanser progresyonunda oynadığı rolün yanında otofajinin kanser tedavisinde tedaviye direnç gelişimine neden olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur (O'Donovan vd 2011, Tarabe vd 2017, Battista vd 2018). Tümör tipi, evresi ve gen ekspresyon profillerinin yanısıra kanser tiplerinin sahip olduğu hücresel metabolizmayı etkileyebilen somatik mutasyonlar da otofaji inhibisyonuna duyarlılığı belirleyebilir. KRAS-mutant ve LKB1-mutant (KL mutant) küçük hücre dışı akciğer kanserleri sıklıkla immunoterapiye direnç geliştirir. Bu da bu genotipin yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyacı olduğunu gösterir (Skoulidis vd 2018). Otofaji inhibisyonunun, bu KL mutant akciğer kanserlerinde efektif bir tedavi yaklaşımı olabileceği yönünde güçlü bulgular mevcuttur (Bhatt vd 2019). Tezimizde kullandığımız H1299 hücre hattı da heterzigot *N-RAS* mutasyonuna (c.181C>A) ve homozigot *p53* delesyonuna sahiptir (Mitsudomi vd 1992, Bodner vd 1992, Davies vd 2002). Bazal otofaji düzeyi, *N-RAS* mutant H1299 hücrelerinde yüksektir ve hücre büyümesini ve sağkalımı destekler (Guo vd 2011).

Tez çalışmamızda Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde otofaji mekanizması ile NF κ B yolları arasındaki olası ilişkinin aydınlatılmasını ve bu ilişkide rol oynayan olası genlerin tespit edilmesini amaçladık. NF κ B transkripsiyon faktörü, çoğu multiselüler organizmada sıkı şekilde korunmuştur ve gelişim, immun yanıt, yaşlanma, proliferasyon, invazyon gibi çeşitli selüler proseslerde rol oynayan 200'den fazla genin transkripsiyonel regülasyonundan sorumludur (Aggarwal 2004). NF κ B yolları ve otofaji mekanizması birbirleri ile karşılıklı etkileşim halindedirler ancak bu etkileşim karmaşık ve şaşırtıcı olabilmektedir. Aslında bazı hücre hatlarında TNF α , ROS ve starvasyon-aracılı indüklenme sonucunda NF κ B, otofajinin negatif regülatörü olarak davranırsa da aksini gösteren ve NF κ B yolağını uyaran etkenlerden olan TNF α 'nın, tamoksifenin, seramidin ve ER stresinin otofajiyi indüklediğini gösteren kanıtlar da mevcuttur (Copetti vd 2009). Otofaji, NF κ B yolağında rol oynayan IKK α , IKK β , IKK γ ve NIK gibi düzenleyici proteinlerin degradasyonuna ya da doğrudan NF κ B degradasyonuna neden olarak NF κ B yolağının inhibisyonuna neden

olabilir. Ayrıca otofaji mekanizmasında düzenleyici rol oynayan p62, ATG5 gibi proteinlerin NF κ B yolağındaki proteinler ile etkileşimi de bu iki farklı yolağın birbirini etkilemesine neden olabilir (Trocoli ve Djavaheri-Mergny 2011). NF κ B'nin TNF ile uyarımı sonucunda otofajinin negatif regülatörü mTOR aktivasyonu nedeniyle otofajinin baskılanması bazı kanser türlerinde gösterilmiştir (Djavaheri-Mergny 2006, Djavaheri-Mergny 2007). Bunun yanında NF κ B, IKK aktivitesinden bağımsız olarak ısı-şok stresine yanıt sırasında I κ B ile olan kompleksin termobilitesinin değişmesi üzerine aktive olarak otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca NF κ B'nin otofaji-bağımlı hücre ölümünün indüklenmesinde de rol oynadığını ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Nivon vd 2009, Hwang vd 2010). Otofaji mekanizmasında anahtar rol oynayan proteinlerin transkripsiyonel düzenlenmesini sağlayan NF κ B, pro-otofajik proteinleri hedef aldığı otofajiyi indükleyebilirken anti-otofajik proteinleri hedeflediğinde de otofajiyi inhibe edebilir (Trocoli ve Djavaheri-Mergny 2011). Kısacası NF κ B-otofaji ilişkisi, hücre tipi ve uyarın tipine göre farklı şekilde olabilir. Otofaji ve NF κ B yollarının regülasyonu tümörögenez kontrolünde rol oynayan birçok yolağın regülasyonu ile de çakıştığı için NF κ B-otofaji ilişkisinin aydınlatılması önem taşımaktadır.

Han ve arkadaşlarının (2018), tez çalışmamızda da kullanmış olduğumuz Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri hücre hattı olan H1299 ile yaptığı bir çalışmada TRIM59 proteininin NF κ B yolağını baskılayarak, Beclin1 ekspresyon düzeyinin düşmesine, böylece otofajinin de baskılanmasına neden olduğu ve NF κ B overekspresyonunun ise Beclin1 ekspresyon artışına neden olduğu gösterilmiştir. Beclin1 geninin promotör bölgesinde de NF κ B bağlanma bölgesi taşıdığı ve NF κ B'nin Beclin1 promotörünü indüklediği bu sayede de otofajiyi hem bazal şartlarda hem de otofaji indüklü şartlarda pozitif regüle ettiği bilinmektedir (Copetti vd 2009). Bu literatür bilgileriyle tutarlı olarak tez çalışmamızın ilk aşamasında; KHDAK hücrelerinde normal şartlarda ve otofaji indüklü şartlarda NF κ B overekspresyonunun sağlanmasıyla LC3BII ekspresyon düzeyindeki artış ve NF κ B susturulması ile LC3BII ekspresyon düzeyindeki düşüşe dayanarak NF κ B transkripsiyon faktörünün otofajinin pozitif regülasyonunda rol oynadığını gösterdik. Sonraki deneylerimiz bu regülasyonda rol oynayan genleri saptamaya yönelikti. Bunun için yine NF κ B overeksprese edilen ve susturulan otofaji indüklenmeyen ve otofaji indüklü şartlardaki KHDAK hücrelerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilerek bu örneklerde RNA sekans analizi gerçekleştirildi. Sekanslama sonucunda tüm örnek gruplarında toplam 27.685 gen saptandı ve bunlardan 14.806'sı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Karşılaştırma grupları arasında yapılan ve farklı ekspresyon profillerini belirlemeye yarayan DEG analizi

sonucunda 14.806 genden 926'sı tüm karşılaştırma grupları arasında farklı ekspresyon düzeyi sergileyen genler, mikroRNA'lar ve uzun kodlamayan RNA'lar olarak belirlendi. Ancak bizim hipotezimiz ile uyumlu olarak bu 926 gen içerisinde otofaji indüklü şartlarda ekspresyonu en az 1,5 kat artış gösteren ve NF κ B overeksprese edildiğinde de bu artışı koruyan, NF κ B susturulduğunda ekspresyonu düşen ve tüm karşılaştırma grupları arasında hipotezimize uygun ekspresyon değişimi sergileyen genler değerlendirilerek toplam 23 gen qRT-PCR ile ekspresyonları teyit edilmek üzere belirlendi. Bu 23 genin 3 tanesi otofaji indüklü şartlarda ekspresyonu düşen ve NF κ B overeksprese edildiğinde ekspresyonları yine düşüş gösteren genlerdir. qRT-PCR analizi sonucunda 23 gen içerisinde 8 genin mRNA ekspresyon değişim sonuçları hipotezimize uygun olarak tespit edildi. Bu genler; *EGR3*, *EBI3*, *MMP15*, *FBLN5*, *STK32A*, *SPOCK2*, *TGF β 1* ve *NLRP3* adlı genlerdir. Bu genlerin hepsinde *in silico* olarak tahmini promoter bölgeleri saptanmış ve hepsinde de en az bir tane κ B bölgesinin varlığı belirlendi.

Tez çalışmamızda saptamış olduğumuz genlerden biri olan *EGR3* (Early Growth Response 3), arka beyin gelişiminde ve periferik sinir sistemi miyelinasyonunda önemli fonksiyona sahip olan ve T ve B hücre gelişiminde rol oynayan erken büyüme yanıt gen ailesinin (EGR) bir üyesi olan çinko-parmak transkripsiyon faktörüdür (Toppilko vd 1994, Li vd 2012). T hücrelerinin antijenik uyarılmasıyla salınan sitokinler ve kemokinler gibi immun medyatörler *EGR3* ve NF κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna sebep olur. Bir çalışma da Jurkat hücrelerinde NF κ B (RELA/p65) ve *EGR3* transkripsiyon faktörlerinin fiziksel etkileşim kurarak *IL-2*, *TNF α* ve *ICAM-1* gibi inflamatuvar gen promoterlarının transkripsiyonunu güçlü bir şekilde aktive ettikleri gösterilmiştir (Wieland vd 2005). *TNF α* tarafından uyarılan başlıca sinyal yollarından olan NF κ B yolağı ile yine *TNF α* ile upregüle olduğu saptanan *EGR3* arasında bağlantı kuran bir diğer çalışmada NF κ B'nin *EGR3* transkripsiyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir (To vd 2013). Bu çalışmaların sonuçlarıyla tutarlı olarak tez çalışmamızda NF κ B overeksprese edilen KHDAK hücrelerinde *EGR3* ekspresyon artışı, NF κ B susturulan KHDAK hücrelerinde ise *EGR3* ekspresyon düşüşü hem RNA-seq analizi ile hem de qRT-PCR analizi ile gösterilmiştir. *In silico* analizlerimizde *EGR3* geninin tahmini promoterında 6 adet κ B bağlanma motifi tespit ettik ancak literatürde *EGR3* promoterında NF κ B bağlanma motifi varlığını gösteren deneysel bir çalışma bulunmamaktadır. *EGR3*'ün bir transkripsiyon faktörü olarak hedeflediği genler arasında otofagozom oluşumunda rol oynayan *ATG12*'nin yer aldığı bilgisi TRANSFEC veritabanında belirtilmiştir. Ayrıca otofajinin, T hücrelerinin gelişiminde, aktivasyonunda ve

farklılaşmasında rol oynadığı düşünüldüğünde yine bu selüler proseslerde majör roller oynayan EGR3 transkripsiyon faktörünün otofaji mekanizmasıyla ilişkili olması mümkün gözükmektedir. Tez çalışmamızın sonuçlarına dayanarak KHDAK hücrelerinde *EGR3* ekspresyon artışının NF κ B aracılığı ile gerçekleşerek otofaji indüksiyonunda ve/veya regülasyonunda rol oynadığını düşünmekteyiz.

Saptadığımız bir diğer gen olan *EBI3* (Epstein–Barr virus-induced gene 3) ilk tanımlandığında Epstein-Barr virüsü (EBV) ile enfekte olmuş B hücrelerinde artan ekspresyonuyla karakterize edilmiş daha sonrasında IL-12 ailesinin bir üyesi olarak raporlanmış bir gen dir (Devergne vd 1998). p28 ile birleşerek IL-27 heterodimerik sitokini, p35 ile birleşerek de IL-35'i oluşturur ve doğal immunitede rol oynar (Bohme vd 2016). NF κ B (RELA/p65) ile *EBI3* arasındaki etkileşim ile ilgili literatür bilgisi tarandığında akut miyeloid lökemi hücrelerinde yapılan bir çalışmada *EBI3* promoterında 1 tanesi fare ve insanlarda korunmuş diğeri sadece insanlarda olan 2 tane NF κ B bağlanma bölgesi deneysel olarak saptanmış ve bu bölgelerin IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından indüksiyon için çok önemli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada NF κ B bağlanma bölgesinin *EBI3* geninin indüksiyonu için elzem bir ön koşul olduğuna dikkat çekilmiştir (Poleganov vd 2008). Fare *EBI3* geninin promoterında da korunmuş olan bu NF κ B bağlanma bölgesi 2005 yılında Wirtz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da gösterilmiştir. Ayrıca *EBI3* geni, NF κ B hedef genlerini çeşitli platformları bir araya getirerek ve bu alanda yapılan çalışmaları tarayarak oluşturulmuş bir veritabanı çalışmasında NF κ B hedef genleri arasında yer almaktadır (WEB_13). *EBI3* geninin NF κ B-aracılı güçlü indüksiyonunu gösteren bir diğer çalışma da Callegari ve arkadaşları (2019) tarafından HeLa hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamızda bu literatür bilgileriyle uyumlu olarak NF κ B overeksprese ettiğimiz otofaji indüklü H1299 hücre hatlarında *EBI3* ekspresyonu kontrole kıyasla yüksektir. Bu da *EBI3* geninin NF κ B aracılığı ile otofajiyi regüle edebileceğini göstermektedir. Otofajinin doğal ve adaptif immun yanıtta hücrel bir savunma mekanizması olarak rol oynadığı bilinmektedir. Sitokinler ile otofaji arasındaki ilişkinin aydınlatılması ile otofajinin immun yanıtı nasıl kontrol ettiği anlaşılmaya çalışılmaktadır. *EBI3* proteinin alt ünitesi olduğu IL-27 ve IL-35 sitokinleri ile otofaji mekanizması üzerine yapılmış olan az sayıda çalışmada IL-27'nin otofajiyi negatif regüle ettiği, IL-35'in ise otofaji mekanizmasındaki rolünün hala net olarak anlaşılmadığı belirtilmiştir (Sharma vd 2014, Wu vd 2016). Ancak sonuçlarımız göstermektedir ki, Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde

NF κ B-aracılı *EBI3* ekspresyon artışının otofajinin pozitif regülasyonunda rol oynaması kuvvetle muhtemeldir.

MMP15 (Matrix Metalloproteinaz 15), matriks metaloproteinaz ailesinin membran-tip alt ailesine dahil olan ve embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve doku remodellenmesi gibi normal fizyolojik koşullarda ekstraselüler matriksin yıkımında rol oynayan protein kodlayan bir genidir. *MMP15* proteini ayrıca kanser progresyonunda ve metastazda da rol oynar (WEB_9). *MMP15* proteininin kanser hücrelerinde anti-apoptotik yolda görevli bir eleman olarak rol oynadığı da ortaya konmuştur (Abraham vd 2005). Akciğer kanser hücrelerinde ve dokularında *MMP15* ekspresyonunun artışı rapor edilmiş ve aynı çalışmada hem fare hem de insan *MMP15* gen promotorunda ikişer tane yüksek skorlu NF κ B (RELA/p65) bağlanma bölgesi saptanmıştır (Liu vd 2016). Bu literatür bilgisi ile tutarlı olarak tez çalışmamızın sonuçlarına göre veritabanlarını incelediğimizde *MMP15* genine ait 2 farklı tahmini promotor bölgesinde toplam 5 adet NF κ B bağlanma bölgesi olduğunu gördük. RNA-seq ve qRT-PCR sonuçlarımızda otofaji indüklü şartlarda H1299 hücrelerinde artan *MMP15* ekspresyonu, NF κ B overeksprese edilen otofaji indüklü şartlarda da artarken NF κ B susturulduğunda azalmaktadır. Bu sonuç bize, NF κ B'nin *MMP15* ekspresyonunu indükleyerek otofajiyi pozitif yönde regüle edebileceğini düşündürmektedir. Literatürde otofaji mekanizması ve *MMP15* ilişkisi üzerine yapılmış spesifik bir çalışmanın bulunmayışı bu alanda ileri araştırmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

FBLN5 (Fibulin 5) geni, bir ekstraselüler matriks proteini kodlar. Bu protein integrinler ile etkileşerek endotelial hücre adhezyonunu destekler ve daha çok vasküler gelişimde rol oynar (WEB_9). Veritabanlarında yaptığımız inceleme sonucunda *FBLN5* geninin tahmini 4 farklı promotor bölgesinde 19 adet NF κ B bağlanma bölgesi olduğunu gördük. *FBLN5*'in tez sonuçlarımızda ortaya koymuş olduğumuz 8 gen arasında en fazla muhtemel NF κ B bağlanma bölgesine sahip gen olmasına rağmen literatürde NF κ B'nin *FBLN5* promotorunu hedef aldığını gösteren herhangi bir veriye rastlamadık. Otofaji ile *FBLN5* ilişkisi hakkındaki tek çalışmada da ekfaliyasyon sendromu hastalığı üzerine yapılmış ve starvasyon üzerine indüklenen otofaji nedeni ile *FBLN5* birikiminin arttığı gösterilmiştir (Want vd 2016). Tezimizin sonuçlarına dayanarak Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NF κ B-aracılı *FBLN5* ekspresyon artışının otofajinin indüksiyonunda ve regülasyonunda rol oynayabileceğini düşünmekteyiz.

STK32A (Serin/treonin kinaz 32A) geninden kodlanan protein, Gene Ontology (GO) veritabanında fosfat gruplarının transferinden sorumlu transferaz aktivitesine sahip protein tirozin kinaz aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir ve hücre içi sinyal iletiminde rol oynadığı

belirtilmiştir (WEB_10). STK32A, hücresel homeostaz, transkripsiyon faktörü fosforilasyonu ve hücre döngüsü düzenlemesinde önemli role sahip olan serin / treonin kinaz ailesi üyesidir (Edelman ve Blumenthal 1987). Yaptığımız *in silico* promoter analizinde STK32A genine ait tahmini promoter bölgesinde 4 adet NF κ B bağlanma bölgesi olduğu görülmüştür. Ancak literatürde NF κ B ve STK32A ilişkisini ve STK32A'nın otofaji regülasyonunda rol oynadığını gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Tezimizin RNA-seq sonuçlarına dayanarak yapılan Gene Ontology veritabanı analizinde GO:0006914 kodu ile kayıtlı otofaji ve GO:0016236 koduyla kayıtlı makrotofaji proseslerinde rol oynayan gen ve gen ürünlerine bakıldığında STK32A'nın iki biyolojik proste de yer alan genler arasında kayıtlı olduğu gözlenmiştir (WEB_10). Çalışmamızın verileri, NF κ B-aracılı otofaji regülasyonunda STK32A gen ekspresyonunun otofajiyi indükleyici etkisi olabileceği yönündedir. Bu nedenle bu mekanizmanın ileri araştırmalarla aydınlatılmasının literatüre katkı sunabileceğini düşünmekteyiz.

SPOCK2 geni, glukozaminglekanlar ile bağlanarak ekstraselüler matriks yapısına katılan bir protein kodlayan gendir. Gene Ontology veritabanında SPOCK2 protein fonksiyonu olarak kalsiyum iyon bağlayıcı ve ekstraselüler matriks bağlayıcı özellikleri olduğu belirtilmiştir (WEB_10). Literatürde SPOCK2 ve NF κ B ilişkisine ve bu ilişkinin otofaji regülasyonunda yer aldığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak tez çalışmamızda SPOCK2 geninin 3 farklı tahmini promoter bölgesinde toplam 6 NF κ B bağlanma bölgesi saptadık. Tezimizin sonuçları Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NF κ B-aracılı pozitif otofaji regülasyonunda SPOCK2 geninin rol oynayabileceği yönündedir.

TGF β 1 (Transforming Growth Factor Beta Induced) geninden TGF β uyarımıyla eksprese olan protein, tip I, II ve IV kollajenlere bağlanarak hücre-kollajen etkileşiminde rol oynar ve hücre adhezyonunu inhibe eder (WEB_10). TGF β 1 geninde meydana gelen nokta mutasyonu sonucunda mutant-TGF β 1 hücrelerde birikir ve otozomal dominant bir hastalık olan granüler korneal distrofi tip 2 meydana gelir. Bu mutant-TGF β 1 proteini birikiminin mTOR'un negatif regülatörü RAPTOR düzeyindeki düşüşten sorumlu olabileceği ve bu nedenle otofaji mekanizmasındaki duraksamayla karşılıklı ilişki içerisinde olarak hastalığın patogeneğinde yer aldığı raporlanmıştır (Choi vd 2012, Choi vd 2014). Bu da TGF β 1 proteinin otofajinin pozitif regülasyonunda rol oynayabildiğini göstermektedir. Tez çalışmamızın sonucunda gözlemlenen otofaji indüklü grupta artan TGF β 1 ekspresyonu bu literatür bilgisi ile uyumludur. TGF β 1 promoterındaki NF κ B bağlanma bölgesi varlığına dair yaptığımız *in silico* analiz sonucunda 2 adet tahmini bağlanma bölgesi saptadık. Ancak

literatürde NF κ B'nin TGF β 1 ekspresyonu üzerindeki etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

NLRP3 geni (NLR Family Pyrin Domain Containing 3), bir pyrin domaini, nükleotid bağlanma bölgesi domaini ve lösin-zengin motif içeren protein kodlayan bir gendir. *NLRP3* proteini kaspaz çağrılmasından sorumlu apoptoz-ilişkili proteinler ile kompleks oluşturarak *NLRP3* inflamazomu adını alır, NF κ B sinyal yolağının upstream aktivatörü olarak çalışır ve inflamasyonun, immun yanıtın ve apoptozun regülasyonunda rol oynar (WEB_10). Bu inflamazom özellikle patern tanıma reseptörlerini, patojen-ilişkili moleküler paternleri (PAMP'lar) ve hasar-ilişkili moleküler paternleri (DAMP'lar) tanır ve IL-1 β ve IL-18 aktivasyonunu, olgunlaşmasını ve salınımını destekler (Cao vd 2019). Sürekli ve anormal *NLRP3* sinyali Alzheimer, ateroskleroz ve kanser gibi birçok kronik ve dejeneratif hastalığın patogenezinde rol oynar. NF κ B sinyal yolağı *NLRP3* aktivasyonunda rol oynamaktadır ve hem insan hem de fare *NLRP3* geninin promotöründe NF κ B bağlanma motifi bulunduğu deneysel olarak gösterilmiştir (Qiao vd 2012, Boaru vd 2015). Bu çalışmalarla tutarlı olarak çalışmamızda *in silico* olarak *NLRP3* geninin tahmini promotöründe 5 adet NF κ B bağlanma bölgesi saptadık. Otofaji ve *NLRP3* ilişkisi ise karşılıklı ve karmaşıktır. Bu konuda literatürde *NLRP3* inflamazomunun otofajiyi desteklediğini gösteren çalışmalar ve bunun aksini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Cao vd 2019). *NLRP3* inflamazomunun çalışmalarda genellikle otofajiyi inhibe edici rol oynadığı gösterilmişse de bizim tez sonuçlarımız ile tutarlı olan bir çalışmada makrofajlarda *NLRP3* inflamazom aktivasyonunu RalB adlı G proteini ile etkileşerek otofaji indüksiyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Shi vd 2012). Ayrıca diğer bir çalışmada da *NLRP3*-aracılı otofajinin makrofajlarda bakterilerin eliminasyonu için önemli olduğu ortaya konmuştur (Deng vd 2016). Yani *NLRP3* ile otofaji ilişkisi hücre tipine ve koşullara göre değişim gösterebilen ve hala daha aydınlatılması gereken soruların olduğu bir konudur.

Çalışmamızda Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NF κ B-aracılı otofaji regülasyonunun ne şekilde olduğunu açıklamayı ve bu regülasyona aracılık eden, NF κ B tarafından ekspresyonu regüle edilen genleri tespit etmeyi amaçladık. Western blot analizlerimiz sonucunda Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserinde NF κ B'nin otofajiyi pozitif regüle ettiğini gözlemledik. Literatürde Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NF κ B'nin starvasyon-indüklü otofajiyi pozitif regüle ettiğini gösteren bir adet çalışma bulunmaktadır ve bu çalışma ile sonuçlarımız tutarlılık göstermektedir (Han vd 2018). NF κ B'nin overeksprese edildiği ve susturulduğu otofaji indüklenmeyen ve otofaji indüklü şartlardaki Küçük Hücre

Dışı Akciğer Kanseri hücrelerinde yapmış olduğumuz RNA-seq ve qRT-PCR deneyleri sonucunda ulaşılmış olduğumuz genlerin promoter bölge tespitlerini ve bu tahmini promoterlarında NFκB bağlanma bölgesi varlığının tespitini *in silico* olarak gerçekleştirdik. Bu genlerin NFκB-aracılı otofaji regülasyonunda rol oynadığını gösteren sonuçlarımızın literatüre katkı sunmak açısından önem taşıdığını ve bu konuda yapılacak ileri çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

1. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NFκB transkripsiyon faktörü, Torin1 uygulanarak indüklenen otofajiyi pozitif yönde regüle etmektedir.
2. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NFκB-aracılı otofaji regülasyonunda rol oynayan genler arasında çalışmamız kapsamında belirlemiş olduğumuz en öncelikli olan genler *EGR3*, *EBI3*, *MMP15*, *FBLN5*, *STK32A*, *SPOCK2*, *TGFβ1* ve *NLRP3*'tür.
3. *In silico* analizlerimiz sonucunda *EGR3*, *EBI3*, *MMP15*, *FBLN5*, *STK32A*, *SPOCK2*, *TGFβ1* ve *NLRP3* genlerinin tahmini promoterlarında birden fazla NFκB bağlanma motiflerinin varlığı gözlemlenmiştir.
4. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NFκB ekspresyonuyla aynı yöndeki *EGR3* ekspresyon değişimleri otofajinin pozitif regülasyonunda NFκB/EGR3 aksisinin rol oynayabileceğini göstermektedir.
5. İndüksiyonu için NFκB'nin elzem olduğu, fare ve insanda korunmuş NFκB bağlanma motifi taşıdığı bilinen *EBI3* geni Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde otofajinin pozitif regülasyonunda NFκB/EBI3 aksisi olarak rol oynuyor olabilir.
6. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NFκB ekspresyonuyla aynı yöndeki *MMP15* ekspresyon değişimleri otofajinin pozitif regülasyonunda NFκB/MMP15 aksisinin rol oynayabileceğini göstermektedir.
7. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NFκB ekspresyonuyla aynı yöndeki *FBLN5* ekspresyon değişimleri otofajinin pozitif regülasyonunda NFκB/FBLN5 aksisinin rol oynayabileceğini göstermektedir.
8. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NFκB ekspresyonuyla aynı yöndeki *STK32A* ekspresyon değişimleri otofajinin pozitif regülasyonunda NFκB/STK32A aksisinin rol oynayabileceğini göstermektedir.
9. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NFκB ekspresyonuyla aynı yöndeki *SPOCK2* ekspresyon değişimleri otofajinin pozitif regülasyonunda NFκB/SPOCK2 aksisinin rol oynayabileceğini göstermektedir.

10. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NF κ B ekspresyonuyla aynı yöndeki *TGF β 1* ekspresyon değişimleri otofajinin pozitif regülasyonunda NF κ B/TGF β 1 aksisinin rol oynayabileceğini göstermektedir.
11. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserlerinde NF κ B ekspresyonuyla aynı yöndeki *NLRP3* ekspresyon değişimleri otofajinin pozitif regülasyonunda NF κ B/NLRP3 aksisinin rol oynayabileceğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

Abraham R, Schäfer J, Rothe M, Bange J, Knyazev P, Ullrich A. Identification of MMP-15 as an anti-apoptotic factor in cancer cells. **J Biol Chem**. 2005;280(40):34123-32.

Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. **Cancer Cell** 2004; 6 (3):203-208
Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. **Genomics**. 1999;59:59–65.

Akopyan G, Bonavida B. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. **Int J Oncol**. 2006; 29(4):745–752.

Amerikan Genel Cerrahi Derneği (U.S. Department of Health and Human Services PHS), "The health consequences of smoking: a report of the Surgeon General", **Centers for Disease Control and Prevention**, Washington, DC: CDC Publication; 2004, Vol. 7829.

Arakawa S, Tsujioka M, Yoshida T, Tajima-Sakurai H, Nishida Y, Matsuoka Y, et al. Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of Bax/Bak double-knockout mice. **Cell Death Differ**. 2017;24: 1598–608.

Arkan MC, Greten FR. IKK- and NFkappaB-Mediated Functions in Carcinogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**. 2011;349:159-69.

Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. **J Cell Biol**. 2008; 182:685–701.

B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, et al. The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. **Nucleic Acids Res**. 2013;41:7683–99.

Bando M, Takahashi M, Ohno S, Hosono T, Hironaka M, Okamoto H, Sugiyama Y. Torque teno virus DNA titre elevated in idiopathic pulmonary fibrosis with primary lung cancer. **Respirology**. 2008; 13(2):263–269.

Barre B, Perkins ND. The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis. **Mol Cell**. 2010; 38: 524-538.

- Basseres DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. **Oncogene**. 2006; 25: 6817-6830.
- Battista RA, Resnati M, Facchi C, Ruggieri E, Cremasco F, vd. (2018) Autophagy mediates epithelial cancer chemoresistance by reducing p62/SQSTM1 accumulation. **Plos One**. 2018;13(8): e0201621.
- Belinsky SA, Devereux TR, Maronpot RR, Stoner GD, Anderson MW. Relationship between the formation of promutagenic adducts and the activation of the K-ras protooncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines. **Cancer Res**. 1989; 49(19):5305–5311.
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. **Mol Cell Biol**. 2009;29:2570–81.
- Bhatia R, Lopipero P, Smith AH. Diesel exhaust exposure and lung cancer. **Epidemiology**. 1998; 9(1):84–91.
- Bhatt V, Khayati K, Hu ZS, Lee A, Kamran W, Su X, vd. Autophagy modulates lipid metabolism to maintain metabolic flexibility for Lkb1- deficient Kras-driven lung tumorigenesis. **Genes Dev**. 2019;33:150–65.
- Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Van de Leur E, Lehnen E, Liedtke C, Weiskirchen R. NLRP3 inflammasome expression is driven by NF-κB in cultured hepatocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. 2015;458(3):700-706.
- Bodner SM, Minna JD, Jensen SM, et al. Expression of mutant p53 proteins in lung cancer correlates with the class of p53 gene mutation. **Oncogene**. 1992;7(4):743-749.
- Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol**. 2004; 25: 280-288.
- Boone CW, Kelloff GJ, Malone WE. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. **Cancer Res**. 1990; 50(1):2–9.
- Botti J, Djavaheri-Mergny M, Pilatte Y, Codogno P. Autophagy signaling and the cogwheels of cancer. **Autophagy**. 2006; 2: 67-73
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. 2018; 68: 394-424.
- Budanov AV, Karin M. p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling. **Cell**. 2008; 134, 451–460.
- Buring JE, Hennekens CH. Beta-carotene and cancer chemoprevention. **J Cell Biochem Suppl**. 1995; 22:226–230.
- Byers TE, Graham S, Haughey BP. Diet and lung cancer risk: findings from the Western New York Diet Study. **Am J Epidemiol**. 1987; 125(3):351–363.

Callegari A, Sieben C, Benke A, Suter DM, Fierz B, Mazza D, Manley S. Single-molecule dynamics and genome-wide transcriptomics reveal that NF- κ B (p65)-DNA binding times can be decoupled from transcriptional activation. *PLoS Genet.* 2019;15(1):e1007891.

Cao Z, Wang Y, Long Z, He G. Interaction between autophagy and the NLRP3 inflammasome. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2019;51(11):1087-1095.

Castro CY, Ostrowski ML, Barrios R, Green LK, Popper HH, Powell S, Cagle PT, Ro JY. Relationship between Epstein-Barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature. *Hum Pathol.* 2001; 32(8):863–872.

Cersosimo RJ. Lung cancer: a review. *Am J Health Syst Pharm.* 2002;59(7):611-642.

Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene.* 2010;30(14):1615-30.

Chen J, Chen ZJ. Regulation of NF- κ B by ubiquitination. *Curr. Opin. Immunol.* 2013; 25, 4–12.

Chen YC, Chen JH, Richard K, et al. Lung adenocarcinoma and human papillomavirus infection. *Cancer.* 2004; 101(6):1428–1436.

Chiu YH, Hsu SH, Hsu HW, vd. Human non-small cell lung cancer cells can be sensitized to camptothecin by modulating autophagy. *Int J Oncol.* 2018;53(5):1967–1979.

Cho KH, Park JH, Kwon KB, Lee YR, So HS, Lee KK, vd. Autophagy induction by low-dose cisplatin: the role of p53 in autophagy. *Oncol Rep.* 2014;31(1):248-54.

Choi SI, Kim BY, Dadakhujaev S, Oh JY, Kim TI, Kim JY, Kim EK. Impaired autophagy and delayed autophagic clearance of transforming growth factor β -induced protein (TGFBI) in granular corneal dystrophy type 2. *Autophagy.* 2012 Dec;8(12):1782-97.

Choi SI, Maeng YS, Kim KS, Kim TI, Kim EK. Autophagy is induced by raptor degradation via the ubiquitin/proteasome system in granular corneal dystrophy type 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Aug 8;450(4):1505-11.

Colleran A, Ryan A, O'Gorman A, Mureau C, Liptrot C, Dockery P, Fearnhead H, Egan LJ. Autophagosomal I κ B α degradation plays a role in the long term control of tumor necrosis factor- α -induced NF- κ B activity. *J Biol Chem.* 2011; 286(26):22886-93.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 2009; 30:1073–81.

Conde E, Angulo B, Izquierdo E, vd. Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. *Clin Transl Oncol.* 2013;15(7):503–8.

Cook MB, McGlynn KA, Devesa SS, Freedman ND, Anderson WF. Sex disparities in cancer mortality and survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20(8):1629–1637.

- Copetti T, Bertoli C, Dalla E, Demarchi F, Schneider C. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Mol Cell Biol.* 2009;29(10):2594-608.
- Copetti T, Demarchi F, Schneider C. p65/ RelA binds and activates the beclin 1 promoter. *Autophagy.* 2009; 5: 858-859.
- Cote ML, Kardia SL, Wenzlaff AS, Ruckdeschel JC, Schwartz AG. Risk of lung cancer among white and black relatives of individuals with early-onset lung cancer. *JAMA.* 2005; 293(24), 3036–3042.
- Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell.* 2006; 126(1):121-34.
- Dan HC, Adli M, Baldwin AS. Regulation of mammalian target of rapamycin activity in PTEN-inactive prostate cancer cells by I kappa B kinase alpha. *Cancer Res.* 2007; 67: 6263- 6269.
- Dan HC, Baldwin AS. Differential involvement of IkappaB kinases alpha and beta in cytokine- and insulin-induced mammalian target of rapamycin activation determined by Akt. *J Immunol.* 2008; 180: 7582-7589.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-954.
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine.* 2011; 32(4).
- Deng Q, Wang Y, Zhang Y, Li M, Li D, Huang X, Wu Y, Pu J, Wu M. Pseudomonas aeruginosa Triggers Macrophage Autophagy To Escape Intracellular Killing by Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Infect Immun.* 2016 Jan; 84(1):56-66.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science.* 1996; 274(5286):430–432.
- Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol.* 1967;33:437–449.
- Dholaria B, Hammond W, Shreders A, Lou Y. Emerging therapeutic agents for lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* 2016; 9, 138.
- Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, vd. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol.* 2010; 191(1): 155-168.
- Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Codogno P. Regulation of autophagy by NFkappaB transcription factor and reactivities oxygen species. *Autophagy.* 2007; 3: 390-392.

- Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besancon F, Bauvy C, Souquere S, Pierron G, and Codogno P. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem*. 2006; 281: 30373- 30382.
- Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J*. 1950; 2(4682): 739–748.
- Driscoll T, Nelson DI, Steenland K, et al. The global burden of disease due to occupational carcinogens. *Am J Ind Med*. 2005; 48(6):419–431.
- Dube S, McClave A, James C, vd. Vital signs: current cigarette smoking among adults aged ≥18 years—United States, 2009. *MMWR*. 2010; 59:1135–1140.
- Duffy A, Le J, Sausville E, Emadi A. Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;75(3):439-47.
- Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, and Gelinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene*. 2006; 25: 6800-6816.
- Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG. Protein serine/threonine kinases. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:567-613.
- Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis*. 2009;14:376–91.
- Espinosa L, Bigas A, and Mulero MC. Alternative nuclear functions for NF-kappaB family members. *Am J Cancer Res*. 2011; 1: 446- 459
- Fabre C, Carvalho G, Tasdemir E, Braun T, Ades L, Grosjean J, Boehrer S, Metivier D, Souquere S, Pierron G, Fenaux P, Kroemer G. NF-kappaB inhibition sensitizes to starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2007; 26: 4071-4083.
- Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*. 2015;22:377–88.
- Fingerhut M, Nelson DI, Driscoll T, vd. The contribution of occupational risks to the global burden of disease: summary and next steps. *Med Lav*. 2006; 97(2):313–321.
- Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non-small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol*. 2014, 90, 197–207.
- Gabrielson E. Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology*. 2006; 11(5):533–538.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486–541.

Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I, Ho W, Banerjee A. Unravelling the complexities of the NF- κ B signalling pathway using mouseknockout and transgenic models. **Oncogene**. 2006;25:6781–6799.2.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**. 2010;221(1):3-12.

Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Meyskens FL Jr, Omenn GS, Valanis B, Williams JH Jr. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. **J Natl Cancer Inst**. 2004; 96(23):1743–1750.

Govindan R. Lung cancer in never smokers: A new hot area of research. **Lancet Oncol**. 2010; 11, 304–305.

Guo JY, Chen HY, Mathew R, vd. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. **Genes Dev**. 2011;25(5):460-470.

Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochim. Biophys. Acta**. 2010; 1799, 775–787.

Han D, Li S, Zhu Y, Liu L, Li M. LKB1/AMPK/mTOR Signaling Pathway in Non-small-cell Lung Cancer. **Asian Pac. J. Cancer**. 2013; 14, 4033–4039.

Han T, Guo M, Gan M, Yu B, Tian X, Wang JB. TRIM59 regulates autophagy through modulating both the transcription and the ubiquitination of BECN1. **Autophagy**. 2018;14(12):2035-2048.

Harhaj EW, Dixit VM. Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. **Cell Res**. 2011; 21: 22-39.

Harris JE, Thun MJ, Mondul AM, Calle EE. Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982–8. **BMJ**. 2004; 328(7431):72.

Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. **Nat Cell Biol**. 2009; 11:1433-1437.

Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB in immunobiology. **Cell Res**. 2011; 21: 223-244.

Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **GenesDev**. 2012; 26:203–234

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**. 2008; 132: 344- 362.

Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, vd. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. **N Engl J Med**. 1996; 334(18):1145–1149.

Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. **N Engl J Med**. 2008;359:1367-80.

- Herrero-Martin G, Hoyer-Hansen M, GarciaGarcia C, Fumarola C, Farkas T, Lopez-Rivas A, Jaattela M. TAK1 activates AMPKdependent cytoprotective autophagy in TRAILtreated epithelial cells. **EMBO J.** 2009; 28: 677-685.
- Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Mol. Cancer.** 2013;12, 86.
- Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor κ B signaling. **Immunol Rev.** 2006, 210:171–186.
- Hoffmann D, Djordjevic MV, Rivenson A, Zang E, Desai D, Amin S. A study of tobacco carcinogenesis. II. Relative potencies of tobacco-specific N-nitrosamines as inducers of lung tumours in A/J mice. **Cancer Lett.** 1993; 71(1–3):25–30.
- Hoffmann D, Hoffmann I. The changing cigarette, 1950–1995. **J Toxicol Environ Health.** 1997; 50(4):307–364.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. **Science.** 1991; 253, 49–53.
- Holze C, Michaudel C vd. Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. **Nat Immunol.** 2018;19(2):130-140.
- Huang DB, Huxford T, Chen YQ, Ghosh G. The role of DNA in the mechanism of NF κ B dimer formation: Crystal structures of the dimerization domains of the p50 and p65 subunits. **Structure.** 1997;5, 1427–1436.
- Huang DB, Vu D, Ghosh G. NF- κ B RelB forms an intertwined homodimer. **Structure.** 2005;13, 1365–1373.
- Hwang J, Lee HJ, Lee WH, and Suk K. NF κ B as a common signaling pathway in ganglioside-induced autophagic cell death and activation of astrocytes, **J Neuroimmunol.** 2010; 226: 66-72.
- Israel A. The IKK complex, a central regulator of NF- κ B activation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2010; 2: a000158.
- Jemal A, Thun MJ, Ries LA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. **J Natl Cancer Inst.** 2008; 100(23):1672–1694.
- Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the Leading Causes of Death in the United States, 1970-2002. **JAMA.** 2005;294(10):1255-1259.
- Jordan NJ, Dutkowski CM, Barrow D, Mottram HJ, Hutcheson IR, Nicholson RI, Guichard SM, Gee JMW. Impact of dual mTORC1/2 mTOR kinase inhibitor AZD8055 on acquired endocrine resistance in breast cancer in vitro. **Breast Cancer Res.** 2014; 16, R12.
- Kabat GC, Kim M, Hunt JR, Chlebowski RT, Rohan TE. Body mass index and waist circumference in relation to lung cancer risk in the Women’s Health Initiative. **Am J Epidemiol.** 2008; 168(2):158–169.

Kabat GC, Miller AB, Rohan TE. Body mass index and lung cancer risk in women. **Epidemiology**. 2007; 18(5):607–612.

Kaminsky VO, Piskunova T, Zborovskaya IB, Tchevkina EM, Zhivotovsky B. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and- independent apoptosis by stimulating ROS formation. **Autophagy**. 2012;8(7):1032-44.

Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. **Genes Dev**. 2007;21:1621–35.

Karin M, Gallagher E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated TRAF6 signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. **Immunol Rev**. 2009; 228: 225-240.

Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**. 2006; 441: 431-436.

Kenific CM, Debnath J. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. **Trends Cell Biol**. 2015;25(1):37-45.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. 1972;26(4):239-57.

Kim HP, Wang X, Chen ZH, Lee SJ, Huang MH, Wang Y, Ryter SW, Choi AM. Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: protective role of heme oxygenase1. **Autophagy**. 2008; 4: 887-895.

Kim KW, Moretti L, Mitchell LR, Jung DK, Lu B. Combined Bcl-2/mammalian target of rapamycin inhibition leads to enhanced radiosensitization via induction of apoptosis and autophagy in non-small cell lung tumor xenograft model. **Clin. Cancer Res**. 2009;15, 6096–6105.

Kim M-J, Woo S-J, Yoon C-H, Lee J-S, An S, Choi Y-H, vd. Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. **J Biol Chem**. 2011;286:12924–32.

Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. **Genes Dev**. 2011;25:1999–2010.

Kirk GD, Merlo C, O’Driscoll P, Mehta SH, Galai N, Vlahov D, Samet J, Engels EA. HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. **Clin Infect Dis**. 2007; 45(1):103–110.

Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2007;8:931–937.

Kocaturk NM, Akkoc Y, Kig C, Bayraktar O, Gozuacik D, Kutlu O. Autophagy as a molecular target for cancer treatment. **Eur J Pharm Sci**. 2019;15(134):116-137.

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. **Cancer Res**. 2004; 64(24):8919–8923.

- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010;40:280–93.
- Kroemer G, Piacentini M. Dying to survive - apoptosis, necroptosis, autophagy as supreme experiments of nature. *Int J Dev Biol*. 2015;59(1-3):5-9.
- Kruse JP, Gu W. Modes of p53 Regulation. *Cell*. 2009;137,609–622.
- Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2011;21:71–100.
- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(12):759-774.
- Lamy L, Ngo VN, Emre NC, Shaffer AL 3rd, Yang Y, Tian E, vd. Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2013;23:435–49.
- Landi MT, Chatterjee N, Yu K, Goldin LR, Goldstein AM, Rotunno M, Mirabello L, Jacobs K, Wheeler W, Yeager M, Bergen A, Li Q. A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am. J. Hum. Genet*. 2009; 85, 679–691.
- Landi MT, Chatterjee N, Yu K, vd. A genomewide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet*. 2009;85:679-91.
- Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, Kelm O, Hung RJ, Tanie`re P, Brennan P, Boffetta P, Zaridze DG, Hainaut P. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: Distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res*. 2005; 65, 5076–5083.
- Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, Sun HL, Li LY, Ping B, Huang WC, He X, Hung JY, Lai CC, Ding Q, Su JL, Yang JY, Sahin AA, Hortobagyi GN, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell*. 2007; 130: 440-455.
- Levine B. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature*. 2007; 446: 745-747.
- Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, vd. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer*. 2014;120(18):2883–92.
- Li S, Miao T, Sebastian M, Bhullar P, Ghaffari E, Liu M, Symonds AL, Wang P. The transcription factors Egr2 and Egr3 are essential for the control of inflammation and antigen-induced proliferation of B and T cells. *Immunity*. 2012;37(4):685-96.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999;402:672–6.
- Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*. 1998;72:8586–96.

- Lipsett M, Campleman S. Occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer: a metaanalysis. *Am J Public Health*. 1999; 89(7):1009–1017.
- Lissowska J, Foretova L, Dabek J, vd. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control*. 2010;21:1091-104.
- Liu EY, Ryan KM. Autophagy and cancer – issues we need to digest. *J Cell Sci*. 2012;125:2349–58
- Liu F, Liu D, Yang Y, Zhao S. Effect of autophagy inhibition on chemotherapy-induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Oncol Lett*. 2013;5(4):1261-5.
- Liu G, Pei F, Yang F, Li L, Amin AD, Liu S, Buchan JR, Cho WC. Role Of Autophagy And Apoptosis In Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;(2): 367.
- Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpter RM Jr., Wei Y, Ginet V, Zhang L, et al. Autosis is a Na⁺,K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:20364–71.
- Liu Y, Xu Y, Guo S, Chen H. T cell factor-4 functions as a co-activator to promote NF-κB-dependent MMP-15 expression in lung carcinoma cells. *Sci Rep*. 2016;6:24025.
- Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NFκappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest*. 2005; 115: 2625-2632.
- Mahabir S, Forman MR, Dong YQ, vd. Mineral intake and lung cancer risk in the NIH American Association of Retired Persons Diet and Health study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19(8):1976–1983.
- Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, vd. Dietary zinc, copper and selenium, and risk of lung cancer. *Int J Cancer*. 2007; 120(5):1108–1115.
- Malhotra J, Jabbour S, Orlick M, Riedlinger G, Guo Y, White E, Aisner J. Cancer Phase Ib/II study of hydroxychloroquine in combination with chemotherapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Treat Res Commun*. 2019;21:100158.
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell*. 2009;137: 1062-1075.
- Mattson ME, Pollack ES, Cullen JW. What are the odds that smoking will kill you?. *Am J Public Health*. 1987; 77(4):425–431.
- Mauthe M, Jacob A, Freiburger S, Hentschel K, Stierhof YD, Codogno P, ProikasCezanne, T. Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. *Autophagy*. 2011; 7; 1448–1461.
- Menck H, Hnederson BE. Cancer incidence patterns in the Pacific Basin. *Natl Cancer Mongr*. 1982; 62:101–109.

- Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-Erk And PI3k-Mtor Pathways: Cross-Talk And Compensation. **Trends Biochem. Sci.** 2011; 36, 320–328.
- Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, vd. p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. **Oncogene.** 1992;7(1):171-180.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature.** 2008;451:1069-75.
- Mizushima N. Autophagy: process and function. **Genes Dev.** 2007;21:2861–2873.
- Mornex JF, Thivolet F, De las Heras M, Leroux C. Pathology of human bronchioloalveolar carcinoma and its relationship to the ovine disease. **Curr Top Microbiol Immunol.** 2003; 275:225–248.
- Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. **Biochim Biophys Acta.** 2009; 1793: 1524-1532.
- Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. **Cell.** 2009;137(6):1001-1004.
- Mursu J, Nurmi T, Tuomainen TP, Salonen JT, Pukkala E, Voutilainen S. Intake of flavonoids and risk of cancer in Finnish men: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. **Int J Cancer.** 2008; 123(3):660–663.
- Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. **J Cell Sci.** 2017;130(7):1209-1216.
- Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. **Nat Rev Cancer.** 2005; 5: 297-309.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2009;10:458–467.
- Naugler WE, Karin M. NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. **Curr Opin Genet Dev.** 2008; 18: 19-26.
- Niida M, Tanaka M, Kamitani T. Downregulation of active IKK beta by Ro52-mediated autophagy. **Mol Immunol.** 2010; 47: 2378- 2387.
- Nivon M, Richet E, Codogno P, Arrigo AP, Kretz-Remy C. Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. **Autophagy.** 2009; 5: 766-783.
- Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. **Nat Med.** 2013;19:983–97.
- Noguchi M, Hirata N, Suizu F. The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. **Biochim Biophys Acta.** 2014;1846:342–52.
- Nyberg F, Gustavsson P, Järup L, Bellander T, Berglind N, Jakobsson R, Pershagen G. Urban air pollution and lung cancer in Stockholm. **Epidemiology.** 2000; 11(5):487–495.

O'Donovan TR, O'Sullivan GC, McKenna SL. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. **Autophagy**. 2011; 7(5):509–524.

Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y. Crystal structure of the Bcl-XLBeclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. **J Biol Chem**. 2007;282:13123–32.

Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2001;2:211-6.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, vd. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **N Engl J Med**. 1996; 334(18):1150–1155.

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. **J Natl Cancer Inst**. 1996; 88(21):1550–1559.

Öz Arslan D, Korkmaz G, Gözüaçık D. Otofaji: Bir Hücreyel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. **Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi**. 2011;2(9): 184-194.

Panaretou C, Domin J, Cockcroft S, Waterfield MD. Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3- kinase complex. **J Biol Chem**. 1997: 272(4); 2477-2485.

Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004; 101(36):13306–13311.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. **Cell**. 2005; 122(6):927-39.

Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. **Cell Death Differ**. 2006; 13: 759-772.

Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. **Oncogene**. 2006; 25: 6717-6730.

Pershagen G. Air pollution and cancer. **IARC Sci Publ**. 1990; (104):240–251.

Pires BRB, Silva RCMC, Ferreira GM, Abdelhay E. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. **Genes (Basel)**. 2018;9(1).

Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **Int J Cancer**. 2002; 97(1):72–81.

- Poleganov MA¹, Bachmann M, Pfeilschifter J, Mühl H. Genome-wide analysis displays marked induction of EBI3/IL-27B in IL-18-activated AML-derived KG1 cells: critical role of two kappaB binding sites in the human EBI3 promotor. *Mol Immunol*. 2008 May;45(10):2869-80.
- Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002; 287(9):1132–1141.
- Qiao Y, Wang P, Qi J, Zhang L, Gao C. TLR-induced NF-κB activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS Lett*. 2012;586(7):1022-6.
- Qing G, Yan P, Qu Z, Liu H, Xiao G. Hsp90 regulates processing of NF-kappa B2 p100 involving protection of NF-kappa B-inducing kinase (NIK) from autophagy-mediated degradation. *Cell Res*. 2007;17(6):520-530.
- Qing G, Yan P, Xiao G. Hsp90 inhibition results in autophagy-mediated proteasomeindependent degradation of IkappaB kinase (IKK). *Cell Res*. 2006; 16: 895-901.
- Ralhan R, Pandey MK, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B links carcinogenic and chemopreventive agents. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2009; 1: 45-60.
- Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sciences*. 2017; 88, 53–67.
- Reggiori F, Komatsu M, Finley K, Simonsen A. Selective types of autophagy. *Int J Cell Biol*. 2012; 2012: 156272.
- Renehan AG, Tyson M, Egger M, et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008; 371(9612):569– 578.
- Rezazadeh A, Laber DA, Ghim SJ, et al. The role of human papilloma virus in lung cancer: a review of the evidence. *Am J Med Sci*. 2009; 338(1):64–67.
- Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res*. 1992; 52(Suppl 9):2665s–2669s.
- Roy S, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *Semin Immunopathol*. 2010;32:383–96.
- Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, vd. Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(18):5646–5661.
- Rydberg B, Lindahl T. Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *EMBO J*. 1982;1(2):211-216.
- Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 1973;7:253–66.

- Sharma G, Dutta RK, Khan MA, Ishaq M, Sharma K, Malhotra H, vd. IL-27 inhibits IFN-gamma induced autophagy by concomitant induction of JAK/PI3 K/Akt/mTOR cascade and up-regulation of Mcl-1 in Mycobacterium tuberculosis H37Rv infected macrophages. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014; 55: 335-47.
- Shekelle RB, Lepper M, Liu S, Maliza C, Raynor WJ Jr, Rossof AH, Paul O, Shryock AM, Stamler J. Dietary vitamin A and risk of cancer in the Western Electric study. *Lancet*. 1981; 2(8257):1185–1190.
- Shen Y, Li DD, Wang LL, Deng R, Zhu XF. Decreased expression of autophagy-related proteins in malignant epithelial ovarian cancer. *Autophagy*. 2008;4:1067–8.
- Shi CS, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal*. 2010; 3: ra42.
- Shi CS, Shenderov K, Huang NN, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A, Kehrl JH. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*. 2012;13(3):255-63.
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(5):339–346.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, ArakawaKobayashi S, Thompson CB, vd. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*. 2004;6:1221–8.
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004;306:990-5.
- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(4): 212–236.
- Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol*. 2009;186:773–782.
- Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, vd. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018;8:822–35.
- Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ. "IARC group 2B Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol*. 2000; 38(9):825–848.
- Son JH, Shim JH, Kim K-H, Ha J-Y, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*. 2012;44:89–98.

Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways?. *J Signal Transduct.* 2011;2011:792639.

Song X, Shan Z vd. JTC801 Induces pH-dependent Death Specifically in Cancer Cells and Slows Growth of Tumors in Mice. *Gastroenterology.* 2018; 154(5): 1480–1493.

Steenland K, Burnett C, Lalach N, Ward E, Hurrell J. Dying for work: The magnitude of US mortality from selected causes of death associated with occupation. *Am J Ind Med.* 2003; 43(5):461–482.

Steenland K, Loomis D, Shy C, Simonsen N. Review of occupational lung carcinogens. *Am J Ind Med.* 1996; 29(5):474–490.

Su J, Liu F, Xia M, Xu Y, Li X, Kang J, Li Y, Sun L. p62 participates in the inhibition of NF- κ B signaling and apoptosis induced by sulfasalazine in human glioma U251 cells. *Oncol. Rep.* 2015;34(1):235-43.

Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers—a different disease. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(10):778–790.

Sun SC. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 2011; 21, 71–85.

Syrjänen KJ. Bronchial squamous cell carcinomas associated with epithelial changes identical to condylomatous lesions of the uterine cervix. *Lung.* 1980; 158(3):131–142.

Taioli E, Wynder EL. Re: Endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86(11):869–870.

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, vd. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10,676–687.

Terabe T, Uchida F, Nagai H, Omori S, Ishibashi-Kanno N, Hasegawa S, vd. Expression of autophagy-related markers at the surgical margin of oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and tumor recurrence. *Hum Pathol.* 2018;73:156-163.

Thomas L, Doyle LA, Edelman MJ. Lung cancer in women: emerging differences in epidemiology, biology, and therapy. *Chest.* 2005; 128(1):370–381.

Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, vd. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature.* 2008;452:638-42.

To SQ, Knowler KC, Clyne CD. NF κ B and MAPK signalling pathways mediate TNF α -induced Early Growth Response gene transcription leading to aromatase expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013;433(1), 96–101.

Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature.* 1994; 371, 796–799.

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015; 10(9) 1243-1260.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(5):685–705.

Trocoli A, Djavaheri-Mergny M. The complex interplay between autophagy and NF- κ B signaling pathways in cancer cells. *Am J Cancer Res*. 2011;1(5):629-649.

Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 693-733.

Vera-Ramirez L, Vodnala SK, Nini R, Hunter KW, Green JE. Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nat. Commun*. 2018;9(1):1944.

Vogl DT, Stadtmauer EA, Tan KS, Heitjan DF, Davis LE, Pontiggia L, Rangwala R, Piao S, Chang YC, Scott EC, Paul TM, Nichols CW, Porter DL, Kaplan J, Mallon G, Bradner JE, Amaravadi RK. Combined autophagy and proteasome inhibition: a phase 1 trial of hydroxychloroquine and bortezomib in patients with relapsed/refractory myeloma. *Autophagy*. 2014;10(8):1380-90.

Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, Clarke CA, Holmberg L, Yong LC, Kolonel LN, Gould MK, West DW. Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol*. 2007; 25(5):472–478.

Wang Y, Broderick P, Webb E, Wu X, Vijayakrishnan J, Matakidou A, Qureshi M, Dong Q, Gu X, Chen WV, Spitz MR, Eisen T. Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat. Genet*. 2008; 40, 1407–1409.

Want A, Gillespie SR, Wang Z, Gordon R, Iomini C, Ritch R, Wolosin JM, Bernstein AM. Autophagy and Mitochondrial Dysfunction in Tenon Fibroblasts from Exfoliation Glaucoma Patients. *PLoS One*. 2016;11(7):e0157404.

WEB_1. Amerikan Kanser Topluluğu internet sitesi. <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer.html>, (son güncelleme tarihi: Ekim 2019, alındığı tarih: 05.12.2019).

WEB_2. Dünya Sağlık Örgütü internet sitesi <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, (son güncelleme tarihi:12.09.2018, alındığı tarih:12.01.2019).

WEB_3. Türkiye İstatistik Kurumu internet sitesi. Ölüm Nedeni İstatistikleri. http://tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1083 (son güncelleme tarihi: 26.04.2019, alındığı tarih:13.01.2019).

WEB_4. Dünya Kanseri Araştırma Fonu internet sitesi. <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/lung-cancer-statistics> (son güncelleme tarihi: 2018 , alındığı tarih:13.01.2019).

WEB_5. 'Greek Doctor' web sitesi. <https://greek.doctor/pathology-2/theoretical-exam-topics/82-lung-tumors/> (son güncelleme tarihi: 29.01.2019, alındığı tarih: 07.02.2020).

WEB_6. 'Clinical Trials web sitesi' <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home> (son güncelleme tarihi: 08.05.2019, alındığı tarih: 29.03.2020).

WEB_7. "JASPAR veritabanı web sitesi". <http://jaspar.genereg.net/matrix/MA0107.1/> (son güncelleme tarihi: 2020, alındığı tarih: 04.05.2020).

WEB_8. 'Harmonizome veritabanı web sitesi'. http://amp.pharm.mssm.edu/Harmonizome/gene_set/EGR3/TRANSFAC+Curated+Transcription+Factor+Targets (son güncelleme tarihi: 2020, alındığı tarih: 04.05.2020).

WEB_9. 'NCBI web sitesi'. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (son güncelleme tarihi: 13.03.2020, alındığı tarih: 09.05.2020).

WEB_10. 'Gene Ontology veritabanı web sitesi'. <http://amigo.geneontology.org/amigo> (son güncellenme tarihi: 05.03.2020 alındığı tarih: 11.05.2020).

WEB_11. STRING veritabanı web sitesi. https://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=uq5B33JHlqly&input_page_show_search=on (son güncellenme tarihi: 19.01.2019 alındığı tarih:28.05.2020).

WEB_12. Eukaryotic Promoter Database internet sitesi. <https://epd.epfl.ch//index.php> (son güncellenme tarihi: Ekim 2019 alındığı tarih: 02.05.2020).

WEB_13. NFκB Hedef Genleri, Boston Üniversitesi internet sitesi. <https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/> (son güncellenme tarihi: 12.06.2020 alındığı tarih: 24.06.2020).

Wei H, Wei S, Gan B, Peng X, Zou W, Guan J-L. Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* 2011;25:1510–27.

Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975– 2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(17):1276–1299.

Wertz IE, Dixit VM. Signaling to NFκappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2: a003350.

White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:401–10.

Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, vd. Body-mass index and cause-specific mortality in 900000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet.* 2009; 373(9669):1083– 1096.

Wieland GD, Nehmann N, Müller D, Eibel H, Siebenlist U, Sühnel J, Zipfel PF, Skerka C. Early growth response proteins EGR-4 and EGR-3 interact with immune inflammatory mediators NF-kappaB p50 and p65. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 14):3203-12.

- Willett WC, Trichopoulos D. Nutrition and cancer: a summary of the evidence. **Cancer Causes Control**. 1996; 7(1):178–180.
- Willey JC, Broussoud A, Sleemi A, Bennett WP, Cerutti P, Harris CC. Immortalization of normal human bronchial epithelial cells by human papillomaviruses 16 or 18. **Cancer Res**. 1991; 51(19):5370–5377.
- Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, Schild HJ, Birkenbach M, Blumberg RS, Neurath MF. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. **J Immunol**. 2005;174, 2814–2824.
- Woodson K, Tangrea JA, Barrett MJ, et al. Serum alpha-tocopherol and subsequent risk of lung cancer among male smokers. **J Natl Cancer Inst**. 1999; 91(20):1738–1743.
- Wu TT, Li WM, Yao YM. Interactions between Autophagy and Inhibitory Cytokines. **Int J Biol Sci**. 2016;12(7):884-97.
- Wynder EL, Graham EA. Etiologic factors in bronchiogenic carcinoma with special reference to industrial exposures; report of eight hundred fifty-seven proved cases. **A M A Arch Ind Hyg Occup Med**. 1951; 4(3):221–235.
- Wynder EL, Graham EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. **J Am Med Assoc**. 1950; 143(4):329–336.
- Wynder EL, Hoffmann D. Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities. **Cancer Res**. 1994; 54(20):5284–5295.
- Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-κB, an active player in human cancers. **Cancer Immunol Res**. 2014; 2(9): 823–830.
- Xiao G. Autophagy and NF-kappaB: fight for fate. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2007; 18: 233-243.
- Xie C, Ginet V, Sun Y, Koike M, Zhou K, Li T, et al. Neuroprotection by selective neuronal deletion of Atg7 in neonatal brain injury. **Autophagy**. 2016;12:410–23.
- Yan P, Qing G, Qu Z, Wu CC, Rabson A, Xiao G. Targeting autophagic regulation of NFκB in HTLV-I transformed cells by geldanamycin: implications for therapeutic interventions. **Autophagy**. 2007; 3: 600-603.
- Yang S, Qiang L, Sample A, Shah P, He Y. NF-κB activation induced by chloroquine requires autophagosome, p62, and JNK signaling and promotes tumor cell resistance. **J Biol Chem**. 2017;292(8):3379-3388.
- Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. **Genes Dev**. 2011;25:717–29.
- Yang Y, Wu J, Wang J. A database and functional annotation of NF-κB target genes. **Int J Clin Exp Med**. 2016;9(5):7986-7995.

- Yang Z, Klionsky D. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol.* 2010;12:814-822.
- Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2011;10:1533–41.
- Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 2009; 5:1180-1185.
- Yokota J, Shiraishi K, Kohno T. Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions. *Adv Cancer Res.* 2010;109:51-72.
- Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy.* 2018;14(2): 207-215.
- Yu L, Wan F, Dutta S, vd. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:4952–4957.
- Yu M, Li H, Liu Q, Liu F, Tang L, Li C, Yuan Y, Zhan Y, Xu W, Li W, Chen H, Ge C, Wang J, Yang X. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cell Signal.* 2011; 23: 883-892.
- Yu YH, Liao CC, Hsu WH, Chen HJ, Liao WC, Muo CH, Sung FC, Chen CY. Increased lung cancer risk among patients with pulmonary tuberculosis: a population cohort study. *J Thorac Oncol.* 2011; 6(1):32–37.
- Kabeja Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19:5720-5728.
- Zamay TN, Zamay GS, Kolovskaya OS, Zukov RS, Petrova MM, Gargaun A, Berezovski MV, Kichkailo AS. Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2017; 9(11): 155.
- Zell JA, Ou SH, Ziogas A, Anton-Culver H. Epidemiology of bronchioloalveolar carcinoma: improvement in survival after release of the 1999 WHO classification of lung tumors. *J Clin Oncol.* 2005; 23(33): 8396–8405.
- Zhang X, Zheng Q, Wang C, et al. CCDC106 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation. *Oncotarget.* 2017;8(16):26662–26670.
- Zheng C, Yin Q, Wu H. Structural studies of NF-κB signaling. *Cell Res.* 2011, 21, 183–195.

8. ÖZGEÇMİŞ

Özge ALVUR 1987 yılında Denizli'de doğdu. İlkokul ve ortaokul eğitimini Denizli Fatih İlköğretim Okulu'nda, lise eğitimini Denizli TEV Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini 2006-2010 yılları arasında Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü'nde aldı ve bu bölümden mezun oldu. 2011-2013 yılları arasında yüksek lisans eğitimini Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda tamamladı. 2015 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. Doktora eğitimini almak üzere aynı yıl Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD'de görevlendirilerek doktora lisansüstü eğitimine başladı.

RESEARCH ARTICLE

NF- κ B-Induced Upregulation of miR-548as-3p Increases Invasion of NSCLC by Targeting PTEN

Sakir Akgun^{a,d}, Hakan Kucuksayan^a, Osman N. Ozes^e, Ozge Can^a, Arsenal S. Alikanoglu^f, Mustafa Yildiz^g and Hakan Akca^{b,c,*}

^aDepartment of Medical Biology, ^bDepartment of Medical Genetics, Faculty of Medicine, ^cILTAM Cancer Biology Laboratory, Pamukkale University, Kinikli, Denizli, Turkey; ^dMedical Biology Department, Faculty of Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey; ^eDepartment of Medical Biology and Genetics, Akdeniz University, Antalya, Turkey; ^fPathology Department, ^gMedical Oncology, Antalya Training and Research Hospital, Antalya, Turkey

Abstract: Background: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) is an aggressive cancer type due to high metastatic capacity. Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) is a consistently active transcription factor in malignant lung cancer cells and has crucial significance in NSCLC progression. It is also implicated in the transcriptional regulation of many genes including microRNAs (miRNAs) that function as tumor suppressor or oncogene. It has been increasingly reported that several miRNAs defined as gene members are induced by NF- κ B. The present study aimed to find novel miRNAs that are regulated by NF- κ B.

Methods: Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq) experiment and bioinformatic analysis were used to determine NF- κ B-dependent miRNAs. Western blot analysis, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), luciferase reporter gene assays were carried out to investigate the target genes of miRNAs. To determine biologic activity, transwell invasion and MTT assay were carried out on H1299 NSCLC cell line. miRNA expression level was evaluated in metastatic and non-metastatic tissue samples of NSCLC patients.

Results: ChIP-Seq and qRT-PCR experiments showed that miR-548as-3p is transcriptionally regulated by NF- κ B in response to Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) treatment. Then, we found that tumor suppressor Phosphatase and Tension homolog (PTEN) is a direct target of miR-548as-3p. Furthermore, miR-548as-3p mediates phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/Akt pathway and NF- κ B-implicated genes including Matrix Metalloproteinases 9 (MMP9), Slug and Zeb1. We further showed that miR-548as-3p increased invasiveness of NSCLC cells and was upregulated in metastatic tumor tissues compared to non-metastatic ones.

Conclusion: All these findings provide a miRNAs-mediated novel mechanism for NF- κ B signaling and that miR-548as-3p could be a biomarker for NSCLC metastasis.

ARTICLE HISTORY

Received: November 11, 2018
Revised: January 24, 2019
Accepted: January 26, 2019

DOI:
10.2174/1871520619066190206165215

Keywords: NF-kappa B, neoplasm metastasis, invasion, miR-548as-3p, carcinoma, non-small-cell lung, PTEN.

1. INTRODUCTION

Lung cancer is the main cause of cancer-related deaths worldwide and more than a million new cases are added every year [1]. Incidence and prevalence of lung cancers are increasing at an alarming rate, particularly in the western world. Nearly 90% of lung cancers are NSCLC, including Squamous Cell Carcinoma (SCC), Large Cell Carcinoma (LCC), adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. In spite of advanced diagnostic and therapeutic improvements, 5-year survival rate increased only by 15% in the past 40 years [2]. Therefore, understanding the molecular mechanisms underlying carcinogenesis and progression of lung cancer is very important to fight against this cancer type.

As a multifunctional transcription factor, NF- κ B induces cell survival, invasion, metastasis, angiogenesis, differentiation and prevents apoptosis in a variety of cancer cells, including lung cancer [3-6]. NF- κ B is constitutively active in many types of cancer, especially in NSCLC [7, 8]. NF- κ B is normally sequestered in the

cytoplasm of uninduced cells by binding to Inhibitor kappa B (I κ B) family proteins. NF- κ B can be activated by a series of stimuli including epidermal growth factor (EGF), insulin, K-Ras, (TNF- α), and interleukin-1 β (IL-1 β) in human cancers [4]. While TNF- α and IL-1 β induces NF- κ B activation *via* canonical pathway, the others use non-canonical pathway to activate NF- κ B. At the end, regardless of whether the activated pathway is canonical or not, all these stimuli induce activation of I κ B kinases, consisting of IKK- α , IKK- β , IKK- γ . When activated, IKKs phosphorylate I κ Bs and induce their degradation by proteasome. Subsequently, NF- κ B subunits releasing from I κ Bs translocate to nucleus and induce the transcription of target genes by binding to NF- κ B-binding sites on the promoters of responsive genes [6, 9].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules containing approximately 22 nucleotides that negatively regulate the translations of messenger RNAs (mRNA) by binding to their 3' untranslated regions (UTR). miRNAs play important regulatory roles in many biological processes including invasion, proliferation, apoptosis and differentiation of cells [10]. Recent studies have shown that miRNAs are frequently dysregulated in most human cancer types including lung cancer [11, 12]. Transcriptions of miRNA genes are controlled by various transcription factors such

*Address correspondence to this author at the Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli 20160, Turkey; Tel: +90 258 296 4804, +90 538 863 8078; E-mail: hakca@pau.edu.tr



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Research paper

The triazole linked galactose substituted dicyano compound can induce autophagy in NSCLC cell lines

Ozge Alvir^{a,b}, Onur Tokgun^c, Yasemin Baygu^d, Nilgun Kabay^e, Yasar Gok^f, Hakan Akca^{a,*}

^a Department of Medical Biology, Pamukkale University, Denizli, Turkey

^b Department of Medical Biology, Van Yuzuncu Yil University, Van, Turkey

^c Department of Medical Genetics, Pamukkale University, Denizli, Turkey

^d Department of Chemistry, Pamukkale University, Denizli, Turkey

^e Department of Biomedical Engineering, Pamukkale University, Denizli, Turkey

^f Department of Chemical Engineering, Usak University, Usak, Turkey



ARTICLE INFO

Keywords:
Autophagy
Apoptosis
NSCLC
LC3B
Ambra1
Electron microscopy

ABSTRACT

As seen in other types of cancer, development of drug resistance in NSCLC treatment causes adverse effects on disease fighting process. Recent studies have shown that one of the drug resistance development mechanisms is that cancer cells may acquire the ability to escape from cell death. Therefore, development of anticancer drugs which have the strategy to redirect cancer cells to any cell death pathways may provide positive results for cancer treatments. Autophagy may be a target mechanism of alternative cancer treatment strategy in cases of blocked apoptosis. There is also a complex molecular link between autophagy and apoptosis, has not been fully understood yet. The dicyano compound which we used in our study caused cell death in NSCLC cell lines. When we analyzed the cells which were treated with dicyano compound by transmission electron microscope, we observed autophagosome structures. Upon this result, we investigated expression levels of autophagic proteins in the dicyano compound-treated cells by immunoblotting and observed that expression levels of autophagic proteins were increased significantly. The TUNEL assay and qRT-PCR for pro-apoptotic and anti-apoptotic gene expression, which we performed to assess apoptosis in the dicyano compound-treated cells, showed that the cell death does not occur through apoptotic pathway. We showed that the dicyano compound, which was developed in our laboratories, may play a role in molecular link between apoptosis and autophagy and may shed light on development of new anticancer treatment strategies.

1. Introduction

On the worldwide, lung cancer is the first type of cancer that is responsible for cancer-causing deaths and is divided into three major groups based on the microscopic appearance of the tumor: Small Cell Lung Cancer (SCLC), Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and Lung carcinoid tumors. The growth rates, metastatic capacity and treatment strategies of these three types of cancer are different (Alberg et al., 2005; American Cancer Society, n.d.; Tsiara et al., 2018; Worldwide cancer statistics, n.d.; Plummer et al., 2016; World Cancer Research Fund International, n.d.). According to the data of the American Cancer Society in 2017, 80–85% of lung cancers are in the NSCLC subspecies.

The most common types of NSCLC are squamous cell carcinoma, large cell carcinoma and adenocarcinoma (Key statistics for lung cancer, n.d.).

Autophagy is a mechanism that directs intracellular macromolecules and organelles to the lysosomes by taking into the vesicle and leads to degradation by fusion with lysosome (Pivtoraiko et al., 2009; Papadopoulos and Meyer, 2017; Pryor and Luzio, 2009). In previous studies, it was shown that autophagy helps cells to adapt to stress environment by providing recycling of intracellular molecules in absence of nutrients. Thus it is an effective way of maintaining cell homeostasis (Gozuacik et al., 2017; Shintani and Klionsky, 2004; Ohsumi, 2014; Parzych and Klionsky, 2014; Chen et al., 2014; Liuzzi et al., 2014).

Abbreviations: SCLC, Small Cell Lung Cancer; NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer; LC3B, light chain 3 B; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; AMBRA, Autophagy and Beclin 1 Regulator 1; BSA, Bovine Serum Albumin; TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; dUTP, Deoxyuridine Triphosphate; MTT, Methylthiazolylidiphenyl-tetrazolium bromide; PAS, pre-autophagosomal structure; UVVAG, UV radiation resistance-associated gene; Bax, Bcl-2 Associated X Protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2

* Corresponding author at: Department of Medical Genetics, Pamukkale University, Denizli, Turkey.

E-mail address: hakca@pau.edu.tr (H. Akca).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.06.025>

Received 31 October 2018; Received in revised form 11 March 2019; Accepted 13 June 2019

Available online 24 June 2019

0378-1119/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.