

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**UZUN KODLAMAYAN RNA HIF1A-AS2'NİN KÜÇÜK HÜCRELİ  
AKCİĞER KANSERİNDE OTOFAJİ İLE İLİŞKİLİ KEMOTERAPÖTİK  
DİRENÇTEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ebru GÜÇLÜ**

Danışman

Prof. Dr. Hasibe VURAL

**Konya-2020**

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**UZUN KODLAMAYAN RNA HIF1A-AS2'NİN KÜÇÜK HÜCRELİ  
AKCİĞER KANSERİNDE OTOFAJİ İLE İLİŞKİLİ KEMOTERAPÖTİK  
DİRENÇTEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ebru GÜÇLÜ**

Danışman

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 181418001 proje numarası ile desteklenmiştir.

**Konya-2020**

## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Ebru GÜÇLÜ**'nün **“Uzun kodlamayan RNA HIF1A-AS2'nin küçük hücreli akciğer kanserinde otofaji ile ilişkili kemoterapötik dirençteki etkinliğinin araştırılması”** başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA/ 10.08.2020

Tez Danışmanı Prof. Dr. Hasibe VURAL  
Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

Üye Prof. Dr. Ercan KURAR  
Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

Üye Prof. Dr. Tülin ÇORA  
Selçuk Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D.

Üye Dr. Öğr. Üyesi Nesrin TURAÇLAR  
Selçuk Üniversitesi  
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu  
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

Üye Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KILINÇ  
Necmettin Erbakan Üniversitesi  
Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../20 tarih ve ...../.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK  
Enstitü Müdürü

## BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

10.08.2020

Ebru GÜÇLÜ



## BENZERLİK RAPORU

**Tezin Tam Adı** : Uzun kodlamayan RNA HIF1A-AS2'nin küçük hücreli akciğer kanserinde otofaji ile ilişkili kemoterapötik dirençteki etkinliğinin araştırılması

**Öğrencinin Adı Soyadı** : Ebru GÜÇLÜ

**Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı** : 73 sayfa

The screenshot shows the Turnitin interface. The browser address bar displays the URL: turnitin.com/t\_inbox.asp?r=41,1716760630471&svr=598&lang=tr&skid=94123697. The page header includes the Turnitin logo and navigation links: Hasiibe Vural | Kullanıcı Bilgisi | Mesajlar(2 yeni) | Öğretmen | Türkçe | Topluluk | Yardım | Çıkış. Below the header, there are tabs for Ödevler, Öğrenciler, Not Defteri, Kütüphaneler, Takvim, Tartışma, and Tercihler. The main content area shows the document title: GÖRÜNTÜLENİYOR: ANASAYFA > TIBBİ BİYOLOJİ > UZUN KODLAMAYAN RNA HIF1A-AS2'NİN KÜÇÜK HÜCRELİ AKCIĞER KANSERİNDE OTOFAJI İLE İLİŞKİLİ KEMOTERAPÖTİK DİRENÇTEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI. Below this, there is a section titled 'Bu sayfa hakkında' with a brief description. The document title is repeated: 'Uzun kodlamayan RNA HIF1A-AS2'nin küçük hücreli ak...'. Below the title, there is a 'GELEN KUTUSU | GÖRÜNTÜLENİYOR: YENİ ÖDEVLER' section. A table shows the document's similarity score and other details:

| YAZAR      | BAŞLIK  | BENZERLİK | PUNLA | CEVAP | DOSYA  | ÖDEV NUMARASI | TARİH       |
|------------|---|-----------|-------|-------|--------|---------------|-------------|
| Ebru Güçlü | Uzun kodlamayan RNA HIF1A-AS2'nin küçük hücreli ak... | %5        | --    | --    | [Icon] | 1356542635    | 13-Tem-2020 |

**Danışman Öğretim Üyesi Adı Soyadı:** Prof. Dr. Hasibe VURAL

**İmza**

:

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteğini benden esirgemeyen, tecrübesi ve bilgisi ile bana yol gösteren, her zaman yanımda olduğunu bildiğim sayın danışman hocam Prof. Dr. Hasibe VURAL'a,

Bilgi ve tecrübeleri ile akademik hayatıma katkı sağlayan değerli Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Ercan KURAR ve Doç. Dr. Hatice Gül DURSUN'a,

Desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Aycan AÇIK, Arş. Gör. Dr. Canan EROĞLU GÜNEŐ, Arş. Gör. Dr. İlknur ÇINAR AYAN ve Öğr. Gör. Dr. Mehmet Ali KARASELEK'e,

Doktora eğitimim süresince 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a,

Tez çalıőmama 181418001 proje numarası ile maddi destek sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Hayatımın her anında ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim, beni her konuda destekleyen canım aileme ve sevgili eőime,

Teşekkür ederim...

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| İç Kapak.....  | i    |
| Tez Onay Sayfası .....                                   | ii   |
| Beyanat.....   | iii  |
| Benzerlik Raporu .....                                   | iv   |
| Teşekkür.....  | v    |
| Kısaltmalar ve Simgeler Listesi .....                    | ix   |
| Şekiller Listesi.....                                    | x    |
| Tablolar Listesi.....                                    | xi   |
| <b>ÖZET</b> .....  | xii  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                    | xiii |
| <b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....                            | 1    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....                           | 3    |
| 2.1. Akciğer Kanseri .....                               | 3    |
| 2.1.1. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması .....        | 5    |
| 2.1.2. Akciğer Kanserinin Risk Faktörleri .....          | 7    |
| 2.1.3. Akciğer Kanserinin Tedavisi.....                  | 10   |
| 2.2. Kanserde İlaç Direnci Mekanizmaları .....           | 13   |
| 2.2.1. Tümör heterojenitesi .....                        | 14   |
| 2.2.2. İlaç inaktivasyonu .....                          | 14   |
| 2.2.3. İlacın hücre dışına atılması .....                | 17   |
| 2.2.4. İlaç alımının azalması .....                      | 18   |
| 2.2.5. İlaç hedefinde değişiklik .....                   | 19   |
| 2.2.6. DNA onarımında artış .....                        | 20   |
| 2.2.7. Hücre ölümünün inhibisyonu.....                   | 21   |
| 2.2.8. EMT .....   | 21   |
| 2.3. Kodlamayan RNA'lar .....                            | 22   |
| 2.3.1. lncRNA'ların Moleküler Yapısı ve Özellikleri..... | 22   |
| 2.4. lncRNA HIF1A-AS2.....                               | 24   |
| 2.5. Otofaji .....                                       | 25   |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....                          | 29   |
| 3.1. Hücre Kültürü.....                                  | 30   |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2. siRNA ile Transfeksiyon Yöntemi.....   | 31        |
| 3.3. Hipoksik Ortamın Oluşturulması .....   | 31        |
| 3.4. İlaç Uygulamaları ve Sitotoksite Analizleri.....   | 32        |
| 3.5. Akım Sitometri ile Apoptoz Tayini.....   | 33        |
| 3.6. Otofaji Analizi.....   | 33        |
| 3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi .....   | 34        |
| 3.7.1. Hücrelerden Total RNA İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi .....   | 34        |
| 3.7.2. RNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi .....   | 35        |
| 3.7.3. cDNA Sentezi.....  | 36        |
| 3.7.4. Primer Tasarımı ve qPZR.....   | 36        |
| 3.8. Western Blot Analizi.....  | 40        |
| 3.8.1. Protein İzolasyonu.....  | 40        |
| 3.8.2. Protein Miktarının Belirlenmesi.....   | 41        |
| 3.8.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması .....   | 41        |
| 3.8.4. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....  | 42        |
| 3.8.5. Proteinlerin Membrana Transferi ve Bloklama.....   | 42        |
| 3.8.6. Primer-Sekonder Antikor İşaretleme ve Görüntüleme .....  | 43        |
| 3.9. İstatistiksel analiz .....   | 43        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>  | <b>44</b> |
| 4.1. H69 ve H69AR Hücrelerinin Karşılaştırılması .....  | 44        |
| 4.2. Hipoksik Ortamın Doğrulanması .....  | 45        |
| 4.3. siRNA Etkinliklerinin qPZR Analizi ile Belirlenmesi.....   | 47        |
| 4.4. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....  | 49        |
| 4.5. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Normoksik ve Hipoksik Ortamda İlaç Cevabı Üzerine Etkisi.....  | 50        |
| 4.6. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Normoksik ve Hipoksik Ortamda Otofaji Üzerine Etkisi.....  | 56        |
| 4.7. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Normoksik ve Hipoksik Ortamda İlaç Direnci ve Otofaji ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi ..... | 58        |
| 4.8. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Normoksik ve Hipoksik Ortamda MRP1, HIF-1 $\alpha$ ve Beclin-1 Proteinleri Üzerine Etkisi .....                        | 66        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>  | <b>68</b> |

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b> | <b>82</b>  |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>        | <b>84</b>  |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>          | <b>101</b> |
| <b>9. EKLER.....</b>             | <b>102</b> |

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>ABC</b>              | : ATP-bağlayıcı kaset                                       |
| <b>ATG</b>              | : Otofaji ilişkili gen                                      |
| <b>BCRP; ABCG2</b>      | : Meme kanseri direnç proteini                              |
| <b>BECN1</b>            | : Beclin1   |
| <b>CoCl<sub>2</sub></b> | : Kobalt II klorür  |
| <b>CYP</b>              | : Sitokrom P450   |
| <b>DHX9</b>             | : DExH-kutu helikaz 9                                       |
| <b>EGFR</b>             | : Epidermal büyüme faktörü reseptörü                        |
| <b>EMT</b>              | : Epitelyal-Mezenkimal Geçiş                                |
| <b>ENCODE</b>           | : DNA Elementleri Ansiklopedisi Projesi                     |
| <b>GST</b>              | : Glutasyon-S-transferaz                                    |
| <b>HIF1A</b>            | : Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa                      |
| <b>HIF1A-AS2</b>        | : HIF1A antisens RNA 2                                      |
| <b>HMGA1</b>            | : Yüksek mobilite grubu A1                                  |
| <b>HRE</b>              | : Hipoksiye cevap elementi                                  |
| <b>IGF2BP2</b>          | : İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 mRNA bağlayıcı protein 2 |
| <b>KHAK</b>             | : Küçük hücreli akciğer kanseri                             |
| <b>KHDAK</b>            | : Küçük hücreli-dışı akciğer kanseri                        |
| <b>lncRNA</b>           | : Uzun kodlamayan RNA                                       |
| <b>miRNA</b>            | : mikroRNA  |
| <b>MRP1; ABCC1</b>      | : Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1                 |
| <b>NAT</b>              | : Doğal antisens transkript                                 |
| <b>ncRNA</b>            | : Kodlamayan RNA  |
| <b>Pgp; ABCB1</b>       | : P-glikoproteini   |
| <b>qPZR</b>             | : Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu                |
| <b>RISC</b>             | : RNA-indükleyici susturma kompleksi                        |
| <b>RNAi</b>             | : RNA interferans   |
| <b>siRNA</b>            | : Küçük interferans RNA                                     |
| <b>UGT</b>              | : Üridin difosfat glukroniltransferaz                       |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

| <u>Sekil No</u>  | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Şekil 2.1. Türkiye’de erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün toplam kanser içindeki dağılımı (%), 2016 .....                | 4               |
| Şekil 2.2. Kanserde ilaç direnci mekanizmaları. ....   | 13              |
| Şekil 2.3. Otofaji türleri. ....   | 26              |
| Şekil 2.4. Otofaji mekanizması. ....   | 27              |
| Şekil 2.5. Kanser-otofaji-hipoksi ilişkisi. ....   | 28              |
| Şekil 3.1. H69 ve H69AR hücre hatlarının mikroskop görüntüleri .....   | 30              |
| Şekil 3.2. RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....  | 35              |
| Şekil 3.3. Örnek erime eğrisi grafiği.....   | 40              |
| Şekil 3.4. BSA standart eğrisi. ....   | 41              |
| Şekil 4.1. Doksorubisin uygulamasının H69 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. ...   | 44              |
| Şekil 4.2. Doksorubisin uygulamasının H69AR hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.....   | 44              |
| Şekil 4.3. H69 ve H69AR hücrelerinde ABCC1 ve HIF1A-AS2 mRNA seviyeleri. ....  | 45              |
| Şekil 4.4. 24 saat süresince 50, 100, 150 ve 200 µM CoCl <sub>2</sub> uygulamasının H69 ve H69AR hücre canlılıkları üzerine etkisi.....        | 46              |
| Şekil 4.5. 24 saat süresince 100 µM CoCl <sub>2</sub> uygulamasının H69 hücrelerinde HIF1A ve HIF1A-AS2 mRNA seviyeleri üzerine etkisi.....    | 46              |
| Şekil 4.6. 24 saat süresince 100 µM CoCl <sub>2</sub> uygulamasının H69AR hücrelerinde HIF1A ve HIF1A-AS2 mRNA seviyeleri üzerine etkisi ..... | 47              |
| Şekil 4.7. H69 hücrelerinde siRNA uygulamalarının HIF1A-AS2 seviyesi üzerine etkisi .....  | 48              |
| Şekil 4.8. H69AR hücrelerinde siRNA uygulamalarının HIF1A-AS2 seviyesi üzerine etkisi. ....  | 48              |
| Şekil 4.9. HIF1A-AS2’nin susturulmasının H69 hücre canlılığı üzerine etkisi. ....  | 49              |
| Şekil 4.10. HIF1A-AS2’nin susturulmasının H69AR hücre canlılığı üzerine etkisi. ....   | 50              |
| Şekil 4.11. Doksorubisinin H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hücre canlılığı üzerine etkisi .....                                | 51              |
| Şekil 4.12. H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında doksorubisinin 48 saat için IC <sub>50</sub> değerleri .....                       | 51              |
| Şekil 4.13. Doksorubisinin H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hücre canlılığı üzerine etkisi. ....                              | 52              |
| Şekil 4.14. H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında doksorubisinin 48 saat için IC <sub>50</sub> değerleri .....                     | 53              |
| Şekil 4.15. H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında 24 saat süresinde 10 µM doksorubisin uygulamasının apoptoz üzerine etkisi .....    | 54              |
| Şekil 4.16. H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında 24 saat süresinde 10 µM doksorubisin uygulamasının apoptoz üzerine etkisi.....   | 55              |
| Şekil 4.17. H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında doksorubisin yokluğunda ve varlığında otofaji miktarları.....                      | 56              |
| Şekil 4.18. H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında doksorubisin yokluğunda ve varlığında otofaji miktarları.....                    | 57              |
| Şekil 4.19. H69 ve H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında MRP1, HIF1-α ve Beclin-1 protein seviyeleri .....                         | 67              |
| Şekil 6.1. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların şematize hali.....   | 83              |

## TABLolar LİSTESİ

| <u>Tablo No</u>   | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| <b>Tablo 2.1.</b> Türkiye’de yıllara göre erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün insidansı, (100.000’de, Dünya Standart Nüfusu)..... | 4               |
| <b>Tablo 2.2.</b> Akciğer kanserinin histolojik tiplerinin yüzde dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015).....                       | 5               |
| <b>Tablo 3.1.</b> Ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş ilaç direnci ile ilişkili genler.....  | 36              |
| <b>Tablo 3.2.</b> Ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş otofaji ile ilişkili genler.....   | 37              |
| <b>Tablo 3.3.</b> Primer dizileri ve ampikon uzunlukları.....   | 38              |
| <b>Tablo 4.1.</b> H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler.....                           | 58              |
| <b>Tablo 4.2.</b> H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler.....                         | 61              |
| <b>Tablo 4.3.</b> HIF1A-AS2’nin susturulmasının hipoksik ortamda hedef gen ekspresyonları üzerine etkisi.....                             | 62              |
| <b>Tablo 4.4.</b> HIF1A-AS2’nin susturulduğu normoksik ortama göre hipoksik ortamda hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler.....         | 64              |

## ÖZET

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Uzun kodlamayan RNA HIF1A-AS2'nin küçük hücreli akciğer kanserinde otofaji ile ilişkili kemoterapötik dirençteki etkinliğinin araştırılması

Ebru GÜÇLÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi / Konya-2020

Küçük hücreli-dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere histolojik olarak iki sınıfa ayrılan akciğer kanseri, tüm dünyada kansere bağlı ölümlerin en yaygın sebeplerinden biridir. KHAK; kemoterapötik ajanlara karşı direncin gözlemlendiği en agresif akciğer kanseri türüdür. İlaç direnci, temel mekanizmaların yanı sıra kodlamayan RNA profili, hipoksi ve otofaji gibi faktörlerle de ilişkilendirilen bir süreçtir. Bu tez çalışmasında hipoksi ile indüklendiği bilinen bir lncRNA olan HIF1A-AS2'nin KHAK hücrelerinde otofaji üzerinden kemoterapötik dirençteki olası etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Doksorubisine duyarlı H69 ve doksorubisine dirençli H69AR KHAK hücrelerinde HIF1A-AS2 ifadesi siRNA yöntemi ile susturulmuştur. Ardından, normoksik ve CoCl<sub>2</sub> ile indüklenen hipoksik ortamdaki hücrelerde doksorubisin duyarlılığını belirlemeye yönelik sitotoksikite ve apoptoz analizleri gerçekleştirilmiştir. HIF1A-AS2'nin susturulmasının doksorubisin varlığında ve yokluğunda otofaji üzerine etkisi otofaji analizi ile değerlendirilmiştir. HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamda ilaç direnci ve otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi qPZR analizi ile belirlenmiş; MRP1, HIF-1 $\alpha$  ve Beclin-1 proteinlerinin seviyeleri western blot yöntemi ile analiz edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; kontrol grupları ile karşılaştırıldığında H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması, normoksik ve hipoksik ortamda doksorubisinin IC<sub>50</sub> değerlerini azaltmış, doksorubisine bağlı apoptozu artırmıştır. Ayrıca, doksorubisin varlığında ve yokluğunda HIF1A-AS2'nin susturulması normoksik ve hipoksik ortamda otofajinin azalması ile sonuçlanmıştır. qPZR analizi sonuçlarına göre; HIF1A-AS2'nin susturulması, normoksik ve hipoksik ortamda her iki hücre hattında da ilaç duyarlılığını artıracak ve otofajiyi inhibe edecek şekilde çok sayıda genin ekspresyonunu etkilemiştir. Western blot analizi sonuçlarına göre, HIF1A-AS2'nin susturulması ile normoksik ve hipoksik ortamda her iki hücre hattında da HIF-1 $\alpha$  ve Beclin-1 proteinlerinin seviyeleri azalmıştır. H69AR hücrelerinde MRP1 protein seviyesinde de azalma tespit edilmiştir. Ayrıca, hipoksik ortam H69 hücrelerinin ilaç duyarlılığını azaltmıştır, HIF1A-AS2'nin susturulması ile hipoksinin bu etkisi baskılanmıştır. H69AR hücrelerinde ise hipoksinin ilaç direncini daha da artırıcı bir etkisi tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak, KHAK hücrelerinde HIF-1 $\alpha$ 'yı pozitif yönde düzenlediği ve hipoksi ile indüklendiği belirlenen HIF1A-AS2 lncRNA'nın susturulması, KHAK hücrelerinin ilaç duyarlılığını otofaji ile ilişkili olarak artırmıştır. Dolayısıyla, bu hücrelerde ilaç duyarlılığında hipoksi-HIF1A-AS2-otofaji etkileşiminin belirleyici olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** HIF1A-AS2, İlaç direnci, Otofaji.

## ABSTRACT

REPUBLIC OF TURKEY  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of the efficiency of long-noncoding RNA HIF1A-AS2 on drug resistance associated with autophagy in small cell lung cancer

Ebru GÜÇLÜ

Department of Medical Biology

PhD THESIS / Konya-2020

Lung cancer, which is histologically divided into two classes as non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC), is one of the most common causes of cancer-related deaths in worldwide. SCLC, where resistance against chemotherapeutic agents is observed, is the most aggressive type of lung cancer. Drug resistance is a process associated with factors such as non-coding RNA profile, hypoxia and autophagy as well as basic mechanisms. In this thesis, it is aimed to investigate the possible effect of HIF1A-AS2, a lncRNA known to be induced by hypoxia, on drug resistance associated with autophagy in SCLC cells.

The expression of HIF1A-AS2 was silenced by siRNA method in doxorubicin sensitive H69 and doxorubicin resistant H69AR cells. Then, cytotoxicity and apoptosis analyzes were carried out to determine the doxorubicin sensitivity of the cells in the normoxic and CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxic environment. The effect of silencing of HIF1A-AS2 on autophagy in the presence and absence of doxorubicin was evaluated by autophagy analysis. The effect of silencing of HIF1A-AS2 on the expression levels of genes, which are associated with drug resistance and autophagy, in the normoxic and hypoxic environment was determined by qPCR analysis, the levels of MRP1, HIF-1 $\alpha$  and Beclin-1 proteins were analysed by western blot method.

According to the results; when compared to control groups, the silencing of HIF1A-AS2 in H69 and H69AR cells decreased IC<sub>50</sub> values of doxorubicin and increased doxorubicin-related apoptosis in normoxic and hypoxic environment. In addition, the silencing of HIF1A-AS2 in the presence and absence of doxorubicin resulted in the reduction of autophagy in the normoxic and hypoxic environment. According to the results of qPCR analysis, the silencing of HIF1A-AS2 in normoxic and hypoxic environment has affected the expression of many genes that will increase drug sensitivity and inhibit autophagy in both cell lines. According to results of western blot analysis, the levels of HIF-1 $\alpha$  and Beclin-1 proteins decreased in both cell lines in the normoxic and hypoxic environment by silencing of HIF1A-AS2. And, a decrease was also detected in level of MRP1 protein in H69AR cells. In addition, the hypoxic environment reduced drug sensitivity of H69 cells, this effect of hypoxia was suppressed by silencing of HIF1A-AS2. In the H69AR cells, hypoxia did not increase the drug resistance.

As a result, the silencing of HIF1A-AS2, which was determined to positively regulate HIF-1 $\alpha$  and was induced by hypoxia in SCLC cells, increased drug sensitivity of cancer cells in relation to autophagy. Therefore, hypoxia-HIF1A-AS2-autophagy interaction is thought to be determinative in drug sensitivity of these cells.

**Keywords:** Autophagy, Drug resistance, HIF1A-AS2.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kansere bağılı ölümlerin en önemli nedenlerinden biri olan akciğer kanseri, histolojik olarak küçük hücreli-dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (Inamura 2017). Bunlardan, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %15-20'sini oluşturan KHAK, en yüksek maligniteye sahip olan akciğer kanseri türüdür (Rodriguez ve Lilenbaum 2010).

Kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli sorun, kanser hücrelerinin standart tedavide kullanılan kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştirmeleridir. Benzer şekilde, KHAK tedavisindeki başarısızlığın ana sebebi kanser hücrelerinde gözlenen ilaç direncidir (Chen ve ark. 2012). Kemoterapötik direnç; birbirine eşlik eden ve iyi tanımlanmış temel mekanizmaların devreye girdiği karmaşık bir süreçtir. Ancak, temel mekanizmaların dışında çok sayıda faktör doğrudan veya dolaylı olarak kemoterapötik dirençte rol oynayabilir (Cree ve Charlton 2017). Bu faktörlerin etki mekanizmalarının ortaya çıkartılması, kansere karşı yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Bu faktörlerden biri olan otofaji, hücre homeostazının korunmasında görev almaktadır (Li ve ark. 2017). Otofajinin, dirençli kanser hücrelerinde kemoterapötik tedavi sırasında koruyucu bir mekanizma olarak aktive edilmiş olabileceği, bu durumda, otofaji inhibisyonunun dirençli kanser hücrelerini tekrar duyarlı hale getirerek kemoterapötik ajanların etkinliğini artırabileceği belirtilmektedir (Sun ve ark. 2015). Kemoterapötik dirençteki rolü oldukça karmaşık olan bir diğer önemli faktör kodlamayan RNA (ncRNA) sınıfının bir üyesi olan uzun kodlamayan RNA (lncRNA)'lardır. lncRNA'ların hücrede önemli biyolojik süreçlerde rol oynadıkları, kanser de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar ile ilişkili olabilecekleri bilinmektedir. Ayrıca, lncRNA'ların çeşitli kanser hücrelerinde kemoterapötik ajanlara karşı gelişen dirençte aktif rol aldıkları belirtilmektedir (Liu ve ark. 2020).

Bu tez projesinin amacı, hipoksi ile indüklendiği bilinen bir lncRNA olan hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF1A) antisens RNA 2 (HIF1A-AS2)'nin KHAK hücrelerinde otofaji üzerinden kemoterapötik dirençteki etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu amaçla çalışmada, doksorubisine 50 kat daha dirençli olduğu bilinen H69AR hücre hattı ile aynı hattın dirençsiz formu olan H69 insan KHAK hücre hatları kullanılmıştır. Hücrelerde HIF1A-AS2 gen ifadesi siRNA transfeksiyon

yöntemi ile susturulmuş, ardından normoksik ve hipoksik ortamda bırakılan hücrelerde hücre canlılığı, apoptoz ve otofaji analizleri gerçekleştirilmiştir. HIF1A-AS2'nin otofajide ve kemoterapötik dirençte önemli olan genlerin ifadeleri üzerine etkisi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmiştir. Ayrıca HIF1A-AS2 ile etkileşim içinde olduğu bilinen çeşitli proteinleri kodlayan bazı genlerin (insülin benzeri büyüme faktörü 2 mRNA bağlayıcı protein 2 (IGF2BP2), DExH-kutu helikaz 9 (DHX9), yüksek mobilite grubu A1 (HMGA1)) ifadesi de aynı yöntemle analiz edilmiştir. İlaç direncinin en önemli belirteçlerinden biri olan çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1 (MRP1), HIF1A-AS2 ile ilişkilendirilen ve hipoksinin de göstergesi olan HIF-1 $\alpha$  ve otofajide rol oynayan Beclin-1 proteinlerinin seviyeleri ise western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Akciğer Kanseri

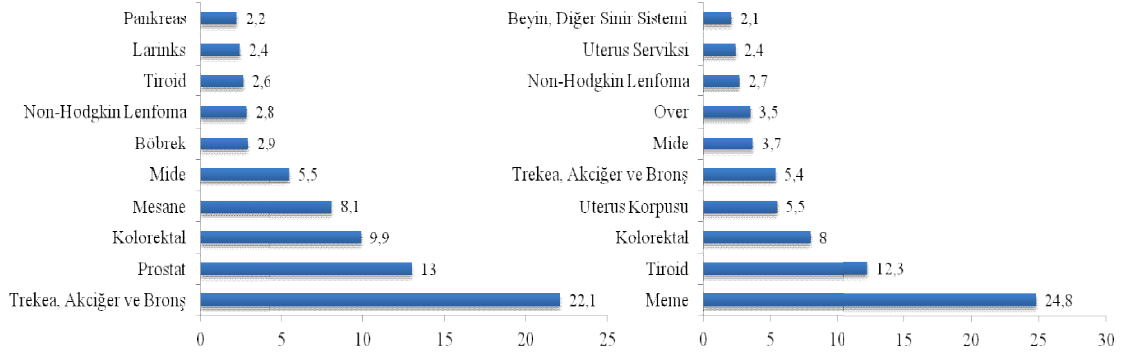
Akciğer kanseri, bir ve/veya iki akciğerdeki anormal hücrelerin kontrolsüz bölünmesine bağlı olarak malign büyümenin gerçekleştiği, ileri evrelerde kan ve lenf damarları yoluyla metastazın görüldüğü, nefes darlığı, ses kısıklığı, öksürük ve balgamda kan ile kendini gösteren küresel bir sağlık sorunudur (Bradley ve ark. 2019; Sarode ve ark. 2020). GLOBOCAN 2018 verilerine göre, akciğer kanseri dünya genelinde 2,1 milyon yeni vaka ile en yaygın görülen kanser türüdür, 1,8 milyon ölüm ile kansere bağlı ölümlerde birinci sırada yer almaktadır. Erkeklerde en yaygın görülen kanser türü iken kadınlarda meme kanserinden sonra gelmektedir (Bray ve ark. 2018).

Kötü prognoz ile karakterize bir hastalık olan akciğer kanserinin tanısı ileri evrelerde koyulmaktadır. Hastaneye başvuran hastaların %80'i cerrahi rezeksiyonun gerçekleştirilmediği evre III veya evre IV aşamasındadır. Bu durum düşük sağ kalım oranını da beraberinde getirmektedir (Birring ve Peake 2005). Histolojik tipe, tanı evresine bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte akciğer kanserinin 5 yıllık sağ kalım oranı %10-20'dir (Massó-Vallés ve ark. 2020).

Sigara kullanımı akciğer kanseri için bilinen en önemli risk faktörüdür, bu nedenle akciğer kanserinin epidemiyolojik eğilimleri değişiklik gösterebilmektedir. Özellikle, ABD ve Avrupa Birliği ülkelerinde akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi ile ilişkili verilere ulaşabilmek mümkündür (Ferlay ve ark. 2018; Siegel ve ark. 2020). Örneğin, Amerikan Kanser Derneği tarafından yayımlanan bir raporda 2017 yılı verilerine yer verilmiştir. Buna göre akciğer kanseri, 40 yaş ve üstü erkekler ile 60 yaş ve üstü kadınlarda 2017'de toplam 145849 ölüme yol açmıştır; bu sayı meme, prostat, kolorektal ve beyin kanserlerine bağlı ölümlerin sayısından daha fazladır. Ayrıca, 2017 yılında ABD'de akciğer kanserine bağlı ölümlerin erkeklerde kadınlara göre %17 daha fazla olduğu rapor edilmiştir, ancak mevcut sigara içme eğilimleri devam ederse 2045 yılına kadar bu farkın tersine döneceği belirtilmiştir. Aynı rapora göre, 2020 yılında ABD'de 1806590 yeni kanser vakası beklenmekte ve kansere bağlı ölümlerin sayısının 606520'ye ulaşacağı tahmin edilmektedir. Akciğer kanserinin de erkeklerde ve kadınlarda görülme sıklığı bakımından ikinci sırada yer

alacağı, kansere bağlı ölümlerin birinci nedeni olacağı belirtilmektedir (Siegel ve ark. 2020).

Ülkemizde ise, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı'na göre; 2016 yılında trakea, akciğer ve bronş kanserleri en sık görülen 10 kanser türü sıralamasında erkeklerde birinci, kadınlarda ise beşinci sırada yer almıştır (Şekil 2.1; Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2018).



**Şekil 2.1.** Türkiye'de erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün toplam kanser içindeki dağılımı (%), 2016 (Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2018).

Aynı yıllığa göre; erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün yıllara göre insidansları karşılaştırıldığında trakea, akciğer ve bronş kanserlerinin birinci sırada yer aldığı görülmektedir (Tablo 2.1; Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2018).

**Tablo 2.1.** Türkiye'de yıllara göre erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün insidansı, (100.000'de, Dünya Standart Nüfusu) (Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2018).

|                          | 2002 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Trakea, Akciğer ve Bronş | 42,2 | 61,0 | 62,3 | 60,4 | 59,3 | 52,5 | 52,5 | 57,7 |
| Prostat                  | 11,5 | 33,8 | 37,1 | 39,2 | 36,4 | 32,9 | 33,1 | 35,0 |
| Kolorektal               | 11,8 | 20,7 | 22,4 | 24,7 | 24,4 | 22,8 | 23,1 | 25,3 |
| Mesane                   | 12,4 | 20,7 | 20,9 | 22,3 | 21,1 | 19,3 | 20,2 | 21,1 |
| Mide                     | 11,6 | 16,1 | 17,1 | 16,4 | 15,9 | 14,3 | 14,2 | 14,2 |
| Böbrek                   | 3,0  | 5,5  | 6,9  | 7,0  | 7,0  | 6,4  | 6,8  | 7,4  |
| Non-Hodgkin Lenfoma      | 1,4  | 7,0  | 7,2  | 7,7  | 6,9  | 7,2  | 6,9  | 7,2  |
| Larinks                  | 6,9  | 7,7  | 8,1  | 7,8  | 7,0  | 6,2  | 6,6  | 6,2  |
| Tiroid                   | 0,5  | 4,7  | 5,1  | 5,4  | 5,6  | 5,5  | 6,0  | 6,2  |
| Pankreas                 | 3,1  | 5,7  | 5,6  | 5,8  | 6,3  | 5,1  | 5,6  | 5,7  |

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Türkiye Kanser İstatistikleri'ne göre de 2015 yılında erkeklerde trakea, bronş ve akciğer kanseri en sık görülen kanser türleridir. Aynı rapora göre; akciğer kanseri vakalarının %14,8'i lokalize, %27,1'i bölgeseldir, %58,1'inin ise uzak metastaz yaptığı belirtilmiştir. Vakaların %80,5'ini

KHDAK, %16,1'ini ise KHAK oluşturmaktadır (Tablo 2.2; Türkiye Kanser İstatistikleri, 2018).

**Tablo 2.2.** Akciğer kanserinin histolojik tiplerinin yüzde dağılımı (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2015) (Sağlık İstatistikleri Yıllığı, 2018).

|               | %           |
|---------------|-------------|
| <b>KHDAK</b>  | <b>80,5</b> |
| Yassı hücreli | 38,2        |
| Adenokarsinom | 47,1        |
| Büyük hücreli | 1,9         |
| NOS           | 12,7        |
| <b>KHAK</b>   | <b>16,1</b> |
| <b>Diğer*</b> | <b>3,4</b>  |

\* Mukoepidermoid; Kistik, Müsinöz, Seröz Neoplasmlar; Asiner Hücreli; Kompleks Epitelyal; Yumuşak Doku; Fibromatöz Neoplasmlar; Lipomatöz Neoplasmlar; Myomatöz Neoplasmlar; Karışık ve Stromal Neoplasmlar; Germ Hücreli; Kan Damarı Tümörleri; Nöroepitelyomatöz Neoplasmlar; Timik Epitelyal Neoplazmlar.

### 2.1.1. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması

Akciğer kanseri genel olarak KHDAK ve KHAK olmak üzere iki ana histolojik gruba ayrılmaktadır (Inamura 2017).

**KHDAK:** Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Daha yavaş çoğalması ve daha geç metastaz yapması nedeniyle KHAK'dan daha az agresiftir ve 5 yıllık sağ kalım oranı %19'dur. Ancak, insidansının yüksek olması nedeniyle kansere bağlı ölümlerde birinci sırada yer almaktadır. Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir (Zheng 2016; Massó-Vallés ve ark. 2020).

**Adenokarsinom:** KHDAK vakalarının %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır (Wei ve ark. 2019). Genç erkeklerde ve her yaştan kadınlarda, hiç sigara içmeyenlerde ya da sigarayı bırakmış kişilerde en sık görülen akciğer kanseri türüdür (Brambilla ve ark. 2001). Bu tümörün alveolar tip II hücreleri ile Clara hücrelerinden köken alabileceği düşünülmektedir (Rowbotham ve Kim 2014). 2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından akciğer tümörlerinin sınıflandırılmasına önemli yenilikler getirilmiş ve buna göre akciğer adenokarsinomu *in situ* adenokarsinom (AIS), minimal invaziv adenokarsinom (MIA), lepidik baskın adenokarsinom şeklinde alt gruplara ayrılmıştır (Travis ve ark. 2015). AIS; stromal, vasküler ya da plevral invazyon yapmaksızın önceden var olan alveolar yapılar boyunca büyüyen (lepidik büyüme) neoplastik pnömositlerden oluşan, küçük ( $\leq 3$  cm) adenokarsinomlardır (Travis ve

ark. 2013). MIA invazyon boyutu  $\leq 5$  mm olan,  $\leq 3$  cm çapındaki adenokarsinomlardır. Tümör çapının 3 cm'yi aşması durumunda ise bu adenokarsinoma "lepidik baskın adenokarsinom, şüpheli MIA" adı verilmektedir (Inamura 2017).

Skumöz hücreli karsinom: Tüm akciğer kanseri vakalarının %30'nu oluşturarak görülme sıklığı bakımından akciğer adenokarsinomundan sonra ikinci sırada yer almaktadır (Ferone ve ark. 2016). Sigara dumanı gibi solunum yolu aracılığıyla maruz kalınan kanserojenler ile skuamöz hücreli karsinomun gelişimi arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (Inamura ve ark. 2005). Büyük boyutlara ulaştığında kaviteleşmenin de eşlik ettiği skuamöz hücreli karsinom, genellikle hava yolları boyunca akciğerin santral kısmında yerleşim göstermektedir. Mikroskopik incelemede ise karakteristik olarak keratinizasyon ve hücreler arası köprüler göze çarpmaktadır. Keratinize edici, keratinize edici olmayan ve basaloid şeklinde alt tiplere ayrılmaktadır (Zheng 2016).

Büyük hücreli karsinom: KHDAK vakalarının yaklaşık %10'unu, tüm akciğer kanseri vakalarının ise %3'ünü oluşturmaktadır. Ancak rezekte edilmiş bir tümörde teşhisi konabilmektedir (Travis ve ark. 2015). Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom veya nöroendokrin karsinom şeklinde morfolojik olarak kolayca sınıflandırılmayan akciğer karsinomlarını kapsamaktadır. Sigara içenlerde yaygın olarak görülen bu tümörün, diğer KHDAK türlerinden daha agresif olduğu düşünülmektedir (Sholl 2014).

**KHAK:** İlk olarak 1936 yılında asbestozisi bulunan bir hastada tanımlanmış ve "yulaf hücreli karsinom" olarak isimlendirilmiştir (Gloyme 1936). Bütün akciğer kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturmaktadır (Qiu ve ark. 2017). Klinik ve biyolojik özellikleri bakımından diğer akciğer kanseri türleri ile karşılaştırıldığında oldukça farklıdır. Yüksek bir mitotik indekse sahiptir, buna bağlı olarak hızlı büyümektedir. Ayrıca, uzak bölgelere erken yayılmaktadır, bu agresif özelliği nedeniyle tüm akciğer kanseri türleri arasında en yüksek maligniteye sahiptir (Chen ve ark. 2012; Koinis ve ark. 2016). Nöroendokrin belirteçler sergilemesi nedeniyle akciğerin nöroendokrin hücrelerinden ya da nöroendokrin progenitörlerinden köken aldığı düşünülmektedir (Karachaliou ve ark. 2016). KHAK'ın teşhisi genellikle metastaz yapmasından sonra koyulabilmektedir, hastaların tanı sonrası 5 yıllık sağ kalım oranları ise yaklaşık %5'tir (Dooley ve ark. 2011). Bu oran, başlangıçta

radyoterapi ve kemoterapiye iyi yanıt vermesine rağmen hastalığın tekrarlaması, hızla ilerlemesi ve kazanılmış direnç ile ilişkilendirilmektedir (Chen ve ark. 2012; Rudin ve ark. 2019).

### 2.1.2. Akciğer Kanserinin Risk Faktörleri

Sigara kullanımının akciğer kanserinin en önemli nedeni olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte sigara içen bireylerin bir kısmında akciğer kanseri görülmemektedir. Ayrıca, akciğer kanseri tanısı alan bazı hastalarda sigara içme öyküsü bulunmamaktadır. Bu nedenle, akciğer kanseri gelişiminde etki olabilecek diğer risk faktörlerinin belirlenmesi hastalığın önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Kanwal ve ark. 2017).

**Sigara:** Akciğer kanserinin önde gelen risk faktörüdür ve hastalığın görülme riski sigara içenlerde içmeyenlere göre 20-50 kat daha fazladır (Doll ve ark. 2005). ABD ve Fransa’da akciğer kanserine bağlı ölümlerin %80’den fazlası sigara kullanımı ile ilişkilendirilmektedir. Bu oran Asya için %61, Sahra-altı Afrika için ise %40’tır (İslami ve ark. 2015). Popülasyonlara göre farklılıklar olmakla birlikte kadınlarda akciğer kanserine bağlı ölümlerin %55’i, erkeklerde ise %70’ten fazlası sigara kullanımı ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte kadınların akciğer boyutunun daha küçük olması, daha düşük sigara içme seviyelerinde dahi akciğer kanserine yatkınlıklarının yüksek olmasına yol açmaktadır (O’Keeffe ve ark. 2018). Sigaranın yanı sıra puro, pipo gibi diğer tütün ürünleri de akciğer kanseri için birer risk faktörüdür. Hindistan, Çin, Tayland gibi ülkelerde yerel tütün ürünlerinin tüketilmesinin akciğer kanseri riskinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (Malhotra ve ark. 2016).

Sigaranın kanser gelişimi ile ilişkisi, DNA’da mutasyon oluşumuna sebep olan 60’tan fazla kanserojen içermesi ile açıklanmaktadır. Mutasyonların kritik onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde birikmesi de kanser gelişimine sebep olmaktadır (Paz-Elizur ve ark. 2003; Alexandrov ve ark. 2010). Ayrıca sigara kullanımına bağlı olarak gelişen inflamatuvar yanıt, hem kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) hem de akciğer kanserinin gelişimine neden olacak şekilde sitokinlerde ve büyüme faktörlerinde düzensizliğe yol açmaktadır (Walser ve ark. 2008).

Sigara kullanımını akciğer kanseri için en önemli risk faktörü olsa da, akciğer kanseri hastalarının %10-15'inde sigara öyküsü bulunmamaktadır. Bu durum pasif içicilik ile akciğer kanseri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi gerekliliğini doğurmuştur. Yapılan çalışmalar pasif içiciliğin aktif sigara içimi ile benzer bir etiyolojik mekanizmaya sahip olduğunu göstermektedir (Asfar ve ark. 2017; Kim ve ark. 2018). Sigara dumanında polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler, aromatik aminler, aldehitler, fenolik ve nitro bileşikleri gibi mutajen ve kanserojen özellikte çok sayıda bileşik bulunmaktadır. Ana akım dumanda bulunan kanserojen bileşiklerin çoğu pasif içici dumanında da saptanmıştır (Hang ve ark. 2020). Uluslararası Akciğer Kanseri Konsorsiyumu tarafından da pasif içiciliğin akciğer kanseri riskini artırdığı ve diğer akciğer kanseri türlerine nazaran KHAK ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kim ve ark. 2014).

**Radon:** Yeryüzündeki tüm toprak ve kayalarda bulunan uranyum-238 elementinin radyoaktif bozunması sonucunda üretilen doğal bir radyoaktif gaz olan radon, sigara kullanımından sonra akciğer kanseri ile ilişkilendirilen en önemli ikinci risk faktörüdür. Akciğer kanseri vakalarının %10'unun radon kaynaklı olduğu belirtilmektedir (Corrales ve ark. 2020). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından 1988 yılında kanserojen olarak tanımlanan radon; betondaki çatlaklar, tesisat boşlukları aracılığıyla evlere girmekte ve toplanmaktadır. Radon gazının solunmasının ardından radyoaktif bozunması sonucunda ortaya çıkan alfa parçacıkları ise akciğer dokusunda DNA hasarına yol açarak uzun süreli maruziyet durumunda akciğer kanserine neden olmaktadır (Krewski ve ark. 2006; Gaskin ve ark. 2018). Özellikle genç yaşta akciğer kanseri tanısı almış ve sigara içmeyen hastaların yüksek seviyede radon gazına maruz kaldıkları düşünülmektedir (Lim ve ark. 2019). İç mekandaki radon konsantrasyonunda her 100 Bq/m<sup>3</sup>'lük yükselmenin akciğer kanseri riskinde %16'lık bir artışa sebep olduğu belirtilmektedir (Darby ve ark. 2005). Ayrıca, radon maruziyetinin özellikle KHAK için daha yüksek bir risk oluşturduğunu ortaya koyan bazı sonuçlar elde edilmiştir, ancak bu konuda yapılan çalışmalar birbirleriyle çelişmektedir (Krewski ve ark. 2005; Barros-Dios ve ark. 2012).

**Asbest:** Asbest; ısıya ve kimyasal/biyolojik bozulmaya karşı dayanıklı, lifli kristal yapıya sahip silikat mineralleri ailesini kapsamaktadır. İnşaat malzemeleri, fren balataları, yalıtım, tekstil, plastik ve kağıt gibi 3000'den fazla üründe asbest

kullanılmaktadır (Suraya ve ark. 2020). Tüm asbest formlarının kanserojen özellikte olduğu belirtilmektedir. Buna bağlı olarak, asbeste 30-40 yıl kadar uzun süreli maruz kalma kanser gelişimi ile sonuçlanabilmektedir (Kameda ve ark. 2014; Kettunen ve ark. 2017). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar asbeste uzun süre maruz kalan tekstil işçilerinde, madenciler ve çimento fabrikası işçilerinde akciğer kanseri ve mezotelyomanın yüksek oranda gözlemlendiği ortaya koymuştur (Archer 1988; Ulvestad ve ark. 2002; Elliott ve ark. 2012). Ayrıca, asbeste maruz kalan bireylerin akciğer epitel hücrelerinde p53 geninde nokta mutasyonları tespit edilmiştir (Nuorva ve ark. 1994).

**Hava kalitesi:** Fosil yakıtların yanması ile oluşan kanserojenler akciğer kanseri için potansiyel risk faktörleri olarak değerlendirilmektedir. Dış ortamdaki atmosferik kanserojenler polisiklik aromatik hidrokarbonlar, kükürt dioksit ve eser metallerini kapsamaktadır. Bu kanserojenlere uzun süre maruz kalmak akciğer kanseri riskini artırmaktadır (De Groot ve ark. 2018). Partiküler madde (PM)'ler akciğer kanseri ile ilişkilendirilen diğer bir atmosferik faktördür. PM2.5, hava kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan en önemli göstergelerden biridir ve 2,5 mikrometre veya daha küçük çaplı partiküler maddeleri tanımlamaktadır Akciğer dokusuna nüfuz edip tutunabilme özelliğine sahip PM2.5'un her 10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 'lük konsantrasyonunun, akciğer kanseri mortalitesinde %15-27'lik artış ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Turner ve ark. 2011; Shu ve ark. 2016).

**Çeşitli solunum yolları hastalıkları ve viral enfeksiyonlar:** KOAH, astım, pnömoni ve tüberküloz gibi solunum yolları hastalıkları geçirmiş kişilerin akciğer kanseri açısından daha yüksek risk taşıdıkları belirtilmektedir. Bu durum, hastalıkların neden olduğu kronik inflamasyona karşı oluşturulan yanıt ile ilişkilendirilmektedir. Akciğer dokusunda oluşan hasara bağlı olarak hücre bölünmesinin uyarılması, DNA hasarı riskinde artışa yol açmaktadır. Sigara kullanımı durumunda bu risk daha da artmaktadır. Sonuç olarak, yüksek mutasyon oranına bağlı olarak akciğer kanseri gelişebilmektedir (Brenner ve ark. 2012; Akhtar ve Bansal 2017). Çeşitli viral enfeksiyonlar akciğer kanseri riskini artıran bir diğer faktördür. Örneğin; insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV) ile enfekte hastalarda akciğer kanseri insidansında artış gözlenmektedir. Bu durum HIV hastalarının sigara kullanımı ile ilişkilendirilmektedir. Bununla birlikte bu hastalarda immünsupresyona bağlı olarak bakteriyel pnömoni riski artmaktadır. Sonuçta, tekrarlayan akciğer

enfeksiyonları akciğer kanseri gelişimine yol açabilmektedir (Marcus ve ark. 2017; Sigel ve ark. 2017). İnsan papilloma virüsü (HPV)'nün de akciğer tümörü dokusunda normal dokuya kıyasla daha yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir (Ragin ve ark. 2014). HPV tip 18 ve 16 DNA ile HPV E6-E7 mRNA'nın akciğer tümör dokusundaki varlığı çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur (Srinivasan ve ark. 2009; Yu ve ark. 2009). HPV 16/18 ile E6 ve E7'nin, otokrin veya parakrin mekanizma aracılığıyla akciğer kanserinin gelişiminde önemli bir rol oynayan interlökin-6 ve antiapoptotik Mcl-1 (uyarılmış miyeloid lösemi hücre farklılaşma proteini) ekspresyonunu artırdığı belirtilmektedir (Cheng ve ark. 2008).

**Aile öyküsü ve genetik yatkınlık:** Akciğer kanseri sigara kullanımı ile yakından ilişkili bir kanser türü olduğu için aile öyküsüne çok odaklanılmamaktadır. Bununla birlikte sigara içme durumuna bakılmaksızın, ailesinde akciğer kanseri öyküsü olan bireylerin bu hastalığa yakalanma risklerinin 2-3 kat arttığı belirtilmektedir (Chen ve Kaphingst 2011). Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS) akciğer kanserinde 5p15.33, 6p21-6p22 ve 15q25.1'de yaygın genetik varyasyonların olduğunu göstermiştir. Ayrıca; 22q12 (CHEK2), 15q15 (TP53BP1) ve 12p13 (RAD52) lokuslarındaki SNP'ler akciğer kanseri riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir (Timofeeva ve ark. 2012). Nükleotit eksizyon tamiri, baz eksizyon tamiri ve hücre döngüsü kontrolünde görevli çok sayıda genin de akciğer kanseri gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (Akhtar ve Bansal 2017).

### **2.1.3. Akciğer Kanserinin Tedavisi**

Akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan yöntemler cerrahi rezeksiyon, radyoterapi, kemoterapi ve biyolojik terapi şeklindedir. Bunlardan, tümörün cerrahi rezeksiyonu en etkili küratif yöntemdir. Bununla birlikte, hastaların %70'i tümörün rezeksiyonunun mümkün olmadığı ileri evrede tanı almaktadır (Granger 2016; Cryer ve Thorley 2019). Ayrıca 1960'larda cerrahi ve radyoterapiyi karşılaştıran prospektif randomize bir çalışma ve radyoterapinin faydalarını gösteren iki meta-analiz çalışma nedeniyle, cerrahi rezeksiyon KHAK tedavisinde tercih edilen bir yöntem değildir; sadece vakaların %5'inden daha azını oluşturan evre 1 aşamasındaki hastalara uygulanmaktadır (Fox ve Scadding 1973; Pignon ve ark. 1992; Warde ve Payne 1992; Jett ve ark. 2013). Bu nedenle cerrahi rezeksiyon daha çok KHDAK tedavisinde kullanılan bir yöntem olup cerrahi rezeksiyon sonrası 5 yıllık sağ kalım

oranları evre I KHDAK hastaları için %60-80, evre II KHDAK hastaları için %30-50'dir (Lemjabbar-Alaoui ve ark. 2015).

Radyoterapi, akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %75'ine uygulanan bir tedavi yöntemidir. Rezekte edilebilir KHDAK tümörlerinde radyoterapi, ameliyat öncesi veya sonrasında cerrahiye ek olarak hastalara uygulanmaktadır. Rezeksiyona uygun olmayan KHDAK tümörlerinde ise yüksek dozda ışın radyoterapisi tedavi yöntemi olarak tercih edilmektedir. İleri semptomatik KHDAK'da ise torasik radyoterapi palyatif amaçlı olarak kullanılmaktadır (Jassem 2007). KHAK'da radyoterapi uygulamaları ise hastalığın evresine göre değişiklik göstermektedir. Tüm KHAK hastalarının yaklaşık üçte birini oluşturan sınırlı evre KHAK; tek bir radyasyon portalı içinde ipsilateral hemitoraks ile sınırlı olan evre olarak tanımlanmaktadır. Bu alanın dışında gelişen KHAK'ın diğer tüm olguları ise yaygın evre olarak değerlendirilmektedir (Mishra ve ark. 2018). Sınırlı evre KHAK'da torasik radyoterapi, kemoterapi ile kombine olarak hastalara uygulanmaktadır. Tedaviye yanıt alınması durumunda ise profilaktik kraniyal ışınlama tedavi yöntemi olarak benimsenmektedir. Yaygın evre KHAK'da kemoterapi standart tedavi yöntemidir, radyoterapi palyatif amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte kemoterapiye yanıt veren hastalarda profilaktik kraniyal ışın uygulamasının sağ kalımı artırdığı belirtilmektedir (Videtic 2015).

Kemoterapi, akciğer kanseri gibi solunum malignitelerinde tedavinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Neoadjuvan veya adjuvan olarak uygulanabildiği gibi palyasyon amacıyla da tercih edilmektedir (Cryer ve Thorley 2019). KHDAK hastaları için platin bazlı kemoterapi standart tedavi yöntemlerinden biridir. Özellikle sisplatin hem ileri evre hem de erken evre KHDAK hastaları için en çok tercih edilen platin ajandır (Fennell ve ark. 2016). Bununla birlikte, KHDAK hastalarında sisplatinin diğer kemoterapötik ajanlar ile kombine olarak uygulanmasının daha iyi bir yanıt oluşturduğu belirtilmektedir. Bu nedenle sisplatin hastalara taksanlar (paklitaksel, dosetaksel veya vinorelbin), antimetabolitler (gemsitabin veya pemetrekset) veya vinka alkaloidleri (vinblastin) ile kombine olarak verilmektedir (Rinaldi ve ark. 2006; Lemjabbar-Alaoui ve ark. 2015). KHAK'da ise siklofosamid, doksorubisin ve vinkristinden oluşan CAV rejimi uzun yıllar tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır. Son yıllarda sisplatin ya da karboplatinin, topoizomeraz-II inhibitörleri etoposid veya irinotekan ile kombinasyonunu içeren platin bazlı

kemoterapi uygulamaları tercih edilmektedir. Bununla birlikte platin bazlı kemoterapi uygulamaları sonrasında sınırlı evre KHAK hastalarında 2 yıllık sağ kalım oranı %40 iken yaygın evre KHAK hastalarında bu oran %5-10'dur (Demedts ve ark. 2010; Han ve ark. 2017; Okuma ve ark. 2017).

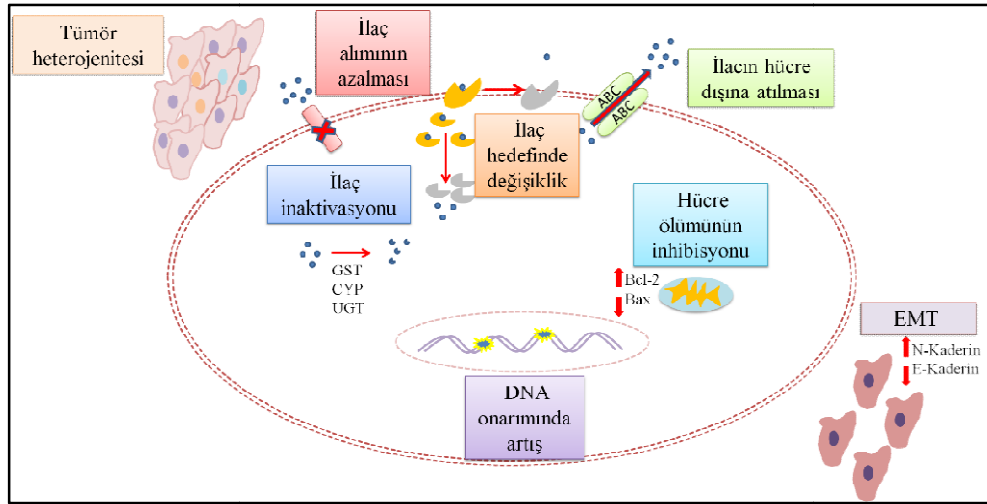
Teknolojideki ilerlemeler ile birlikte kanser biyolojisi hakkında daha fazla bilgiye sahip olunması, tümörün çeşitli bileşenlerini hedefleyen yeni biyolojik terapilerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Özellikle onkogen hedefli yaklaşımlar ve immün kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımı biyolojik terapinin önemli örneklerini oluşturmaktadır (Zugazagoitia ve ark. 2017). Akciğer kanserinde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), anaplastik lenfoma kinaz (ALK), proto-onkogen tirozin-protein kinaz 1 (ROS1), vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) gibi genlerde mutasyonların tanımlanması, tedavi edici olarak mutant gen ürünlerini hedefleyen küçük molekül inhibitörlerinin geliştirilmesine neden olmuştur (Cryer ve Thorley 2019). Örneğin; gefitinib, erlotinib ve afatinib KHDAK tedavisinde yaygın olarak kullanılan, etkinliği kanıtlanmış üç EGFR tirozin kinaz inhibitörüdür (Yang ve ark. 2017). Crizotinib; ALK veya ROS1 translokasyonu açısından pozitif olan ileri evre KHDAK hastalarında kullanılan, kemoterapiye göre bu hastalarda daha iyi yanıtı yol açan diğer bir tirozin kinaz inhibitörüdür (Solomon ve ark. 2014; Pirker ve Filipits 2019; Shaw ve ark. 2019). Bevacizumab VEGF'yi hedef alan monoklonal bir antikordur, platin bazlı kemoterapi ile kombinasyon halinde ileri evre KHDAK tedavisinde kullanılabilir (Ellis ve Al-Saleh 2012). Küçük molekül inhibitörlerinin KHAK'daki etkinliğini araştıran çeşitli faz çalışmaları da bulunmaktadır. Ancak KHDAK'ın aksine KHAK'da hedeflenen ileri gen mutasyonları nadirdir, bu nedenle küçük molekül inhibitörlerinden beklenen fayda sağlanamamaktadır (Moore ve ark. 2006; Tiseo ve ark. 2017).

Aktive edilmiş bağışıklık hücreleri tarafından eksprese edilen ve self antijenlere karşı T hücresi toleransını düzenleme işlevi gören immün kontrol noktası reseptörleri, kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışında rol oynamaktadır. Bu reseptörlerin ihhibisyonu ise kanser tedavisinde umut vadeden bir yaklaşım olan immünoterapi stratejilerinin başında gelmektedir (Li ve ark. 2017). Programlanmış Ölüm-1 (PD-1), PD-1 ligandı (PD-L1)'nin bağlanması ile T hücre aktivasyonunu inhibe eden ve immünosupresyonu düzenleyen immün kontrol noktası reseptörüdür

(Qiu ve ark. 2017). PD-1/PD-L1 etkileşiminin PD-1 inhibitörleri nivolumab, pembrolizumab ile, ya da PD-L1 inhibitörü atezolizumab ile engellenmesi KHDAK hastaları için ikinci basamak tedavi seçeneğidir (Reck ve ark. 2016; Rizvi ve ark. 2016; Rittmeyer ve ark. 2017). Nivolumab; KHAK tedavisi için FDA tarafından onaylanan ilk immünoterapi ajandır, tekrarlayan yaygın evreli KHAK hastalarında kullanılmaktadır. Benzer şekilde pembrolizumab 2019 yılında FDA onayı almış ve metastatik KHAK tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Tsiouprou ve ark. 2019).

## **2.2. Kanserde İlaç Direnci Mekanizmaları**

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan başlıca yöntemler cerrahi operasyon, sitotoksik kemoterapi, hedefe yönelik tedavi, radyasyon tedavisi, endokrin tedavi ve immünoterapi şeklindedir (Urruticoechea ve ark. 2010; Khalil ve ark. 2016). Bunlardan kemoterapi en yaygın uygulanan tedavi seçeneğidir. Ancak, klasik kemoterapötik ajanlara ve/veya yeni geliştirilen ilaçlara karşı kanser hücrelerinin direnç geliştirmeleri tedavide büyük bir sorun oluşturmaktadır (Alfarouk ve ark. 2015). İlaç direnci, farmasötik tedavilere toleranslı hale gelmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Bu kavram ilk olarak bakterilerin bazı antibiyotiklere direnç göstermesi ile ortaya çıkmıştır. Günümüzde ise kanser dahil pek çok hastalıkta ilaç direnci mekanizmalarının devreye girdiği bilinmektedir. Bazı ilaç direnci mekanizmaları hastalığa özgü olsa da, bakterilerde ve kanserde karşılaşılan mekanizmalar birbirine benzer olup evrimsel olarak korunmuştur (Housman ve ark. 2014). Kanserde ilaç direncinde etkili olan mekanizmalar tümör heterojenitesi, ilacın inaktivasyonu, ilacın hücre dışına atılması, ilaç alımının azalması, ilaç hedefinde değişiklik, DNA onarımında artış, hücre ölümünün inhibisyonu ve Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT) şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 2.2) (Zahreddine ve Borden 2013; Mansoori ve ark. 2017).



Şekil 2.2. Kanserde ilaç direnci mekanizmaları.

### 2.2.1. Tümör heterojenitesi

Tümör heterojenitesi, intertümoral heterojenite ve intratümoral heterojenite olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan intertümoral heterojenite, aynı histolojik tipteki tümörleri barındıran hastalar arasındaki heterojenliği ifade etmektedir. İntratümoral heterojenite ise bir hastanın tümör hücreleri arasındaki heterojenliği tanımlamaktadır (Dagogo-Jack ve Shaw 2018). Tümör, aralarında farklılık göstermeyen küçük bir kanser progenitör hücre grubundan köken almaktadır. Ancak tümör ilerledikçe mutasyonlar, gen amplifikasyonları, kromozomal düzenlemeler, genetik elementlerin transpozisyonu ve mikroRNA (miRNA) profilindeki değişiklikler gibi faktörlere bağlı olarak tümör içerisinde farklı özellikte hücre grupları meydana gelmektedir (Leary ve ark. 2018). Bu hücre grupları kemoterapötik ilaçlara karşı farklı hassasiyete sahiptir, buna bağlı olarak ilk tedavide tümörün sadece bir kısmı öldürülebilmekte ve ilaca dirençli kanser hücreleri hayatta kalabilmektedir. Dirençli hücre grupları çoğalıp büyüdüğünde ise tümör ilk kemoterapiye duyarsız olan farklı hücre grupları ile tekrar oluşabilmektedir (Wang ve ark. 2019). Bu durum KHAK tümörlerinde de sıklıkla gözlenmektedir. KHAK'ın diğer akciğer kanseri türlerinden en önemli farkı, başlangıçta kemoterapiye iyi yanıt vermesine rağmen sonradan kemoterapiye dirençli şekilde tümörün tekrar gelişmesidir (Shue ve ark. 2018).

### 2.2.2. İlaç inaktivasyonu

Kanserde ilaç direncinde etkili olan bir diğer mekanizma, ilaçların çeşitli proteinler ile etkileşime girmesi sonucunda moleküler özelliklerinin değişmesine

bağlı olarak aktivitelerinde azalmanın meydana gelmesidir (Druker ve ark. 2001). İlaç metabolizması, metabolize edici enzimlerin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu başta karaciğer olmak üzere ince bağırsak ve böbrekte olmaktadır. Bu bölgelerde fonksiyonel kimyasal grupların eklenmesi ile oksidasyon, indirgeme ve hidrolizi kapsayan faz I reaksiyonları ile ilacın daha sonra uzaklaştırılan bir substrat ile konjugasyonunu kapsayan faz II reaksiyonları gerçekleşmektedir (Azzariti ve ark. 2011). Sitokrom P450 (CYP), glutatyon-S-transferaz (GST) ve üridin difosfat glukroniltransferaz (UGT) gibi protein aileleri bu reaksiyonlarda görev alarak direkt olarak ilaç aktivasyonu/inaktivasyonunda etkili olmaktadır (Michael ve Doherty 2005).

CYP monooksijenaz, çeşitli ksenobiyotikler ile steroidler gibi bazı endojen maddelerin faz I metabolizmasından sorumlu olan hemoproteinlerin bir üst ailesidir. Karaciğerde yüksek oranda ifade edilen CYP'ler, mevcut ilaçların %70-80'inin metabolizmasında rol oynamaktadır (Cho ve Yoon 2015). CYP aracılı metabolizma, genellikle antikanser ilaçların aktivitesinin azalmasına veya etkisizleşmesine neden olmaktadır, ancak bazı durumlarda CYP aracılı metabolizma ile daha sitotoksik bir metabolit de meydana gelebilmektedir. Örneğin, doksorubisin CYP3A enzimlerinin etkisiyle daha sitotoksik bileşiklere metabolize edilmektedir. Ancak, paklitakselin CYP2C8 ve CYP3A4 enzimleri ile dosetakselin CYP3A4 enzimi ile metabolize edilmesi sonucunda 30 kat daha az toksik metabolitler oluşmaktadır (McFadyen ve ark. 2001). Ayrıca çoğu CYP geni polimorfiktir, bu durum bireyler arasında ilaca verilen cevaptaki farklılıkların ana sebeplerinden biridir. CYP polimorfizmleri henüz karsinogenez süreci ile ilişkilendirilmemiş olsa da, CYP yapısında ve ifadesindeki genetik farklılıklar ilaçların emiliminde fonksiyonel değişikliklere sebep olabilmektedir. İlacın hastada uygun seviyede korunmasını engelleyecek şekilde sonuçlanabilecek bu değişikliklere bağlı olarak da kanser ilaca dirençli olarak değerlendirilmektedir (Luqmani 2005; Rodriguez-Antona ve Ingelman-Sundberg 2006).

GST'ler, hücrel makromoleküllerin reaktif elektrofillerin saldırılarından korunmasını sağlayan Faz II detoksifikasyon enzimi ailesidir. Spesifik olarak GST'ler, glutatyon (GSH)'un çok çeşitli endojen ve ekzojen elektrofilik bileşiklere konjugasyonunu katalize etmektedir. GSH konjugasyonu, hücrede toksik bileşiklerin yok edilmesinde ilk adım olarak değerlendirilmektedir (Townsend ve Tew 2003).

İlaç metabolizmasında da GSH, GST enzim sistemi tarafından kofaktör olarak kullanılmakta ve GSH-ilaç konjugatları oluşturulmaktadır. Kanser hücrelerinde GST ifadesinin normal hücrelere kıyasla daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu durum GST'nin aktivitesi ile GSH'nin siklofosamid, doksorubisin, melphalan ve klorambucil gibi alkilleyici ajanlarla konjugatlar oluşturmasına yol açmakta ve buna bağlı olarak alkilleyici ajanların detoksifikasyonu gerçekleşmektedir (Kartal-Yandim ve ark. 2016). Ayrıca GSH-ilaç konjugatları ATP-bağlayıcı kaset (ABC) superailisine ait çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1 (MRP; ABCC1) ve P-glikoproteini (Pgp; ABCB1) gibi ilaç dışı atım pompaları ile hücrelerden aktif olarak taşınabilmektedir. Aradaki bu sinerjik etkileşime bağlı olarak kanser hücrelerinde hem GST'nin hem de ilaç dışı atım pompalarının aşırı ifadesi, antikanser ilaçlara karşı yüksek düzeyde dirence neden olabilmektedir (Meijerman ve ark. 2008). H69 ve U-1906E KHAK hücre hatlarının doksorubisine dirençli formları olan H69AR ve U-1906L hatlarında da ilaca duyarlı hücrelere kıyasla total GSH seviyesinin daha düşük olduğu, GST ve GSH peroksidaz gibi GSH ile ilişkili enzim aktivitelerinin ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Cole ve ark. 1990; Hao ve ark. 1994).

UGT'ler üridin difosfor-glukuronosiltransferazın glukuronil kısmının bilirubin, safra asitleri, steroidler gibi endojen substratlara ve ilaçlar gibi çeşitli ekzojen moleküllere transferini katalizleyen enzim ailesidir (Guillemette ve ark. 2014). Reaksiyon sonucunda oluşan glukuronil konjugatları ana moleküle kıyasla daha polar ve hidrofiliktir (Di 2014). Buna bağlı olarak tümörde UGT seviyesinin yükselmesi, ilacın böbrek ve biliyer sistem vasıtasıyla atılmasını kolaylaştırmakta ve bu durum ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir (Pathania ve ark. 2018).

Pek çok antikanser ilacın klinik olarak etkin olabilmesi için metabolik aktivasyona uğraması gerekmektedir. Metabolik ilaç aktivasyonunun azalmasına bağlı olarak da bu tür ilaçlara karşı direnç gelişebilmektedir (Zahreddine ve Borden 2013). Örneğin; sitarabin (AraC) akut miyeloid lösemi (AML) tedavisinde kullanılan etkili bir antikanser ilaçtır. DNA sentezinin inhibisyonu aracılığıyla etkili olan bu ilacın hücre içerisine alındıktan sonra fosforile edilmesi ve metabolik olarak aktif formu AraC-trifosfata (AraCTP) dönüştürülmesi gerekmektedir. Ancak bazı AML hastalarında AraC fosforilasyonundaki eksikliğe ya da AraC'nin deaminasyonuna bağlı olarak direnç gözlenmektedir (Macanas-Pirard ve ark. 2017).

### 2.2.3. İlacın hücre dışına atılması

Kanserde ilaç direncinin en çok bilinen mekanizmalarından biri, dışa atım pompalarının aktivitesine bağlı olarak ilacın hücre dışına atılmasında artışın meydana gelmesidir. Dışa atım pompaları gastrointestinal sistemden toksin absorpsiyonunun önlenmesi, safranin hepatositlerden elimine edilmesi, kan-beyin bariyeri işleyişinin sağlanması ve ilaçların böbreklerden atılımı gibi önemli fizyolojik fonksiyonları yerine getirmektedir (Ughachukwu ve Unekwe 2012). ABC superailisi; aminoasitler, iyonlar, peptitler, proteinler, kolesterol, metabolitler ve toksinler gibi çeşitli substratların membranlardan taşınmasını sağlayan ve ilaç direnci ile ilişkilendirilen en önemli dışa atım pompalarındandır (El-Awady ve ark. 2017). Yapısal olarak tüm ABC taşıyıcılarında ligand tanıma ve taşımada görevli transmembran domainleri (TMD) ile ATP bağlayan nükleotit bağlanma domainleri (NBD) bulunmaktadır (Rice ve ark. 2014). İnsanlarda 49 ABC taşıyıcısı tanımlanmıştır. Bunlar ABC domaini olarak da bilinen NBD'lerin yapısı ve aminoasit dizisine göre; ABCA (12 üye), ABCB (11 üye), ABCC (13 üye), ABCD (4 üye), ABCE (1 üye), ABCF (3 üye) ve ABCG (5 üye) olmak üzere 7 sınıfta incelenmektedir (Vasiliou ve ark. 2009). ABC taşıyıcıları ile ilacın dışarı atılmasında ilk adım, ilacın, membranın sitozolik tarafından taşıyıcının içe bakan konformasyonuna bağlanmasıdır. Bunu, bağlanma bölgesini hücre dışı tarafa yeniden yönlendiren ve ilacın salınmasıyla sonuçlanan, dışa doğru bakan bir konformasyonun oluşması izler. ATP hidrolizi, bu iki konformasyon arasındaki geçişte gerekli olan enerjiyi sağlamaktadır (Sharom 2014). Bununla birlikte ilaç atımına katılan taşıyıcılar belirli bir aileye ait değildir ve 12 taşıyıcının ilaç atımında rol oynadığı belirlenmiştir. Bunlardan Pgp, MRP1 ve meme kanseri direnç proteini (BCRP; ABCG2) ilaç direnci ile ilişkilendirilen en önemli ABC taşıyıcılarıdır (Sharom 2008).

Pgp; bağırsak mukozal membranı, böbrek proksimal tübül epitel, karaciğer, plasenta ve kan-beyin bariyeri tarafından eksprese edilen, ksénobiyotiklere ve hücrel toksiklere karşı korunmada görevli apikal bir zar taşıyıcısıdır (Loo ve ark. 2013). Ayrıca, Pgp, kanser hücrelerinde çoklu ilaç direnci ile ilişkilendirilen ilk ABC taşıyıcısıdır. Pgp'nin insan kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonu kanser hücrelerinin taksanlar (paklitaksel), vinka alkaloidler (vinblastin) ve antrasiklinler (daunorubisin) gibi çoğu antikanser ajana karşı kemoterapiyi etkisiz hale getirecek şekilde aynı anda

dirençli olmasına yol açmaktadır (Sauna ve Ambudkar 2007; Nanayakkara ve ark. 2018). Bununla ilişkili şekilde lösemi gibi hematolojik maligniteler ile meme kanseri, sarkomlar ve pediatrik kanserlerde Pgp ekspresyonu ile kemoterapiye verilen yanıt arasında negatif bir korelasyon tespit edilmiştir (Chan ve ark. 1990; Clarke ve ark. 2005; Seedhouse ve ark. 2007).

Pgp uzun bir süre çoklu ilaç direncinin tek nedeni olarak değerlendirilmiştir. 1992 yılında ise Cole ve ark. (1992) tarafından H69AR insan KHAK hücre hattında ilaç direnci ile ilişkili olarak MRP1 olarak isimlendirilen ikinci bir ABC taşıyıcısı tanımlanmıştır. Antrasiklinler, epipodofilotoksinler, vinka alkaloidler, kamptotesinler, metotreksat ve mitoksantron gibi çok çeşitli antikanser substratları olan MRP1'nin aşırı ekspresyonu; akciğer kanseri (Ota ve ark. 1995), mide kanseri (Endo ve ark. 1996), nöroblastoma (Norris ve ark. 1996), retinoblastoma (Chan ve ark. 1997), meme kanseri (Nooter ve ark. 1997), endometrium kanseri (Koshiyama ve ark. 1999) gibi çeşitli kanser türlerinde ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir.

BRCP; Pgp ve MRP1'i ifade etmediği bilinen, mitoksantron ve topotekana dirençli bir meme kanseri hücre hattından klonlanan, 1998 yılında keşfedilmiş diğer bir ABC taşıyıcısıdır (Mao ve Unadkat 2015). Keşfinden bu yana flavopiridol, 5-florourasil, topotekan, irinotekan ve SN-38 gibi çok çeşitli antikanser ajanların BRCP'nin substratları olduğu ortaya konmuştur (Westover ve Li 2015). Meme kanserinin dışında BCRP, AML ve kronik miyeloid lösemi (KML) gibi hematolojik malignitelerde ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir (Natarajan ve ark. 2012).

#### **2.2.4. İlaç alımının azalması**

İlaç alımının azalmasına bağlı olarak ilacın hücre içinde birikiminin azalması, ilaç direnci ile ilişkilendirilen diğer bir mekanizmadır (Gottesman 2002). Özellikle, ilacın hücre içerisine alınmasında görevli taşıyıcılarda meydana gelen mutasyonlar ilaç direncine yol açmaktadır. Örneğin, akut lenfoblastik lösemili (ALL) hastalarda metotreksata direnç genellikle solute-carrier (SLC) süper ailesi üyesi SLC19A1'i kodlayan *hRFC* genindeki mutasyonla ilişkilendirilmektedir. Gende meydana gelen mutasyona bağlı olarak 45. kodonda lizinin yerine glutamik asitin yer alması, metotreksatın taşıyıcısına bağlanma eğiliminde azalmaya neden olmaktadır. Metotreksatın hücre içi birikiminin azalması ALL hastalarında direnç ile sonuçlanmaktadır (Gifford ve ark. 2002). Benzer şekilde KML tedavisinde

kullanılan ve bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib, insan organik katyon taşıyıcı 1 (hOCT1) aracılığıyla hücrelere taşınmaktadır. hOCT1'in artan ekspresyonu imatinibe iyi yanıtla ilişkilendirilirken düşük hOCT1 aktivitesine sahip hastalarda optimal bir yanıt alınması için daha yüksek bir imatinib dozu verilmesi gerekmektedir (White ve ark. 2007; Wang ve ark. 2008).

### **2.2.5. İlaç hedefinde değişiklik**

Mutasyona ya da ekspresyon seviyesindeki farklılıklara bağlı olarak ilaç hedefinde değişikliklerin meydana gelmesi, ilaç direnci ile sonuçlanabilen diğer bir mekanizmadır (Mansoori ve ark. 2017). Prostat kanseri vakalarının yaklaşık %30'unda genomik androjen reseptörü (AR) amplifikasyonları mevcuttur. Bu vakalarda, androjen baskılama tedavisinde kullanılan testosteron düşürücü ilaçlar ile AR antagonistlerine karşı kazanılmış bir direnç söz konusudur. Terapötik bir etki için daha fazla hedef molekülün inhibe edilmesi gerekeceğinden ilaç hedefinin ifadesindeki artış inhibitörlerin etkinliğinin azalması ile sonuçlanmaktadır (Holohan ve ark. 2013).

İlaç hedefinin değiştirilmesi, kanser tedavisinde kullanılan küçük molekül inhibitörlerine karşı da önemli bir direnç mekanizmasıdır. Örneğin; erlotinib ve gefitinib KHDAK tedavisinde kullanılan, spesifik olarak aktif EGFR'yi hedeflemek için geliştirilmiş tirozin kinaz inhibitörleridir. İlk tedaviye yanıt veren hastalarda, bir yıl içerisinde EGFR'de ikincil mutasyonların ortaya çıkması ve mutasyona bağlı olarak EGFR'de konfigürasyon değişikliğinin meydana gelmesi ATP'nin EGFR'ye bağlanma afinitesinde artışa yol açarken erlotinib/gefitinib'in bağlanma etkinliğini bozmaktadır (Pao ve ark. 2005; Ma ve ark. 2011). Bu durum EGFR'yi hedef alan yeni nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesine yol açsa da EGFR'de oluşan yeni mutasyonlar nedeniyle bu inhibitörlere karşı da direnç gelişebilmektedir (Wang ve ark. 2016).

Benzer bir hedef ilişkili direnç KML'ye neden olan BCR-ABL1 onkogenik kinazın oldukça etkili bir inhibitörü olan imatinibe karşı da gözlenmektedir. Imatinib, BCR-ABL1 tirozin kinazın aktif olmayan formuna bağlanan ve ATP'nin bağlanmasını önleyen bir tirozin kinaz inhibitörüdür (Bitencourt ve ark. 2011). Ancak, KML hastalarının çoğunda tedavinin bir aşamasında direnç gözlenmektedir. Bazı hastalarda direnç tedavinin başında gözlenirken, bazılarında ilk tedavide yanıt

alındıktan sonra uzun süreli tedavide direnç gelişebilmektedir. Direnç mekanizmaları heterojen olmakla birlikte genellikle BCR-ABL kinaz domainini kapsayacak şekilde gerçekleşen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Elliden fazla kinaz domaini mutasyonu tanımlanmış olup bunlardan özellikle Y253, E255, T315, M351, F359, H396 ve G250T mutasyonları yaygın olarak gözlenmektedir (Gambacorti-Passerini ve ark. 2003; Azad ve ark. 2018). Kinaz domainini etkileyen bu mutasyonlar proteinde konformasyonel değişikliğe sebep olmakta, imatinibin bağlanma bölgesini bloke etmektedir. Bunun sonucunda ATP ilgili bölgeye bağlanabilmekte ve protein aktifleşmektedir (Mansoori ve ark. 2017).

#### **2.2.6. DNA onarımında artış**

Çoğu kemoterapötik ilaç, kanser hücrelerinin DNA'sına zarar vererek hücre döngüsünü durdurmayı ve replikasyonu önlemeyi hedeflemektedir. Ancak, DNA tamir mekanizmasında görevli proteinlerin ifadelerindeki artış, bu ilaçların etkinliğini bozarak direnç gelişimi ile sonuçlanabilmektedir (Luqmani 2005). Örneğin; platin grubu kemoterapötikler arasında yer alan, KHDAK, baş ve boyun kanseri, mesane kanseri ve mide kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan sisplatin DNA hasarına yol açarak etki göstermektedir (Galluzzive ark. 2012). Sisplatinin pürin kalıntıları üzerindeki N7 reaktif merkezine bağlanması ve pürin bazları ile 1,2-intrastrand çapraz bağlantılar kurması ile DNA hasarı oluşmaktadır. Sonuçta, hücre bölünmesi engellenmekte ve apoptotik hücre ölümü uyarılmaktadır (Dasari ve Tchounwou 2014). Ancak, DNA heliks yapısını bozan lezyonların onarımında görev alan Nükleotit eksizyon onarımı, platin-bazlı kemoterapiden kaynaklanan DNA hasarının düzelterek direnç gelişimine yol açabilmektedir (Jokić ve ark. 2016). Eksizyon onarım çapraz-tamamlayıcı grup 1 (ERCC1), bu mekanizmada yer alan önemli proteinlerden biridir ve ERCC1 ifadesindeki artış sisplatin direnci ile ilişkilendirilmektedir (Du ve ark. 2016). Benzer bir mekanizma çeşitli alkilleyici ajanlara karşı direnç gelişiminde devreye girmektedir. Karmustin (BCNU), lomustin (CCNU) ve temozolomid gibi alkilleyici ajanlar kan-beyin bariyerini kolayca geçen ve malign glioma tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ilaçlardır (Sarkaria ve ark. 2008). Bunlardan; BCNU ve CCNU, interstrand G-C çapraz bağlantıların oluşumu ile, temozolomid kalıcı O6-metilguanin eklentileri ile replikasyonu ve transkripsiyonu baskılamakta, sonuç olarak hücre ölümü indüklenmektedir (Xie ve ark. 2011). Guaninin O6

pozisyonundan metil/alkil gruplarını uzaklaştırarak hücre ölümü ile sonuçlanacak bu süreci engelleyen, DNA tamir enzimi O6-metilguanin DNA metiltransferazın (MGMT) artan aktivitesi ise alkilleyici ajanlara karşı gelişen direnç mekanizmalarının başında gelmektedir (Liu ve Gerson 2006).

### **2.2.7. Hücre ölümünün inhibisyonu**

Kanserde kemoterapötik direnç ile ilişkilendirilen diğer bir mekanizma, çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda hücre ölümüyle ilişkili sinyal yollarında düzensizliklerin meydana gelmesidir. Kanser hücrelerinde BCL2, AKT gibi antiapoptotik genlerin ifadesindeki artış; BAX, BAK gibi proapoptotik genlerin ifadesindeki azalma kemoterapötik ajanlara karşı direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Adams ve ark. 2015). Örneğin, KHAK dokuları ve ilaca direçli KHAK hücre hatlarında BCL2'nin artmış ifadesi gözlenmektedir, bu durum mitomisin C, irinotekan ve doksorubisine direnç ile ilişkilendirilmektedir (Ohmori ve ark. 1993; Sartorius ve Krammer 2002). Apoptotik yolda görevli genlerde meydana gelen mutasyonlar da kemoterapötik direncin önemli sebeplerinden biridir. p53 proteini, replikasyon sırasında ortaya çıkan herhangi bir DNA hasarı durumunda hücre döngüsünün durdurulması ve buna bağlı olarak apoptozun indüklenmesinde görev yapmaktadır. DNA hasarına sebep olan kemoterapötik ajanlar da p53 aracılı hücre ölümünün tetiklenmesini hedeflemektedir. Bununla birlikte çoğu kanserde p53 geni mutasyonları ile karşılaşmaktadır. Bu durumun KHAK'daki sıklığı ise %80'dir (Zhou ve ark. 2019). p53 proteinindeki fonksiyon kaybına bağlı olarak DNA hasarı durumunda da hücreler çoğalmaya devam etmekte ve DNA hasarına yol açan kemoterapötik ajanlara karşı direnç gelişmektedir (Chorawala ve ark. 2012).

### **2.2.8. EMT**

EMT, epitel hücrelerin hücre polaritelerini ve adezyon özelliklerini kaybederek artmış migrasyon ve invazivlik gibi mezankimal hücre karakterleri kazandıkları biyolojik bir süreçtir. Sitokinler, büyüme faktörleri, kodlamayan RNA'lar veya hipoksi ile uyarılan bu süreç, hücre-hücre bağlantılarının azalması, sitoskeletal ağın değişmesi ve proteolitik aktivitede artış ile karakterizedir. Kanser hücrelerinde ise EMT; metastaz, ankoraj bağımsız büyüme, apoptoza ve kemoterapötik ajanlara karşı direnç ile ilişkilendirilmektedir (Zheng 2017). Bu süreçte rol oynayan transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ), Wnt/ $\beta$ -katenin,

Notch, Hedgehog gibi çeşitli sinyal moleküllerinin de ilaç direncine katkı sağladığı bilinmektedir. Örneğin, KHAK'da hücre adezyonu ve metastazda rol oynayan Notch sinyalindeki azalma, dirençli hücrelerin apoptoza duyarlılığında artışa sebep olmuştur (Hassan ve ark. 2016). Prostat kanseri, glioblastoma ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde TGF- $\beta$  reseptörü I'in inhibitörü galunisertibin, TGF- $\beta$  aracılı EMT'yi baskılayarak kanser hücrelerini antikanser ilaçlara karşı duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Huang ve ark. 2020).

### **2.3. Kodlamayan RNA'lar**

Son yıllarda başta DNA Elementleri Ansiklopedisi Projesi (ENCODE) olmak üzere çeşitli genom boyu çalışmaları, genomun yaklaşık %70-80'inin RNA'ya transkribe edildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, proteine çevrilen kısım göz önüne alındığında genomda kodlama yapmayan RNA transkriptlerinin varlığını göstermiştir (Djebali ve ark. 2012; ENCODE Project Consortium 2012).

Protein kodlamayan RNA molekülleri genel olarak kodlamayan RNA (ncRNA)'lar olarak isimlendirilmektedir. ncRNA'lar içerisinde miRNA, uzun kodlamayan RNA (lncRNA), küçük nükleolar RNA (snoRNA), küçük interferans RNA (siRNA), küçük nüklear RNA (snRNA) ve piwi-etkileşimli RNA (piRNA)'ların bulunduğu çok büyük bir gruptur (Zhang ve ark. 2019). Transkript büyüklükleri temel alındığında ncRNA'lar, uzunlukları 200 nt'den kısa olan küçük kodlamayan RNA'lar ve uzunlukları 200 nt ile 100 kilobaz arasında değişen lncRNA'lar olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Cheetham ve ark. 2013).

#### **2.3.1. lncRNA'ların Moleküler Yapısı ve Özellikleri**

lncRNA terimi kullanılmasa da lncRNA'ların varlığını gösteren ilk bulgular miRNA'ların keşfinden öncesine dayanmaktadır. İlk keşfedilen lncRNA H19'dur. Ardından, X kromozomunun inaktivasyonunda görev alan X-inaktif spesifik transkript (Xist) lncRNA, 1990'lı yılların başında klasik gen haritalama yöntemi ile tanımlanmıştır (Brannan ve ark. 1990; Brown ve ark. 1991). lncRNA'ların çeşitliliğinin ve dinamik özelliklerinin anlaşılabilmesi ise tüm transkriptom dizileme çalışmaları ile mümkün olmuştur (ENCODE Project Consortium 2007).

lncRNA'ların transkripsiyonu mRNA'da olduğu gibi çoğunlukla RNA polimeraz II ile olur, ardından 5' başlık eklenmesi, poliadenilasyon ve splaysing gibi transkripsiyonel modifikasyonlar gerçekleştirilir (Mercer ve ark. 2009; Derrien ve

ark. 2012). Alternatif yollar da lncRNA oluşumuna katkı sağlayabilmektedir. Örneğin, kanser hücrelerinde RNA polimeraz III'ün artmış aktivitesi söz konusudur. Anormal RNA polimeraz III aktivitesinin de lncRNA'ların transkripsiyonuna yol açabileceği düşünülmektedir (Gibb ve ark. 2011). lncRNA'ların standart splaysing bölgeleri bulunmaktadır. Ayrıca, mRNA'dan daha az ekzon bölgesine sahiptirler, mRNA'ya göre daha kısadırlar. Genel olarak 100 nt'den kısa ve bilinen peptid sekansları ile homoloji göstermeyen, korunmamış açık okuma çerçeve (ORF)'leri bulunmaktadır. Zayıf ORF içeriğine bağlı olarak nonsense aracılı yıkım (NMD) devreye girdiğinden lncRNA'ların translasyonları gerçekleşmemektedir (Derrien ve ark. 2012; Quinn ve Chang 2016).

lncRNA'ların önemli bir diğer özelliği termodinamik olarak kararlı sekonder ya da daha yüksek yapılara katlanma eğilimi göstermeleridir. Yaygın sekonder yapılar; heliks, saç tokası, ilmek ve çıkıntılardır. Birçok durumda sekonder yapı lncRNA'nın işlevinde etkilidir (Cruz ve Westhof 2009). Sekonder yapılara ek olarak lncRNA'larda RNA-RNA, RNA-DNA ve RNA-protein etkileşimini sağlayan domainler bulunmaktadır. RNA ile baz eşleşmesi yapabilmeleri mRNA, miRNA ve diğer lncRNA'lar üzerinde etkili olabilmelerini sağlar (Guttman ve Rinn 2012).

Hücrelerin sitozolik ve nükleer fraksiyonları ile yapılan çalışmalar, lncRNA'ların büyük bir çoğunluğunun kromatin yapı ile ilişkili olabilecek şekilde nükleusta yerleşim gösterdiklerini, bir kısmının ise sitoplazmada yer aldığını ortaya koymuştur. lncRNA'ların çoğunlukla nükleus yerleşimli olmaları, gen ekspresyonunun epigenetik mekanizmalar ile düzenlenmesinde önemli fonksiyonlara sahip olabileceklerini göstermektedir. Sitoplazmada bulunan lncRNA'lar ise translasyonel düzenlemeyi de içerisine alan önemli fonksiyonlarda etkilidir (Derrien ve ark. 2012; Werner ve Ruthenburg 2015). Moleküler tekniklerdeki ilerlemeler ile birlikte bugün lncRNA'ların transkripsiyonel, posttranskripsiyonel ve epigenetik düzenleme, organ ve doku gelişimi, hücre farklılaşması, apoptoz, hücre döngüsünün kontrolü, metabolik mekanizmalar gibi temel ve kritik biyolojik süreçlerde önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Moran ve ark. 2012; Zhu ve ark. 2013). Ayrıca, lncRNA'ların kanser patogenezi de etkili oldukları çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Buna göre, kanser ile ilişkili olarak bazı lncRNA'lar onkogen rolü üstlenmektedir, bazılarının ise tümör baskılayıcı rolleri bulunmaktadır, bir kısmı ise

metastaz süreci ile ilişkilidir (Gupta ve ark. 2010; Wang ve ark. 2010; Pasmant ve ark. 2011; Ying ve ark. 2012).

#### **2.4. lncRNA HIF1A-AS2**

lncRNA'lar karışık ipliklerinde yer alan diğer transkriptin bir ya da daha fazla ekzonu ile çakışmaları durumunda doğal antisens transkrip (NAT)'ler olarak isimlendirilmektedir. NAT'lar protein kodlayan transkriptlere kısmen ya da tamamen komplementer olan endojen RNA molekülleridir (Katayama ve ark 2005). Protein kodlayan genlerin yaklaşık %50-70'inin antisens karşılıklarının bulunduğu bilinmektedir (Katayama ve ark. 2005; He ve ark. 2008). Sens transkriptleri ile karşılaştırıldıklarında NAT'ların ekspresyonları daha düşüktür. Ayrıca, protein kodlayan hedeflerinin ekspresyon seviyelerini düzenleyebilirler (Faghihi ve Wahlestedt 2009). Örneğin, sense RNA ile dubleks yapı meydana getirdiklerinde miRNA'nın bağlanma bölgesini kapatarak daha kararlı bir yapı oluşmasında rol oynayabilirler ya da sense transkriptlerinin splaysing bölgelerine bağlanmaları durumunda splaysing mekanizmasını inhibe edebilirler (Munroe ve Lazar 1991; Faghihi ve ark. 2008). Ayrıca epigenetik modifikasyonları içeren mekanizmalar ile sense transkripsiyonu aktif ya da inaktif hale getirebilirler (Faghihi ve Wahlestedt 2009).

HIF1A-AS2; HIF1A'nın 3' bölgesinden türeyen ve HIF1A mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanabilen bir NAT olarak aHIF ismiyle ilk defa 1999 yılında Thrash-Bingham ve Tartof tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar; normoksik ve hipoksik koşullar altında renal hücreli karsinomada aHIF'in yüksek oranda ifade edildiğini göstermiştir (Thrash-Bingham ve Tartof 1999). 3'aHIF-1a olarak da isimlendirilen bu NAT, Baranello ve ark. (2010) tarafından HIF1A'nın 5' bölgesinden türeyen başka bir kodlamayan RNA'nın (HIF1A-AS1 veya 5'aHIF-1a) tanımlanmasıyla HIF1A-AS2 olarak literatürdeki yerini almıştır.

HIF1A-AS2 mRNA'sı 2051 nükleotit uzunluğundadır ve HIF1A mRNA'sının 3'UTR bölgesi ile 1221 nükleotiti komplementerdir. Bazı çalışmalar bu bağlantının HIF1A üzerinde inhibe edici bir etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (Uchida ve ark. 2004; Chen ve ark. 2017). Bununla birlikte lncRNA'ların önemli bir fonksiyonu rekabetçi endojen RNA'lar (ceRNA) olarak miRNA fonksiyonuna müdahale etmeleri ve bunun sonucunda miRNA süngerleri olarak işlev görmeleridir

(Salmena ve ark. 2011). HIF1A-AS2'nin de HIF1A'nın postranskripsiyonel olarak susmasına yol açan miR-153-3p'nin süngeri olarak görev yaptığı ve buna bağlı olarak HIF1A'nın ifadesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Li ve ark. 2017). Bu sonuçlar HIF1A-AS2'nin HIF1A ifadesini negatif ya da pozitif yönde düzenlediği konusunda net bir yargıya varmayı engellemektedir. Bununla birlikte HIF1A'nın HIF1A-AS2 üzerine etkisi daha açıktır. HIF1A-AS2'nin promotor bölgesinde hipoksiye cevap elementi (HRE) olarak tanımlanan ve HIF-1 $\alpha$  proteinin bağlanması sonucu hipoksi ile indüklenen genlerin ekspresyonunu sağlayan 5'-(A/G)CGTG-3' sekansının bulunması, HIF1A'nın HIF1A-AS2 ifadesini pozitif yönde düzenlediğini göstermektedir (Uchida ve ark. 2004; Chen ve ark. 2017; Ma ve ark. 2019).

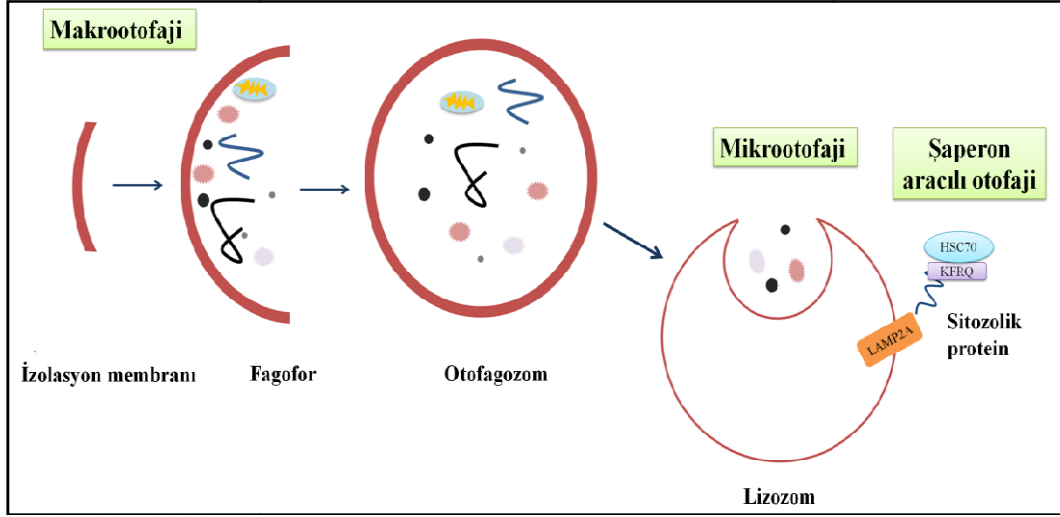
HIF1A-AS2 kanser patogenezi ile de ilişkilendirilen bir lncRNA'dır. Mide kanseri (Chen ve ark. 2015), mesane kanseri (Chen ve ark. 2016), glioblastoma (Mineo ve ark. 2016), kolorektal kanser (Lin ve ark. 2018), meme kanseri (Guo ve ark. 2019) ve osteosarkom (Lin ve ark. 2020) gibi çeşitli kanser türlerinde HIF1A-AS2'nin hücre proliferasyonu ve invazyonunda etkili olduğu gösterilmiştir.

## 2.5. Otofaji

Hücrede metabolik homeostaz, tüm biyolojik aktivitelerin temelini oluşturan biyosentez ve yıkım reaksiyonları ile korunmaktadır. Kısa ömürlü ya da yanlış katlanmış proteinleri hedefleyen ubiquitin-proteazom yolu ile uzun ömürlü makromoleküler kompleksleri ve organelleri hedefleyen lizozom-otofaji sistemi hücrenin başlıca yıkım sistemleridir (Li ve ark. 2017).

Evrimsel olarak en iyi korunmuş biyolojik süreçlerden biri olan otofajide sitoplazmik içeriklerin yıkımı, hücrelerin kendi lizozomları içerisinde gerçekleşmektedir. Sitoplazmik substratların lizozomlara verilmiş şekillerine bağlı olarak otofaji; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon-aracılı otofaji olmak üzere üç çeşittir (Şekil 2.3) (Xu ve ark. 2017). Makrootofaji; sitoplazmik içeriklerin otofagozom olarak adlandırılan, kapalı, iki membranlı bir vezikülün içerisinde lizozomlara sunulduğu otofaji türüdür (Feng ve ark. 2014). Mikrootofajide ise sitoplazmik içerikler lizozom membranının içe doğru tomurcuklanması ile içeriye alınır ve yıkımları gerçekleştirilir (Li ve ark. 2012). KFERQ-benzeri motif taşıyan proteinlerin HSC70 şaperonları ile tanınıp lizozom zarına seçici biçimde taşınması ile yıkımlarının gerçekleştirildiği otofaji ise şaperon-aracılı otofajidir (Kirchner ve

ark. 2019). Bunlardan en çok üzerinde durulan ve mekanizması iyi bir şekilde aydınlatılmış olan otofaji türü makrotofajidir, bu nedenle otofaji terimi yaygın olarak makrotofajiyi ifade etmek için kullanılmaktadır (Yin ve ark. 2016).

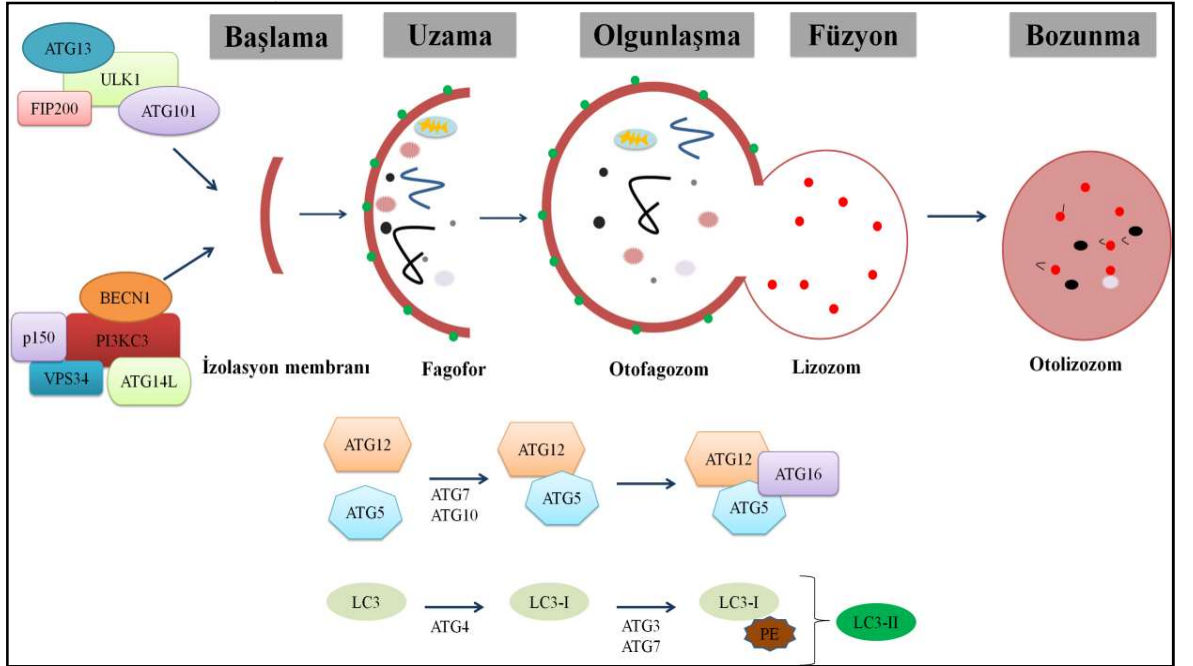


Şekil 2.3. Otofaji türleri.

Otofaji, yıkımı gerçekleştirilecek sitoplazmik içerikleri içersine alan otofagozomun oluşumu ile başlar. Ardından, otofagozomun lizozomla füzyonu gerçekleşir ve oluşan otolizozom içerisinde lizozomal enzimlerin aracılığıyla yıkım olur. Bu karmaşık süreç, memelilerde yaklaşık 32 tane olduğu bilinen Otofaji ilişkili gen (ATG)'lerin kontrolünde, başlama, uzama, olgunlaşma, füzyon ve bozunma olmak üzere 5 adımda gerçekleşir (Şekil 2.4) (Sun ve ark. 2013; Gupta ve Thum 2016).

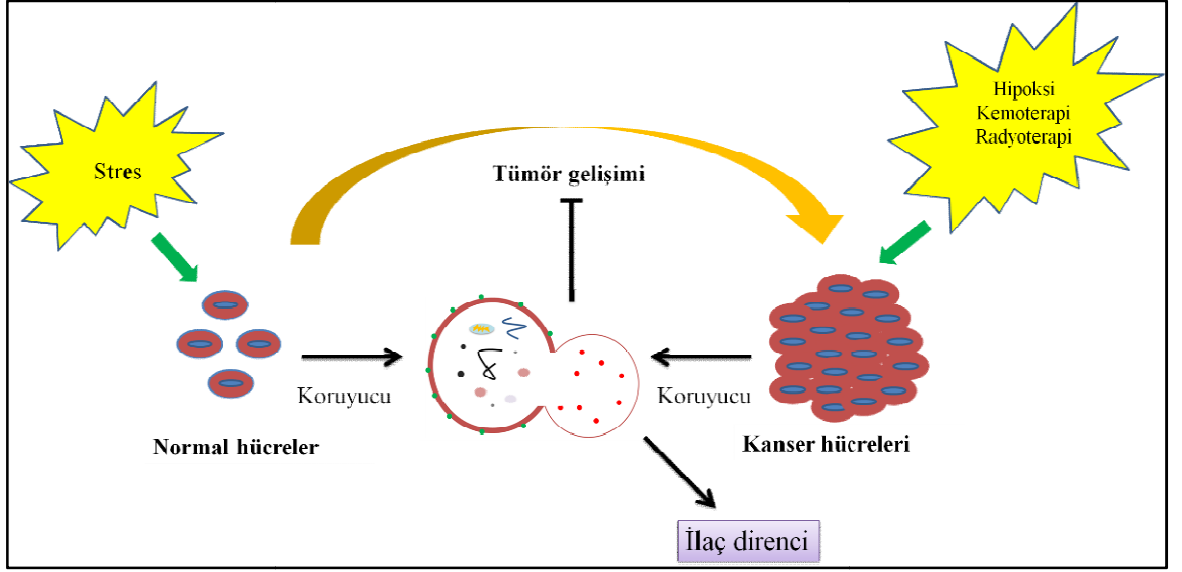
İlk adım fagofor olarak isimlendirilen ve ER, mitokondrial dış membran ve plazma membranından köken aldığı düşünülen bir izolasyon membranının oluşumudur (Kroemer ve ark. 2010). Bunun için ULK1, ATG13, 200 kDa fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein (FIP200) ve ATG101'den oluşan ULK kompleksi otofaji başlatma bölgesine taşınır. Ardından fosfatidilinositol 3-fosfat (PI(3)P)'ı oluşturmak için fosfatidilinositolün lipit baş grubunu fosforile eden sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3KC3) kompleksi aktive olur. PI3KC3 kompleksinin aktivasyonu fagofor oluşumu için gereklidir. PI3KC3, PI3KC3 kompleks 1 ve 2 (PI3KC3-C1 ve PI3KC3-C2) olarak bilinen en az iki farklı kompleks içermektedir. Her iki komplekste katalitik alt birim VPS34, p150 ve Beclin-1 (BECN1) bulunmaktadır. Ayrıca PI3KC3-C1 fagofor başlatma alanına kompleksi yönlendiren ATG14L taşımaktadır (Hurley ve Young 2017; Zachari ve Ganley 2017).

Fagoforun uzaması ubikitin ile yapısal benzerliğe sahip olan proteinlerden oluşan LC3/Atg8-fosfatidiletanolamin (PE) konjügasyon sistemi ve ATG12-ATG5 konjügasyon sistemi ile gerçekleştirilir. ATG12 E1 ve E2 benzeri enzimler olan ATG7 ve ATG10 aracılığıyla ATG5'e konjüge edilir. Bu konjugatın ATG16'ya bağlanması ile ATG12-ATG5-ATG16 kompleksi oluşur. LC3 ise PE'ye kovalent olarak bağlanarak konjugasyona uğrar. Bu işlem E1 ve E2 benzeri enzimler olan ATG4, ATG3 ve ATG7 aracılığıyla gerçekleşir (Yin ve ark. 2016). İki konjügasyon sistemi birbiriyle ilişkili olup gelişen otofagozomda lokalizedir. Ayrıca ATG12-ATG5 konjügasyonunun LC3 lipidasyonunda rol oynadığı ve LC3'ün PE'ye transferini kolaylaştırdığı bilinmektedir. LC3'ün doğru lokalizasyonu için ATG12-ATG5-ATG16 kompleksi gereklidir (Geng ve Klionsky 2008). LC3-II olarak adlandırılan LC3'ün lipidlenmiş formu aynı zamanda kargo tanınmasında da rol oynamaktadır. p62/SQSTM1 gibi otofajik kargo reseptör proteinleri tarafından tanınan ubikitinlenmiş hedefler, p62'in LC3-II ile etkileşen bölgeleri aracılığıyla otofagozoma hedeflenir. Otofagozomların lizozomlar ile füzyonu ise Rubicon, UVRAG, Rab7, SNARE ve LAMP gibi çok sayıda molekül tarafından düzenlenir. Son aşamada ise otolizozomlardaki lizozomal hidrolazlar aracılığı ile yıkım gerçekleşir, oluşan yapı taşları sentez reaksiyonlarında yeniden kullanılmak üzere sitoplazmaya geri taşınır (Sun ve ark. 2013).



Şekil 2.4. Otofaji mekanizması.

Otofaji; hipoksi, oksidatif stres, besin yoksunluğu, organel hasarı, ER stresi gibi çeşitli hücesel stres koşulları altında uyarılmaktadır. Sonuçta, otofaji ile hem hücesel ihtiyaçlar karşılanmakta hem de stres koşullarında hücre sağ kalımı desteklenmektedir (Kroemer ve ark. 2010). Homeostazın korunmasında hayati role sahip olan otofajideki düzensizlikler ise embriyonik farklılaşmayı ciddi bir şekilde etkilemekte; Alzheimer hastalığı, kanser gibi çok sayıda hastalığın gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Levine ve Kroemer 2008). Ancak, otofajinin kanserdeki rolü oldukça karmaşıktır. Otofaji; normal hücrelerde hasar gören organelleri ve yıkım ürünlerini ortadan kaldırarak, makromolekülleri geri dönüştürerek kansere karşı koruyucu bir rol üstlenebilir. Ancak, yerleşik tümörlerde kanser hücreleri otofajiyi çeşitli hücesel stresler ile baş etmek için kullanabilmektedir (Mathew ve ark. 2007). Bu durumda, otofajinin kemoterapi ya da radyoterapinin oluşturduğu hücesel strese karşı koruyucu bir mekanizma olarak devreye girmesi kanser hücrelerinde ilaç direnci ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.5) (Chen ve ark. 2010). Otofaji, en önemli uyarıcılarından biri olan hipoksi üzerinden de ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir. Hipoksi, oksijen eksikliği durumu olarak adlandırılmakta ve birçok solid tümör mikroçevresinin ortak özelliğini oluşturmaktadır. Kanser hücrelerinin yüksek proliferasyon özelliği nedeniyle, vasküler sistem tümör dokusunun oksijen ve besin gereksinimini karşılayamamakta ve sonuçta hipoksik bir mikroçevre oluşmaktadır. Tümör mikroçevresinin hipoksi özelliğinin kanser hücrelerini daha agresif hale getirdiği, metastaz, anjiyogenez, ve radyoterapi/kemoterapi direncinde etkili olduğu belirtilmektedir (Muz ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2018). Ayrıca, hipoksi ile indüklenen otofajinin de ilaç direncinde etkili olabileceği, bu nedenle hipoksik tümörlerde otofaji inhibisyonunun kanser tedavilerinin etkinliğini artırabileceği düşünülmektedir (Şekil 2.5) (Tan ve ark. 2016).



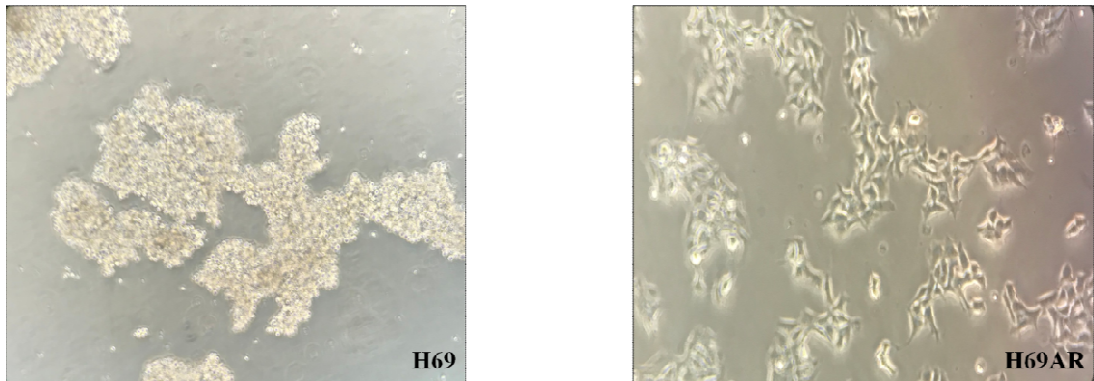
Şekil 2.5. Kanser-otofaji-hipoksi ilişkisi.

Tüm bu bilgiler ışığında; diğer akciğer kanseri türlerine göre daha agresif olduğu bilinen KHAK hücrelerinde hipoksiye ya da ilaç direncine bağlı olarak otofajinin arttığı ve tüm biyolojik süreçlerde görev aldığı bilinen lncRNA'ların bu aşamada da aktif rol oynadığı düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak bu tez projesinin hipotezi; hipoksi ile indüklendiği bilinen bir lncRNA olan HIF1A-AS2'nin KHAK hücrelerinde otofaji üzerinden kemoterapötik dirençte etkili olduğu, bu hücrelerde hipoksi-HIF1A-AS2-otofaji ekseninde gelişen bir ilaç direnci mekanizmasının devreye girdiğidir. Tez çalışmasında, HIF1A-AS2'nin normoksik ve hipoksik ortamda KHAK hücrelerinde ilaç direnci üzerine olası etkisinin otofaji üzerinden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hücre Kültürü

Çalışma, N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2017/1075 karar sayılı onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK A). Çalışmada ATCC (American Type Culture Collection, Rockville)'den temin edilen H69 (ATCC® HTB-119™) ve H69AR (ATCC® CRL-11351™) insan KHAK hücre hatları kullanılmıştır. H69 hücre hattı, 55 yaşında erkek bir KHAK hastasının akciğer dokusundan elde edilmiştir. H69AR hücre hattı ise artan doksorubisin konsantrasyonları ile 14 ay boyunca çoğaltılan H69 hücrelerinden oluşturulmuştur. H69 hücre hattına kıyasla doksorubisine yaklaşık 50 kat direnç gösterdiği belirtilmektedir. Ayrıca, benzer kimyasal yapı ya da etki mekanizmasına sahip çok sayıda kemoterapötik ajana (daunomisin, epirubisin, menogaril ve mitoksantron gibi antrasiklin analoglarına, asivisin, etoposid, gramisidin D, kolşisin, vinca alkaloidleri, vinkristin ve vinblastin) direnç göstermesi nedeniyle çapraz direnç profiline sahiptir. İki hücre hattı arasındaki en belirgin morfolojik farklılık ise H69 hücrelerinin flask yüzeyinde agregatlar oluşturarak çoğalması, H69AR hücrelerinin ise adherent özellik göstermesidir (Şekil 3.1) ([https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-11351](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-11351;); <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-119>). Her iki hücre hattı da %10 fetal sığır serumu (FBS, Capricorn, FBS-HI-12A) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco, 15070063) ilave edilmiş RPMI 1640 (Gibco, 22400089) besiyerinde, 37°C'de, %95 nemli ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde kültüre edilmiştir. İlaç dirençliliğinin korunması için H69AR hücreleri deneylerden iki hafta öncesine kadar final konsantrasyonunda 8 µM doksorubisin (Sigma-Aldrich, 44583-10MG) içeren besiyeri ortamında çoğaltılmıştır.



Şekil 3.1. H69 ve H69AR hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (20X büyütme).

### 3.2. siRNA ile Transfeksiyon Yöntemi

H69 ve H69AR hücre hatlarında HIF1A-AS2 siRNA yöntemi ile susturulmuştur. Bu amaçla HIF1A-AS2'yi hedef alan iki siRNA (HIF1A-AS2-siRNA-1: CCACAACUACAUAAGGGUAAU, Dharmacon, N-189446-01-0002; HIF1A-AS2-siRNA-2: GCGACAAAGUGCAUAAAAU, Dharmacon, N-189446-02-0002) ile herhangi bir genle eşleşme yapmayan bir siRNA (KONTROL-siRNA: UGGUUUACAUGUCGACUAA, Dharmacon, D-001320-01-05) kullanılmıştır. Liyofilize halde temin edilen siRNA'lar 1X siRNA Buffer (5X siRNA Buffer' (Dharmacon, B-002000-UB-100)'dan dilüe edildi) ile süspanse edilmiş, böylece 20 µM konsantrasyonunda stok siRNA'lar hazırlanmıştır. Transfeksiyon işlemi için 6-kuyucuklu plakalara ekimi yapılan hücreler ( $5 \times 10^5$  hücre/kuyucuk) antibiyotik içermeyen besiyeri ortamında, 37°C'de, CO<sub>2</sub>'li etüvde bir gece kültüre edilmiştir. Her bir kuyucuk için iki ependorf tüpü hazırlanmıştır. Her iki tüpe de serum içermeyen besiyeriden 190 µl konmuş, ardından 1. tüpe 10 µl 5 µM siRNA, 2. tüpe 10 µl transfeksiyon solüsyonu (Dharmacon, T-2001-03) ilave edilmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiş, ardından birleştirilerek tekrar 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuk için hazırlanmış toplam 400 µl hacmindeki her bir tüpe, 1600 µl antibiyotik içermeyen besiyeri ilave edilmiştir. Toplam 2000 µl hacmindeki her bir transfeksiyon karışımı besiyeri uzaklaştırılan kuyucuklara damla damla konulmuştur. Bu işlem sonucunda her bir kuyucuktaki siRNA konsantrasyonu 25 nM olarak belirlenmiş ve hücreler 24 saat süresince siRNA ile muamele edilmiştir. 24 saatin sonunda transfeksiyon karışımı uzaklaştırılmış ve deney protokollerine göre gerekli görülen yerlerde antibiyotiksiz besiyeri kullanılarak inkübasyona devam edilmiştir. Deney protokollerine göre değişiklik göstermekle birlikte, tüm analizler transfeksiyon sonrası en geç 48 saat içinde tamamlanmıştır.

### 3.3. Hipoksik Ortamın Oluşturulması

siRNA ile transfeksiyon sonrasında tüm deneyler normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılmış hücreler ile gerçekleştirilmiştir. *In vitro* hipoksik ortamın oluşturulmasında kullanılan yöntemlerden biri, hücrelerin Kobalt II klorür (CoCl<sub>2</sub>) ile 24 saat süresince muamele edilmesidir. Ancak uygulanan CoCl<sub>2</sub> konsantrasyonları farklılık gösterebilmektedir (Li ve ark. 2018; Chen ve ark. 2019). Bu nedenle hipoksik ortamın oluşturulmasında kullanılacak uygun CoCl<sub>2</sub>

konsantrasyonunu belirlemek amacıyla hücreler 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM konsantrasyonlarında CoCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, C8661-100G) ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. Ardından hücre canlılığını belirlemeye yönelik olarak sitotoksikite analizi ile hipoksinin önemli belirteçlerinden biri olan HIF1A ekspresyon seviyesinin değerlendirilmesini kapsayan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, H69 ve H69AR hücre hatları için hipoksik ortamın oluşturulmasında 100 µM CoCl<sub>2</sub> kullanılmasına karar verilmiştir. Sonuç olarak hipoksik ortamın oluşması için hücreler, siRNA ile transfeksiyon işleminin ardından antibiyotik içermeyen besiyeri içerisinde 100 µM CoCl<sub>2</sub> ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. Bu esnada normoksik grubu oluşturan hücreler ise antibiyotik içermeyen besiyeri ortamında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

#### 3.4. İlaç Uygulamaları ve Sitotoksikite Analizleri

Çalışmada kullanılan hücre hatları doksorubisine dirençli ve duyarlı olma özellikleri yönünden birbirinden farklılık göstermektedir. Bu farklılığın doğrulanması için XTT (2,3-bis- (2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil) -2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) analizi ile doksorubisinin her iki hücre hattındaki sitotoksik etkisi değerlendirilmiş ve IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Bu amaçla H69 (5x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk) ve H69AR (3x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk) hücreleri 96-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler farklı konsantrasyonlarda (H69 hücreleri 0-50 µM; H69AR hücreleri 0-300 µM) doksorubisin ile muamele edilmiş ve 24., 48. ve 72. saatlerde kuyucuklara 150 µl XTT solüsyonu (XTT hücre proliferasyon kiti, Biological Industries, 20-300-1000) eklenmiştir. XTT solüsyonu ile 4 saat inkübasyonun ardından her bir kuyucuktaki absorbans değeri 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında mikropilaya okuyucuda (BioTek Epoch) okunmuştur. Hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Her iki hücre hattında doksorubisinin IC<sub>50</sub> değeri ise CompuSyn programı (Version 1.0, ComboSyn Inc., U.S.) ile belirlenmiştir.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = (\text{Ölçülen optik dansite değeri}) / (\text{Kontrol optik dansite değeri}) \times 100$$

Transfeksiyon öncesinde gerçekleştirilen XTT analizi, dirençli ve duyarlı hücre hatları arasındaki farklılığı göstermek için yapılmıştır. Aynı analiz, siRNA ile

transfeksiyon sonrasında, HIF1A-AS2'nin ilaca verilen yanıtta rolüne bağlı olarak direnç gelişimindeki etkinliğini ortaya koymak için de gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, transfeksiyon sonrası farklı konsantrasyonlarda doksorubisin ile muamele edilmiş, normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılan hücrelerde doksorubisinin IC<sub>50</sub> değeri hesaplanmıştır.

HIF1A-AS2'nin susturulmasının hücre canlılığı üzerine etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla transfeksiyon işleminin ardından 24., 48. ve 72. saatlerde XTT analizi gerçekleştirilmiş ve hücre canlılığı belirlenmiştir. Ayrıca yukarıda da belirtildiği gibi hipoksik ortamın oluşturulması için uygun CoCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenmesinde de XTT analizi kullanılmıştır.

### **3.5. Akım Sitometri ile Apoptoz Tayini**

Transfeksiyon işleminin ardından normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılan hücrelerde doksorubisin uygulaması sonrasında erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz oranları FITC Annexin V apoptoz kiti (BioLegend, 640922) kullanılarak belirlenmiştir. 6-kuyucuklu plakalara ekimi yapılmış ve transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş H69 ve H69AR hücreleri, normoksik ve hipoksik koşullarda 10 µM doksorubisin ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. 24 saatin sonunda hücreler toplanmış ve 1x10<sup>6</sup> hücre/ml olacak şekilde Dulbacco fosfat tamponlu su (DPBS, Biowest, L0615-500) ile hücre süspansiyonları oluşturulmuştur. Hücre süspansiyonlarının 100 µl'si 5 ml'lik test tüplerine aktarılmış ve üzerlerine 5 µl FITC Annexin V ve 5 µl 7-ADD boyası ilave edilmiştir. Tüpler karanlık ortamda, oda sıcaklığında, 15 dk inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda üzerlerine 400 µl Annexin V bağlanma tamponu konulmuştur. Tüplerin akım sitometri cihazına (BD FACSAria™ III) yerleştirilmelerinin ardından analiz gerçekleştirilmiştir.

### **3.6. Otofaji Analizi**

Transfeksiyon sonrasında normoksik ve hipoksik ortamda doksorubisin ile muamele edilmiş veya edilmemiş hücrelerde otofaji analizi; otofajik kompartmanların (pre-otofagozom, otofagozom ve otofagolizozomlar) Cyto-ID boyası ile boyanması esasına dayanan Cyto-ID® Otofaji Kiti (Enzo Life Sciences, ENZ-51031-0050) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tipik olarak hücrelerin perinükleer bölgesindeki küresel vakuollerde birikme eğilimi gösteren ve LC-3 ile birlikte lokalize olan Cyto-ID boyasından elde edilen sinyal, otofaji varlığını

göstermektedir. Otofaji analizi için, 6-kuyucuklu plakalara ekimi yapılmış, transfeksiyon sonrasında normoksik ve hipoksik ortamda doksorubisin ile muamele edilmiş veya edilmemiş hücreler toplanmış ve kit içeriğinde bulunan 1X analiz tamponu ile  $1 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonları oluşturulmuştur. Ardından hücreler 1500 rpm'de 4 dk santrifüj (Hettich 200R) edilmiş ve pellet 400 µl Cyto-ID boya solüsyonu ile süspanse edilmiştir. Karanlık ortamda, 37°C'de, 30 dk inkübasyonun ardından tekrar santrifüj işlemi uygulanmış ve 1X analiz tamponu ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından pellet 500 µl 1X analiz tamponu ile süspanse edilmiştir. Her bir hücre süspansiyonunun 100 µl'si 96-kuyucuklu siyah plakalara aktarılmış ve floresan mikropate okuyucuda (BioTek Epoch) (Eksitasyon: 480 nm, Emisyon: 530 nm) okuma gerçekleştirilmiştir.

### **3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi**

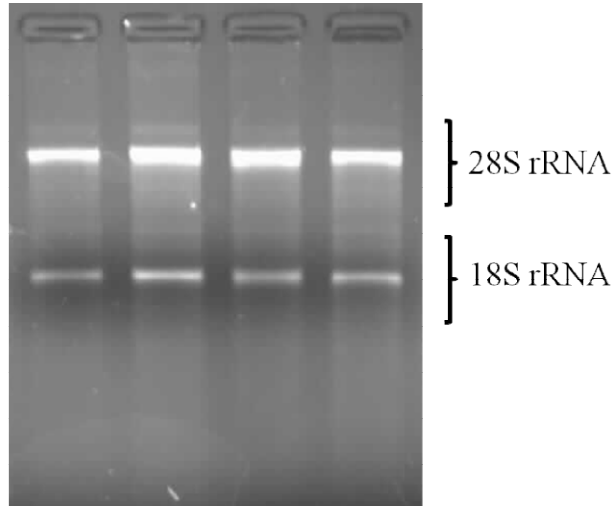
Transfeksiyon sonrasında normoksik ve hipoksik ortamda 10 µM doksorubisin ile muamele edilmiş hücrelerde ilaç direnci ve otofaji ile ilişki genlerin mRNA seviyelerindeki olası farklılıklar gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile belirlenmiştir. Ayrıca HIF1A-AS2'yi hedefleyen siRNA'ların etkinliklerinin belirlenmesi ile hipoksik ortamın oluşturulmasında uygun CoCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun seçilmesinde de qPZR analizi kullanılmıştır.

#### **3.7.1. Hücrelerden Total RNA İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi**

Total RNA izolasyonu için 6-kuyucuklu plakalarda çoğaltılmış hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 1 ml RiboEx (GeneAll, 301-001) eklenmiştir. Her bir kuyucuktaki homojenat ependorf tüplere alınarak oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından her bir ependorf tüpüne 200 µl kloroform eklenmiş, tüpler oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda +4°C'de 12000 g'de 15 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve oluşan üst fazlar ayrı ependorf tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 500 µl izopropanol eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler +4°C'de 12000 g'de 15 dk santrifüj edilmiş, ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 1 ml %70'lik etanol eklenmiştir. +4°C'de 7000 g'de 10 dk süreyle tekrar gerçekleştirilen santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin ardından pellet 30 µl nükleaz içermeyen su ile çözdürülmüştür.

### 3.7.2. RNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların miktarı ve kalitesinin belirlenmesi amacıyla her bir RNA örneğinden 1 µl alınmış ve nanodrop cihazında (Maestrogen) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. UV ölçümleri A260/A280 için  $2\pm 0,1$  ve A260/A230 için 2,0-2,4 arasında olan RNA örnekleri analizlerde kullanılmıştır. Ayrıca, RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi amacıyla yatay jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 1 µg konsantrasyonundaki RNA örneği üzerine 6X yükleme boyasından 6 µl konulmuş, toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler %1'lik agaroz jelde 90 V'da 75 dk yürütülmüş ve ardından jel görüntüleme sisteminde (Syngene Gbox Chemi 16) 28S ve 18S rRNA bantlarının varlığı doğrulanmıştır (Şekil 3.2). İzole edilen total RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanılmak üzere  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.

Olası bir genomik DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak amacıyla RNA örnekleri cDNA sentezi öncesinde üretici firmanın (Thermo Scientific, #EN0521) talimatları doğrultusunda DNase-I enzimi ile muamele edilmiştir. Bu amaçla, 2 µg RNA örneğine 2 µl 1U/µl DNase-I enzimi ve 2 µl 10X reaksiyon tamponu konulmuş ve toplam hacim nükleaz içermeyen su ile 18 µl'ye tamamlanmıştır.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dk inkübasyonun ardından örneklere 2 µl 50 mM EDTA ilave edilmiş ve  $65^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk inkübasyon ile reaksiyon durdurulmuştur. DNase uygulanmış RNA örnekleri aynı gün cDNA sentezinde kullanılmıştır.

### 3.7.3. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi üretici firmanın talimatlarına göre (iScript™ cDNA sentez kiti, Bio-Rad, 170-8891) gerçekleştirilmiştir. Bunun için, 1 µg total RNA örneğine 4 µl 5X iScript reaksiyon karışımı, 1 µl Revers Transkriptaz enzimi ilave edilmiş ve karışımın hacmi nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Ardından 25°C'de 5 dk, 46°C'de 20 dk ve enzim inaktivasyonu için 95°C'de 1 dk şeklinde cDNA sentez protokolü uygulanmıştır.

### 3.7.4. Primer Tasarımı ve qPZR

qPZR analizinde kullanılacak hedef genlere ait primerler IDT Primer Quest (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) programı ile tasarlanmıştır. Programda kullanılan hedef genlerin mRNA dizilerine ise Gen Bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)'ndan ulaşılmıştır. Çalışma kapsamında mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş ilaç direnci ve otofajide etkili olduğu bilinen genler Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** Ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş ilaç direnci ile ilişkili genler.

| Gen Sembolü | Açılımı  |
|-------------|--|
| ABCB1       | ATP-bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi 1         |
| ABCC1       | ATP-bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 1         |
| ABCC2       | ATP-bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 2         |
| ABCC3       | ATP-bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 3         |
| ABCC5       | ATP-bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 5         |
| ABCG2       | ATP-bağlayıcı kaset alt ailesi G üyesi 2         |
| APC         | APC, WNT sinyal yolağı regülatörü                |
| ARNT        | Aril hidrokarbon reseptörü nüklear translokatorü |
| ATM         | ATM serin/treonin kinaz                          |
| BAX         | BCL2 ilişkili X, apoptoz regülatörü              |
| BCL2        | BCL2, apoptoz regülatörü                         |
| BLMH        | Bleomisin hidrolaz                               |
| BRCA1       | BRCA1, DNA onarımı ile ilişkili                  |
| BRCA2       | BRCA2, DNA onarımı ile ilişkili                  |
| CLPTM1L     | CLPTM1 benzeri                                   |
| CYP1A1      | Sitokrom P450 ailesi 1 alt ailesi A üyesi 1      |
| CYP1A2      | Sitokrom P450 ailesi 1 alt ailesi A üyesi 2      |
| CYP2B6      | Sitokrom P450 ailesi 2 alt ailesi B üyesi 6      |
| CYP2C8      | Sitokrom P450 ailesi 2 alt ailesi C üyesi 8      |
| CYP2E1      | Sitokrom P450 ailesi 2 alt ailesi E üyesi 1      |
| CYP3A4      | Sitokrom P450 ailesi 3 alt ailesi A üyesi 4      |
| DHFR        | Dihidrofolat redüktaz                            |
| EPHX1       | Epoksit hidrolaz 1                               |
| ERCC3       | TFIIH kompleksi helikaz alt birimi               |
| FOS         | AP-1 transkripsiyon faktörü alt birimi           |
| GSK3A       | Glikojen sentaz kinaz 3 alfa                     |

**Tablo 3.1.** Ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş ilaç direnci ile ilişkili genler (devamı).

| <b>Gen Sembolü</b> | <b>Açılımı</b>                                      |
|--------------------|---|
| <b>GSTP1</b>       | Glutasyon S-transferaz pi 1                         |
| <b>HIF1A</b>       | Hipoksi indüklenbilir faktör 1 alfa alt birimi      |
| <b>MSH2</b>        | MutS homoloğu 2                                     |
| <b>MVP</b>         | Major vault proteini                                |
| <b>MYC</b>         | MYC proto-onkogen, bHLH transkripsiyon faktörü      |
| <b>RB1</b>         | RB transkripsiyonel baskılayıcı 1                   |
| <b>SOD1</b>        | Superoksit dismutaz 1                               |
| <b>SULT1E1</b>     | Sülfotransferaz ailesi 1E üyesi 1                   |
| <b>TOP1</b>        | DNA topoizomeraz I                                  |
| <b>TOP2A</b>       | DNA topoizomeraz II alfa                            |
| <b>TOP2B</b>       | DNA topoizomeraz II beta                            |
| <b>TP53</b>        | Tümör proteini p53                                  |
| <b>TPMT</b>        | Tiyopürin S-metil transferaz                        |
| <b>UGCG</b>        | UDP-glikoz seramid glukosiltransferaz               |
| <b>XPA</b>         | XPA, DNA hasar tanıma ve onarım faktörü             |
| <b>XPC</b>         | XPC alt birimi, DNA hasarı tanıma ve onarım faktörü |

**Tablo 3.2.** Ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiş otofaji ile ilişkili genler.

| <b>Gen Sembolü</b> | <b>Açılımı</b>                                    |
|--------------------|---|
| <b>AMBRA1</b>      | Otofaji ve Beclin 1 regülatörü 1                  |
| <b>ATG3</b>        | Otofaji ilişkili 3                                |
| <b>ATG4A</b>       | Otofaji ilişkili 4A sistein peptidaz              |
| <b>ATG4B</b>       | Otofaji ilişkili 4B sistein peptidaz              |
| <b>ATG4C</b>       | Otofaji ilişkili 4C sistein peptidaz              |
| <b>ATG4D</b>       | Otofaji ilişkili 4D sistein peptidaz              |
| <b>ATG5</b>        | Otofaji ilişkili 5                                |
| <b>ATG7</b>        | Otofaji ilişkili 7                                |
| <b>ATG9A</b>       | Otofaji ilişkili 9A                               |
| <b>ATG9B</b>       | Otofaji ilişkili 9B                               |
| <b>ATG10</b>       | Otofaji ilişkili 10                               |
| <b>ATG12</b>       | Otofaji ilişkili 12                               |
| <b>ATG16L1</b>     | Otofaji ilişkili 16 benzeri 1                     |
| <b>ATG16L2</b>     | Otofaji ilişkili 16 benzeri 2                     |
| <b>BECN1</b>       | Beclin 1  |
| <b>DRAM1</b>       | DNA hasarını düzenleyen otofaj modülatörü 1       |
| <b>GABARAP</b>     | GABA A tipi reseptör ilişkili protein             |
| <b>GABARAPL1</b>   | GABA A tipi reseptör ilişkili protein benzeri 1   |
| <b>GABARAPL2</b>   | GABA A tipi reseptör ilişkili protein benzeri 2   |
| <b>HDAC6</b>       | Histon deasetilaz 6                               |
| <b>IRGM</b>        | İmmünite ilişkili GTPase M                        |
| <b>LAMP1</b>       | Lizozomal ilişkili membran proteini 1             |
| <b>MAP1LC3A</b>    | Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 alfa |
| <b>MAP1LC3B</b>    | Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 beta |
| <b>NPC1</b>        | NPC hücre içi kolesterol taşıyıcı 1               |
| <b>RAB24</b>       | Ras onkogen ailesi üyesi                          |
| <b>RGS19</b>       | G protein sinyal düzenleyicisi 19                 |
| <b>ULK1</b>        | unc-51 benzeri otofaji aktive edici kinaz 1       |
| <b>WIP1</b>        | WD tekrar domaini, fosfoinositid etkileşim 1      |

Yukarıdaki genlere ek olarak HIF1A-AS2'nin etkileşim içinde olduğu bilinen insülin benzeri büyüme faktörü 2 mRNA bağlayıcı protein 2 (IGF2BP2) ve DExH-kutu helikaz 9 (DHX9)'u kodlayan genler ile yüksek mobilite grubu A1 (HMGA1) geni ekspresyonları da qPZR analizi ile değerlendirilmiştir. Referans gen olarak kullanılan Beta-aktin (ACTB) genine ve hedef genlere ait primer dizileri ile amplikon uzunlukları (bç) Tablo 3.3'te verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Primer dizileri ve amplikon uzunlukları (bç).

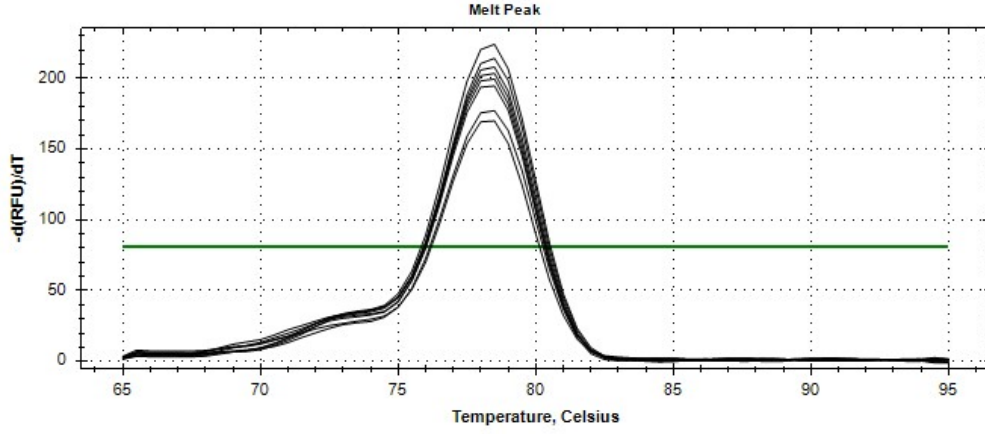
| Gen     | Forward primer<br>(5'→3') | Reverse primer<br>(5'→3') | Amplikon<br>(bç) |
|---------|---------------------------|---------------------------|------------------|
| ABCB1   | GCTATAATGCGACAGGAGATAGG   | GCTTCCAACCACGTGTAAATC     | 181              |
| ABCC1   | GAAACCATCCACGACCCTAATC    | CGACGTGTCCTCCTTGTTAAAG    | 153              |
| ABCC2   | CCGGAAGAAAGACTCAAGAA      | TGCTATCCACCAGGACATAAAC    | 128              |
| ABCC3   | CGCTTACCACCTTCTACAT       | GGGTTAGGTCGACATTCTTT      | 110              |
| ABCC5   | GCCAGTCTCACATCAAGATAG     | GCTGCCTCACCTTCTCTTT       | 148              |
| ABCG2   | TCGTAAGGGACTGGTTATAGG     | GTTGGTCGTCAGGAAGAAGAG     | 101              |
| APC     | AGCCGACCTAGCCATAAA        | CTTCCAGAGTTCAACTGCTCATC   | 117              |
| ARNT    | GGATGAGAACCAGCTCCTTAC     | GGATTGTGTTGGAGAGTGTAGG    | 126              |
| ATM     | AGAGCTGGAGTTGGATGAATTAG   | TCAAGCCAGAGGGAACAAAG      | 150              |
| BAX     | GGAGCTGCAGAGGATGATTG      | GGCCTTGAGCACCAGTTT        | 151              |
| BCL2    | GTGGATGACTGAGTACCTGAAC    | GAGACAGCCAGGAGAAATCAA     | 125              |
| BLMH    | GTGGTTTGGCTGTGATGTTG      | GTCAGCCTCTCCGCTTTATT      | 126              |
| BRC1    | GCTGCTGCTATACTACTGATAC    | GACACCACCATGGACATTCTT     | 122              |
| BRC2    | GCACTCCAGATGGCACAATAA     | GCGAAAGGGTACACAGGTAATC    | 83               |
| CLPTM1L | AGATCGAGGCGGAGAAGAA       | AGGACCCGTCAAAGACAAAG      | 111              |
| CYP1A1  | CCAGCTGACTTCATCCCTATTC    | GTAGTGCTCCTTGACCATCTTC    | 114              |
| CYP1A2  | GGCACTTCGACCCTTACAA       | CTGAGCATCTCATCGCTACTC     | 103              |
| CYP2B6  | GAGAGAGTCTACAGGGAGATTGA   | GATGACTGCCTCTGTGTATGG     | 96               |
| CYP2C8  | ATCCTCGGGACTTTATCGATTG    | GAGTGGTGCTTGTGTCTCT       | 141              |
| CYP2E1  | CTGAGATATGGGCTCCTGATTC    | GTAGGGCATCTCTTGCCTATC     | 126              |
| CYP3A4  | TTTGTCTACCATAAGGGCTTT     | CACAGGCTGTTGACCATCATA     | 94               |
| DHFR    | GTTGGTTCGCTAAACTGCATC     | GGGTGATTCATGGCTTCCTTA     | 383              |
| EPHX1   | AGATGAGGAGATCCACGACTTA    | GTAGTTGGAGTTGAAGCCATAGT   | 100              |
| ERCC3   | CGGGTGCTTCGAGCTAAA        | TGCCGCTTGGTTGAGTAA        | 107              |
| FOS     | GGACCTATCTGGGTCCTTCTAT    | AAGACGAAGGAAGACGTGTAAG    | 153              |
| GSK3A   | CTCCAGGACAAGAGGTTCAAG     | CACTGTCTCGGGACATATT       | 156              |
| GSTP1   | TTGGGCTCTATGGGAAGGA       | CGCCTCATAGTTGGTGTAGATG    | 113              |
| HIF1A   | CAGATCTCGGCGAAGTAAAGAA    | GATGGTAAGCCTCATCACAGAG    | 115              |
| MSH2    | CGTCGATTCCCAGATCTTAACC    | ACCCTGATAGAGTCGGTAACA     | 87               |
| MVP     | GACCGATGGCAAGAATCA        | TCCGACAGCACATACATC        | 118              |
| MYC     | CACCGAGGAGAATGTCAAGAG     | CTTGGACGGACAGGATGTATG     | 139              |
| RB1     | CCCTACCTGTACCAATACC       | TGTTGGCAGACCTTCTGAAA      | 136              |
| SOD1    | GTGTGGCCGATGTGTCTATT      | CTTCCAGCGTTTCTGTCTT       | 148              |
| SULT1E1 | GCAAAGGATGTGGCTGTTC       | GAACCTGTCTTGCATGAATTT     | 109              |
| TOP1    | CAGAGAACATCCAAGGTTCCA     | GCCGAGCAGTCTCGTATTT       | 96               |
| TOP2A   | TCAGATGCTAGTCCACCTAAGA    | GTGGTACACTGCCCTTAACA      | 118              |
| TOP2B   | GCTAATGATGCTGGTGGTAAAC    | TCTCGTCCAATCACACCTAATC    | 107              |
| TP53    | GAGATGTTCCGAGAGCTGAATG    | TTTATGGCGGGAGGTAGACT      | 129              |
| TPMT    | TCACCGAAATTCCTGGAACC      | GGCAACTAATGCTCTCTATCC     | 137              |

**Tablo 3.3.** Primer dizileri ve amplikon uzunlukları (bç) (devamı).

| Gen       | Forward primer<br>(5'→3') | Reverse primer<br>(5'→3') | Amplikon<br>(bç) |
|-----------|---------------------------|---------------------------|------------------|
| UGCG      | GGTTTGCAATGTCCACTCAAG     | TTGGTCCACCTGATCATCTCTG    | 88               |
| XPA       | CAAAGGAAGTCCGACAGGAAA     | TTCCACACGCTGCTTCTTAC      | 100              |
| XPC       | TGGCAGACAGAGGAGTATCA      | CAGCTGGACACAGCCAATA       | 117              |
| AMBRA1    | CTGAGTCAGATGGAGGGAATG     | CCGGTCATACTCCAGAAAAGAAG   | 101              |
| ATG3      | CAGCACTATGTGAAGAGGAAGA    | CTAGGGTAGCCTCATCTGTTTC    | 102              |
| ATG4A     | GCTCAAGCCCTTATCTGTAGAC    | ACTGTAGGATGCGTTGGTATTC    | 91               |
| ATG4B     | CATTCACCAGATAGCGCAAATG    | AGACAGCAAGCTTCTTCAGG      | 101              |
| ATG4C     | GCAGAGTCGGGATGTACAATAG    | CCCTGTAGGTCAGCCATATTC     | 97               |
| ATG4D     | GGACGAAGTGGACAAGTTCAA     | GGATGCTGGAGATCTTGCTAAA    | 107              |
| ATG5      | AGCAACTCTGGATGGGATTG      | AGGTCTTTCAGTCGTTGTCTG     | 140              |
| ATG7      | GGATGGTGAACCTCAGTGAAT     | AGTAGGAACCAATCTCCAACAC    | 98               |
| ATG9A     | GATCCACCGCTTATCAAGTT      | CAATACGGAAGGGCAGACATAG    | 105              |
| ATG9B     | GGAGGATCTCCATCTTCTCTCT    | AGGTGTCATTGCAGGTTGAG      | 185              |
| ATG10     | GAGCTACCCTGGATGATTGT      | GCACTTGGTAGCTACAGGAATA    | 100              |
| ATG12     | TGTGTTGCAGCTTCCTACTT      | GTGTCTCCCACAGCCTTTAG      | 174              |
| ATG16L1   | CGCAGCAAAGTCTGCATAAAG     | CTCTGATCGAATGTCCCAGAAA    | 126              |
| ATG16L2   | GGACCATCAATGCCTTTCCT      | GAACCGGATCTTCTGGTCATT     | 89               |
| BECN1     | GCAGCTGGATAAGCTGAAGA      | CGACCCAGCCTGAAGTTATT      | 99               |
| DRAM1     | GGTCATCTCTGCCGTTTCTT      | TTCCACTCCAGCTTGGTTATG     | 84               |
| GABARAP   | GGTGCCGGTGATAGTAGAAA      | GTAGAAGTACCAACTGTGAGA     | 100              |
| GABARAPL1 | GTGATTGTAGAGAAGGCTCCAA    | AGTAGAACTGGCCAACAGTAAG    | 94               |
| GABARAPL2 | AGGCGATCTTCTGTTTGT        | CCGCTGTAGGCCACATATAA      | 112              |
| HDAC6     | GAGAAGGACCCTCCAGTTCTA     | ATGATGCCGAGGTGACTTTC      | 135              |
| IRGM      | AATGGGATGTCCACCTTCATC     | GGAGGCACATCTTTGGGTAG      | 102              |
| LAMP1     | TGTGGACAAGTACAACGTGAG     | CGTGTGTCCTTCTCTCATAG      | 97               |
| MAP1LC3A  | GCGCTACAAGGGTGAGAAG       | CCGGATGATCTTGACCAACTC     | 97               |
| MAP1LC3B  | GCAGCTTCTGTTCTGGATAA      | GAGCTGTAAGCGCCTTCTAAT     | 94               |
| NPC1      | GCAGTGCCTACCGAGTATTT      | GACACACCGAGGTTGAAGATAG    | 97               |
| RAB24     | GAGGGCTGCCAAATCTACTTAT    | ACGTAATCCTCTGCCACTTTC     | 188              |
| RGS19     | GGAGAACATGCTCTTCTGGTT     | GATGGATACGTAGTCCTCGTAGA   | 106              |
| ULK1      | GAGAAGCACGATTTGGAGGT      | GTACAGGGCCACGATGTTT       | 129              |
| WIP1      | CTGCTGGTTTGCCTAGAAGA      | GGATAGGCCAGGTAAGAATTGG    | 143              |
| IGF2BP2   | ACTACCCACTCCGATACTT       | CTGGGTTGGGATGAAGAGATT     | 114              |
| DHX9      | GGACGAATCTGGCTAAACTC      | GCAGCAGCAATGGTACAGATA     | 104              |
| HMGAI     | CGAAGTGCCAACACCTAAGA      | CCTGGAGTTGTGGTGGTTT       | 93               |
| HIF1A-AS2 | GATCTGTGGCTCAGTTCCTTT     | CACTATGAATCCCTGCACCTAC    | 129              |
| ACTB      | AGCACGGCATCGTCACCAACT     | TGGCTGGGGTGTGTAAGGTCT     | 179              |

qPZR analizi, çift iplikli DNA'ya bağlanabilen BrightGreen boyasını içeren qPZR mastermiks (BrightGreen 2X qPZR MasterMix – ROX, ABM, MasterMix-R) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 5 µl BrightGreen 2X qPZR MasterMiks, 5 pMol ileri primer, 5 pMol geri primer, 2 µl cDNA içeren ve nükleaz içermeyen su ile hacmi 10 µl'ye tamamlanmış reaksiyon karışımları oluşturulmuştur. Reaksiyon; enzim aktivasyonu (95°C'de 10 dakika), denatürasyon (95°C'de 15 saniye) ve bağlanma/uzama (60°C'de 60 saniye) basamaklarından oluşan PZR protokolü

uygulanarak 40 döngü olacak şekilde Gerçek zamanlı PZR Sistemi (Bio-Rad, CFX Connect)'nde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca melting curve (erime eğrisi) analizi için reaksiyon sonunda örnekler 95°C'de 10 saniye inkübe edilmiş, ardından sıcaklık 65°C'ye düşürülmüştür. Sonrasında, 5 saniyede bir gerçekleştirilen 0,5°C'lik artışlar ile sıcaklık 95°C'ye kademeli olarak yükseltilerek erime eğrisi grafikleri elde edilmiştir (Şekil 3.3). Analiz için her bir reaksiyona ait eşik döngü değerleri (Ct) kaydedilmiş ve ACTB referans geni ile normalizasyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Örnek erime eğrisi grafiği.

### 3.8. Western Blot Analizi

mRNA düzeyinde değişiklik gösteren ABCC1, HIF1A, BECN1 genlerinin protein düzeyindeki ekspresyon seviyeleri western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

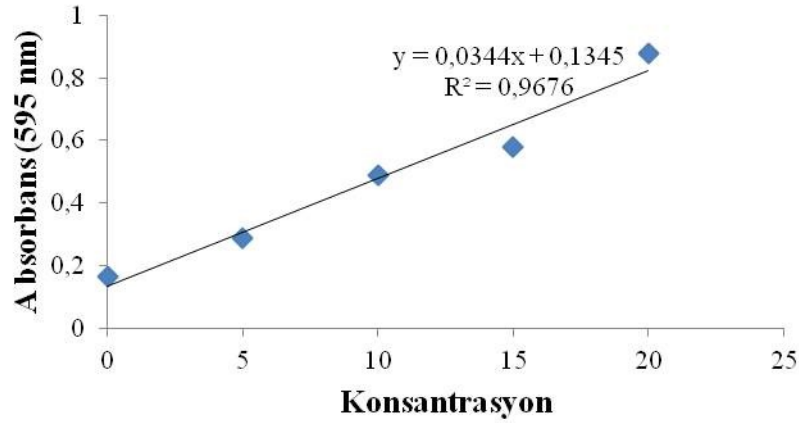
#### 3.8.1. Protein İzolasyonu

Western blot analizi için öncelikle 6-kuyucuklu plakalara ekilerek siRNA ile transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş, normoksik ve hipoksik ortamda 10 µM doksorubisin ile muamele edilmiş hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1 ml'sinde 10 µl proteaz inhibitör kokteyli (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X), Thermo Scientific, 78410) bulunan ve 10X RIPA solüsyonundan (RIPA Buffer (10X), Cell signaling, 9806) seyreltilerek oluşturulmuş 1X RIPA solüsyonu kullanılmıştır. Kuyucuklar soğuk DPBS ile yıkanmış ve her bir kuyucuğa 400 µl 1X RIPA solüsyonu eklenmiştir. Ardından, 6-kuyucuklu plakalar buz üzerinde 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda liziz olan hücreler ependorf tüplere aktarılmış ve 14000 g'de +4°C'de 10 dk santrifüj işlemi

gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonunda total proteinleri içeren süpernatant kısım ayrı endorf tüplere aktarılmış ve -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.8.2. Protein Miktarının Belirlenmesi

Total protein miktarları Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, P0834-10X1ML)’den 0 µg/30 µl, 5 µg/30 µl, 10 µg/30 µl, 15 µg/30 µl ve 20 µg/30 µl olacak şekilde BSA standartları hazırlanmıştır. Ölçümleri yapılacak protein örneklerinden 30 µl alınmış ve her bir standart ile örneklere 90 µl Bradford solüsyonu (Sigma-Aldrich, B6916) eklenerek tüm örnekler oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 595 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiştir. BSA standartlarının A<sub>595</sub> değerlerine göre oluşturulan eğri ile her bir örnekteki total protein miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. BSA standart eğrisi.

### 3.8.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jelin Hazırlanması

Proteinlerin yürütülmesi için 1 mm kalınlığında ve 10x10 cm büyüklüğünde camların arasında polimerize olan ayırma ve yığılma jelleri hazırlanmıştır. İlk olarak 3,1 ml su, 2,4 ml bis-akrilamit çözeltisi (%30'luk), 1,9 ml 4X ayırma jeli çözeltisi, 112 µl amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%10'luk) ve 5 µl TEMED'den oluşan ayırma jeli hazırlanmış ve jel kuyu diplerinden yaklaşık 1 cm aşağıya denk gelen yere kadar dökülmüştür. Ardından, jelin üst sınırının düzgün olması için hava ile temas eden yüzeyine bütanol eklenmiş ve jel donmaya bırakılmıştır. Ayırma jeli donduktan sonra bütanol uzaklaştırılmış ve üzerine 1 ml su, 300 µl bis-akrilamit çözeltisi (%30'luk), 444 µl 4X yığılma jeli çözeltisi, 50 µl APS çözeltisi (%10'luk) ve 5 µl TEMED'den oluşan yığılma jeli dökülmüştür. Yığılma jeli

döküldükten hemen sonra taraklar hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki cam arasına yerleştirilmiştir.

#### **3.8.4. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektrofrez**

Bradford yöntemi ile konsantrasyonları belirlenmiş olan protein örnekleri jele yüklenmeden önce yükleme tamponu ile muamele edilmiştir. Yükleme tamponu 7 ml 4X Tris-HCL, 3,6 ml gliserol, 1 gr SDS, 2 mg brom fenol mavisi, 400 µl β-mercapto-etanol kullanılarak toplam hacim su ile 10 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Protein örnekleri 5:1 oranında yükleme tamponu ile karıştırılmış ve 100°C'de 5 dk kaynatılmıştır. Tüm örnekler kuyulara 30 µg protein yüklenecek şekilde eşit hacimde hazırlanmıştır.

Elektrofrez işlemi için 6,005 gr Tris, 28,82 gr glisin, 20 ml %10'luk SDS çözeltisinin su ile 200 ml'ye tamamlanması ile oluşan 10X elektrofrez çözeltisi hazırlanmış ve bundan 1X yürütme çözeltisi yapılmıştır. Tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldıktan sonra kuyular enjektör yardımıyla 1X yürütme çözeltisi kullanılarak temizlenmiştir. Ardından örnekler ile protein markerı (Opti-Protein Marker, ABM, G252) kuyulara yüklenmiştir. Elektrofrez tankı 1X yürütme çözeltisi ile doldurulmuş ve yığınlama jelinde 50 V, ayırma jelinde 100 V olacak şekilde bromfenol mavisi jelin alt sınırına gelene kadar yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### **3.8.5. Proteinlerin Membrana Transferi ve Bloklama**

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jelin yığınlama kısmı kesilerek uzaklaştırılmış ve ayırma jeli büyüklüğünde PVDF membran (Porablot PVDF, MN, 741260) hazırlanmıştır. Bu esnada jel; 3,03 gr Tris, 14,41 gr glisin, 10 ml SDS çözeltisi (%10), 150 ml metanol kullanılarak toplam hacim su ile 250 ml olacak şekilde hazırlanmış transfer solüsyonu ile 30 dk boyunca çalkalayıcıda (Biosan) muamele edilmiştir. PVDF membran ise 15 sn süreyle metanol ile ıslatılmış, ardından transfer solüsyonu içerisinde 15 dk bekletilmiştir. Ardından Trans-Blot® Turbo™ Transfer sistemi (BioRad) kullanılarak proteinlerin PVDF membrana transferi gerçekleştirilmiştir. Bunun için membran ve jel ile aynı büyüklükte kesilmiş filtre kağıtları transfer solüsyonu ile ıslatılarak transfer kasetinin en altına yerleştirilmiş, üzerlerine önce membran ardından jel hava kabarcığı kalmayacak

şekilde konulmuştur. En üste tekrar ıslak filtre kağıtları yerleştirildikten sonra transfer kaseti kapatılmış ve 1,3 Amper 25 V'da 7 dk'da transfer yapılmıştır.

Transfer işleminin ardından bloklama gerçekleştirilmiştir. Bloklamada %5 süt tozu içeren TBST kullanılmıştır. TBST çözeltisi 2,42 gr Tris, 9 gr NaCl, 1 ml Tween 20 kullanılarak toplan hacmin su ile 1 lt'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Membranın bloklama çözeltisinde 1 saat boyunca inkübe edilmesiyle bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.8.6. Primer-Sekonder Antikor İşaretlemeleri ve Görüntüleme**

Bloklama işleminin ardından membran; TBST içerisinde 1:500 oranında seyreltilerek hazırlanmış anti-HIF-1 $\alpha$  (StJohn's Laboratory, STJ93498), anti-MRP1 (StJohn's Laboratory, STJ113716), anti-Becclin-1 (StJohn's Laboratory, STJ29492) veya anti-ACTB (Bioss Antibodies, BS-0061R) primer antikorları ile +4°C'de gece boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından membran 3 kez, 10 dk boyunca, çalkalayıcıda TBST ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından TBST içerisinde 1:10000 oranında seyreltilerek hazırlanmış sekonder antikor (Jackson Immuno Research, 211-035-109) ile oda sıcaklığında 2 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından membran TBST ile 3 kez 10 dk süreyle tekrar yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından membran, reaktifleri 1:1 oranında karıştırılan kemilüminesans solüsyonu (Bio-Rad, 1705061) ile 5 dk süresince muamele edilmiştir. Sürenin sonunda membran görüntüleme sistemine (Azure Biosystems, Bioanalytical Imaging System c 280) yerleştirilmiş ve elde edilen görüntüler kaydedilmiştir.

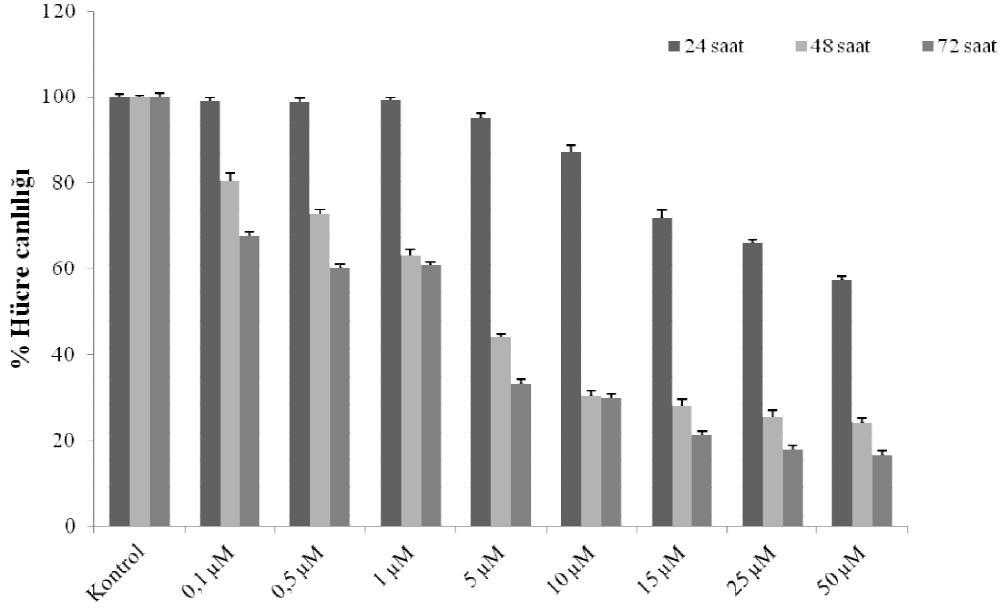
### **3.9. İstatistiksel analiz**

Gen ekspresyon sonuçlarının kantitatif analizi  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  metodu ile web tabanlı "RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis" programı kullanılarak yapılmıştır. Diğer analizlerde gruplar arasındaki karşılaştırma SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

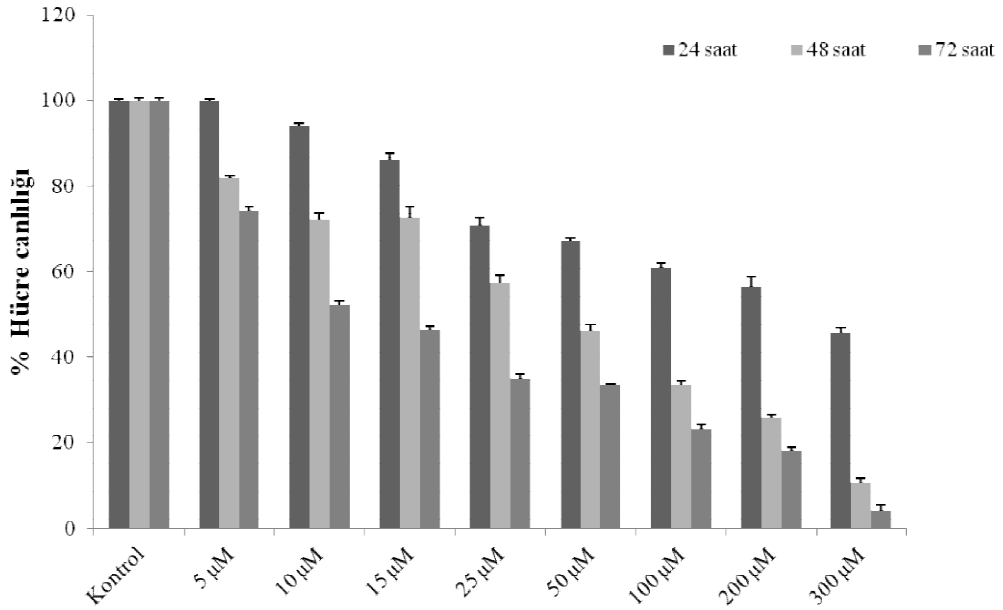
## 4. BULGULAR

### 4.1. H69 ve H69AR Hücrelerinin Karşılaştırılması

H69 ve H69AR hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat süresince doksorubisin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi XTT analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Doksorubisin'in 48 saat için IC<sub>50</sub> değeri H69 hücrelerinde 2,74 µM, H69AR hücrelerinde 50,72 µM olarak bulunmuştur.

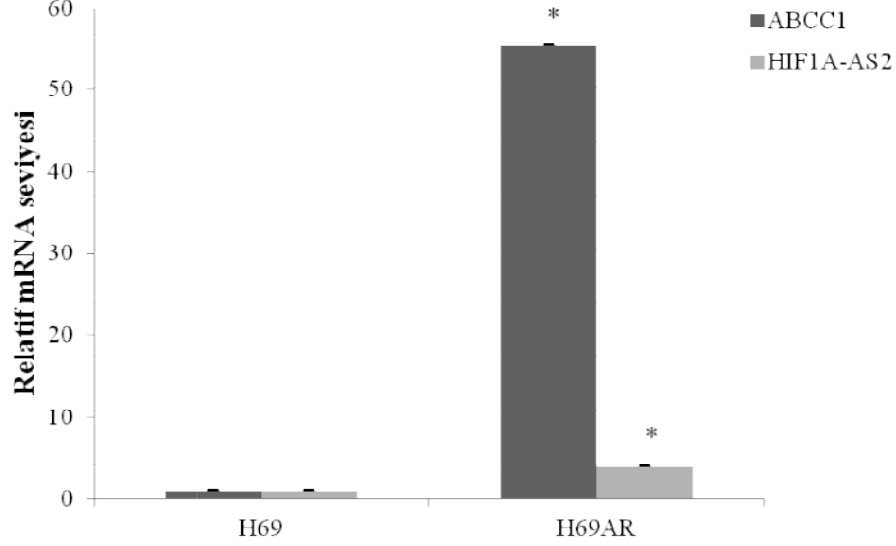


Şekil 4.1. Doksorubisin uygulamasının H69 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



Şekil 4.2. Doksorubisin uygulamasının H69AR hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

H69 ve H69AR hücreleri ABCC1 ve HIF1A-AS2 genlerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri bakımından karşılaştırılmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen qPZR analizi sonuçlarına göre H69AR hücrelerinde ABCC1 ve HIF1A-AS2 ifadesi H69 hücrelerine göre sırasıyla 55,33 ve 3,92 kat daha fazladır (Şekil 4.3).

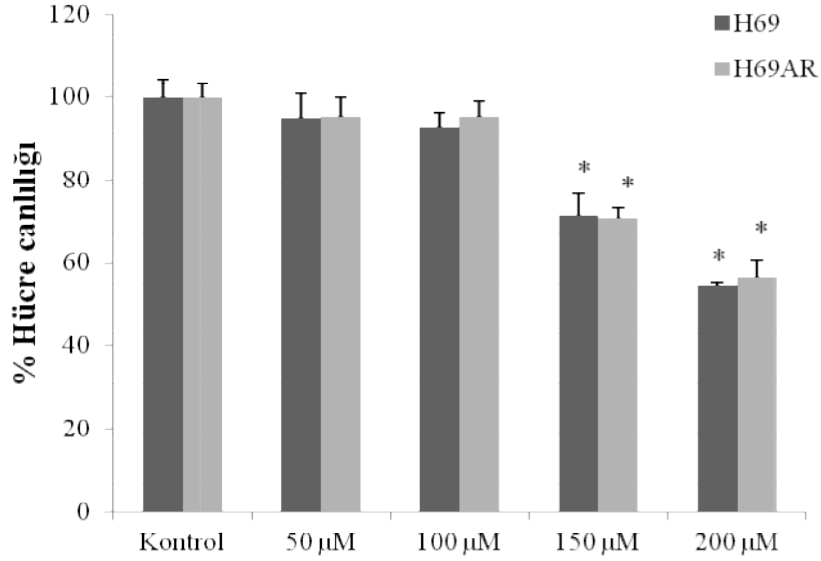


Şekil 4.3. H69 ve H69AR hücrelerinde ABCC1 ve HIF1A-AS2 mRNA seviyeleri, \*p<0,05.

#### 4.2. Hipoksik Ortamın Doğrulanması

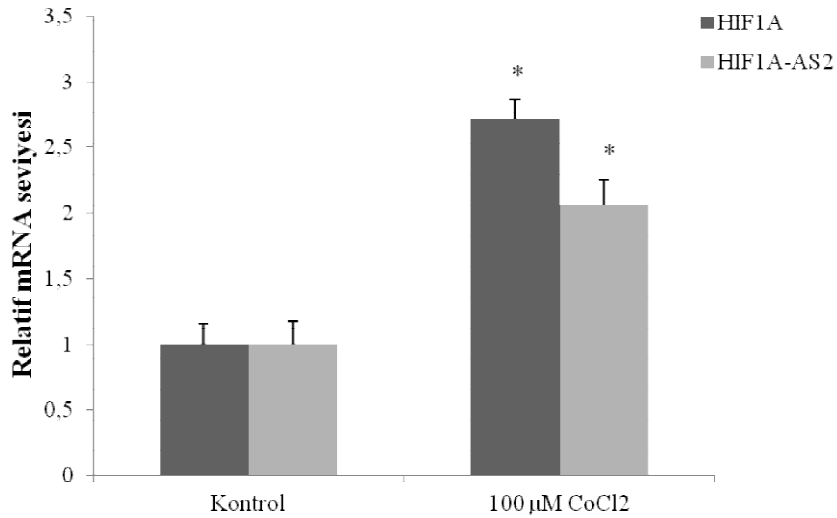
H69 ve H69AR hücrelerinde hipoksik ortamın oluşturulması için uygun CoCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik olarak hücreler 24 saat süresince 50, 100, 150 ve 200 µM CoCl<sub>2</sub> ile muamele edilmiştir.

XTT analizi sonuçlarına göre H69 hücrelerinde 24 saat süresince 50, 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarında CoCl<sub>2</sub> uygulaması sonrasında hücre canlılıkları sırasıyla %94,86, %92,74, %71,41 ve %54,58 olarak belirlenmiştir. H69AR hücrelerinde ise bu oranlar sırasıyla %95,19, %95,19, %70,96 ve %56,63 olarak bulunmuştur. Her iki hücre hattında da 50 ve 100 µM CoCl<sub>2</sub> uygulaması kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe sebep olmazken, 150 ve 200 µM CoCl<sub>2</sub> uygulamalarının hücreler üzerinde sitotoksik etkisi olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).



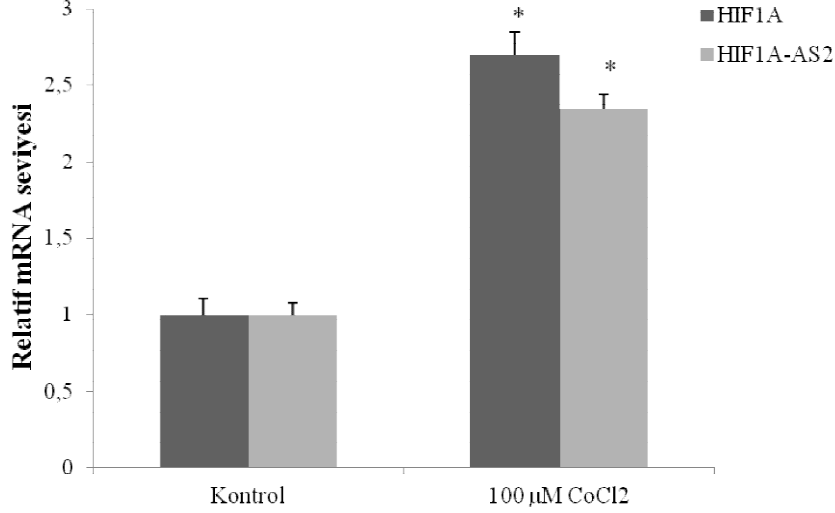
**Şekil 4.4.** 24 saat süresince 50, 100, 150 ve 200 µM CoCl<sub>2</sub> uygulamasının H69 ve H69AR hücre canlılıkları üzerine etkisi, \*p<0,05.

XTT analizi sonuçları göz önüne alındığında her iki hücre hattı için de toksik olmayan CoCl<sub>2</sub> dozunun hipoksik ortam oluşturmak için kullanılmasına karar verilmiştir. Bu nedenle hücreler 24 saat süresince 100 µM CoCl<sub>2</sub> ile muamele edilmiş ve hipoksik ortamın doğrulanması amacıyla hipoksinin önemli belirteçlerinden biri olan HIF1A'nın her iki hücre hattında da mRNA düzeyindeki ifadesi qPZR analizi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca HIF1A-AS2'nin hipoksi ile indüklendiği de aynı analiz ile doğrulanmıştır. qPZR analizi sonuçlarına göre, 24 saat süresince 100 µM CoCl<sub>2</sub> uygulaması sonrasında H69 hücrelerinde HIF1A ve HIF1A-AS2 mRNA seviyeleri kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 2,71 ve 2,06 kat daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** 24 saat süresince 100 µM CoCl<sub>2</sub> uygulamasının H69 hücrelerinde HIF1A ve HIF1A-AS2 mRNA seviyeleri üzerine etkisi, \*p<0,05.

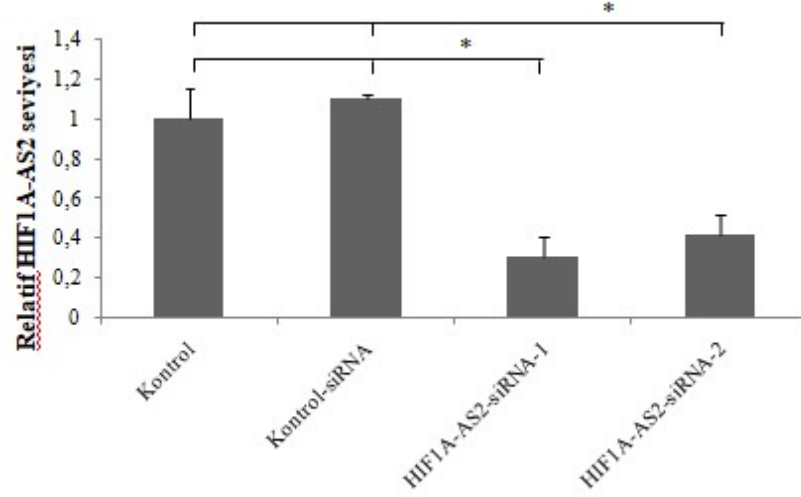
Benzer şekilde, 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  uygulaması sonrasında H69AR hücrelerinde HIF1A ve HIF1A-AS2 mRNA seviyeleri kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 2,69 ve 2,33 kat olacak şekilde anlamlı derecede artmıştır (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** 24 saat süresince 100  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  uygulamasının H69AR hücrelerinde HIF1A ve HIF1A-AS2 mRNA seviyeleri üzerine etkisi, \* $p < 0,05$ .

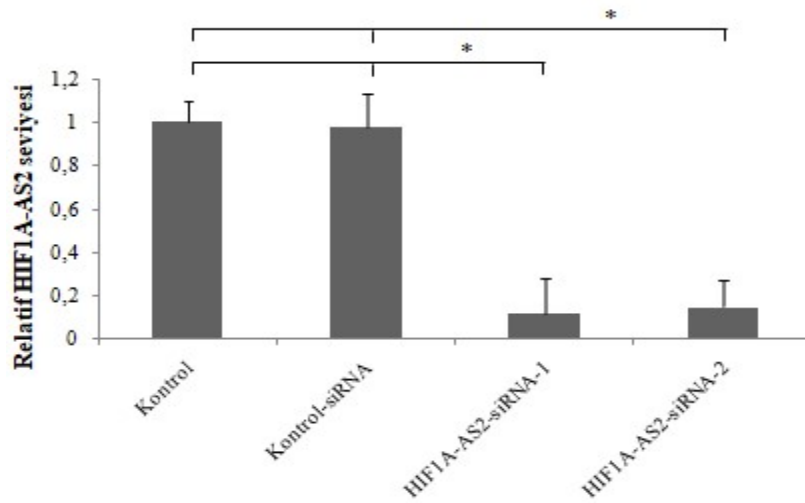
#### 4.3. siRNA Etkinliklerinin qPZR Analizi ile Belirlenmesi

H69 ve H69AR hücreleri HIF1A-AS2'in susturulmasına yönelik olarak 25 nM konsantrasyonlarında HIF1A-AS2'yi hedef alan iki siRNA (HIF1A-AS2-siRNA-1, HIF1A-AS2-siRNA-2) ve negatif kontrol olarak herhangi bir gen ile eşleşme yapmayan Kontrol-siRNA ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. siRNA'ların etkinlikleri qPZR analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; H69 hücrelerinde, Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında HIF1A-AS2 ifadesi HIF1A-AS2-siRNA-1 uygulaması sonrasında 3,59 kat, HIF1A-AS2-siRNA-2 uygulaması sonrasında ise 2,63 kat istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.7). Buna göre, Kontrol-siRNA uygulanan grup ile karşılaştırıldığında HIF1A-AS2 ifadesi HIF1A-AS2-siRNA-1 uygulaması ile %73,4 oranında, HIF1A-AS2-siRNA-2 uygulaması ile %66,7 oranında susturulmuştur. siRNA uygulaması yapılmayan kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldığında da HIF1A-AS2-siRNA-1 ve HIF1A-AS2-siRNA-2 uygulamalarının HIF1A-AS2 ifadesini anlamlı derecede azalttığı görülmüştür. Bununla birlikte Kontrol-siRNA uygulanmış grup ile kontrol grubu arasında HIF1A-AS2 ifadesi yönünden anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.



Şekil 4.7. H69 hücrelerinde siRNA uygulamalarının HIF1A-AS2 seviyesi üzerine etkisi, \*p<0,05.

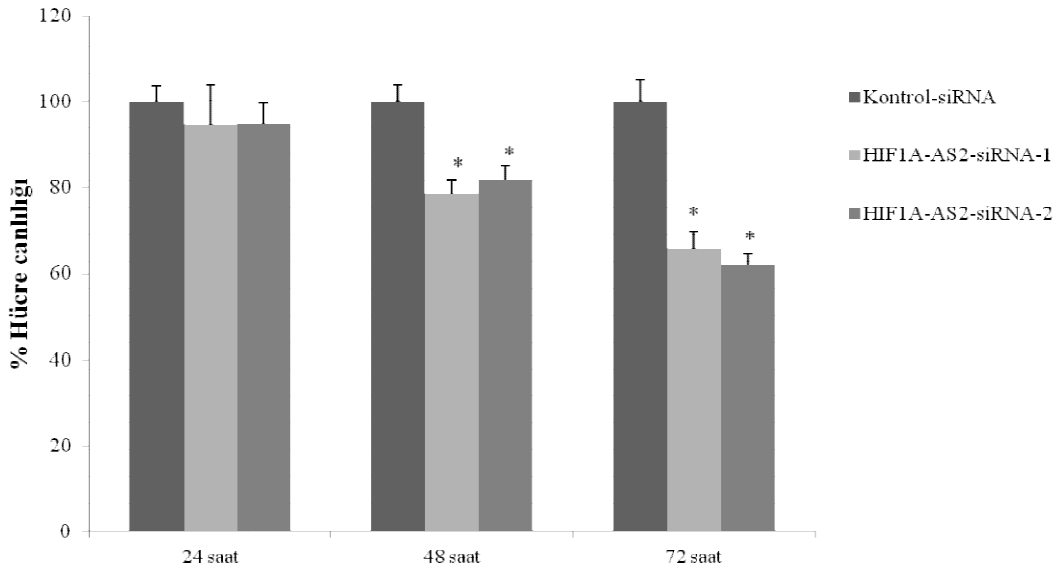
H69AR hücrelerinde ise HIF1A-AS2 ifadesi Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında HIF1A-AS2-siRNA-1 uygulaması sonrasında 8,25 kat, HIF1A-AS2-siRNA-2 uygulaması sonrasında ise 6,68 kat istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.8). Kontrol-siRNA uygulanan grup ile karşılaştırıldığında HIF1A-AS2 ifadesi HIF1A-AS2-siRNA-1 uygulaması ile %87,7 oranında, HIF1A-AS2-siRNA-2 uygulaması ile %84,9 oranında susturulmuştur. siRNA uygulaması yapılmayan kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında da HIF1A-AS2-siRNA-1 ve HIF1A-AS2-siRNA-2 uygulamaları ile HIF1A-AS2 ifadesi anlamlı derecede azalmıştır. Kontrol grubuna göre karşılaştırma yapıldığında Kontrol-siRNA uygulanmış grupta görülen HIF1A-AS2 ifadesindeki azalma ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.8. H69AR hücrelerinde siRNA uygulamalarının HIF1A-AS2 seviyesi üzerine etkisi, \*p<0,05.

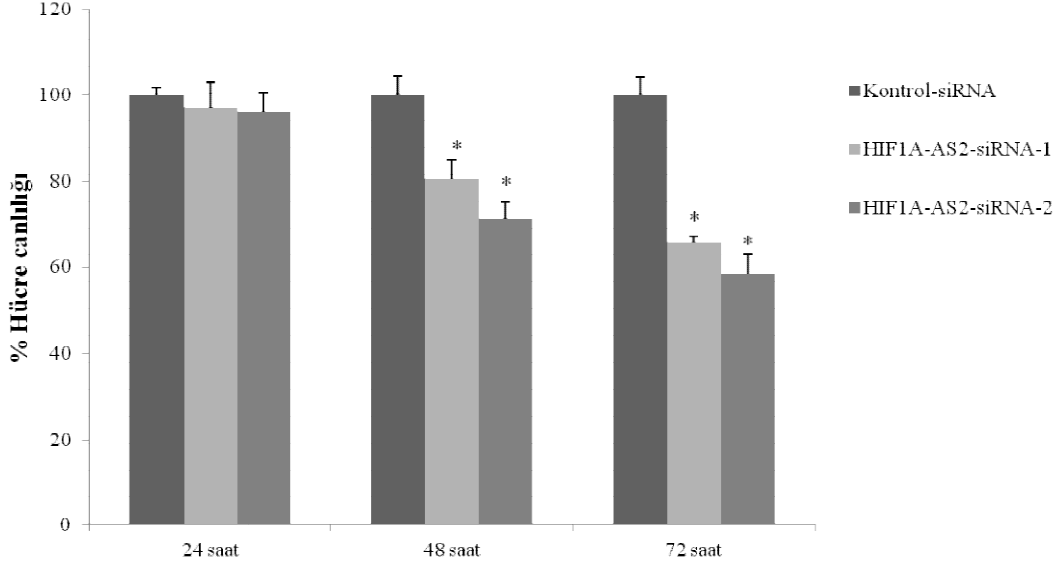
#### 4.4. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulmasının hücre canlılığı üzerine etkisi XTT analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; 24, 48 ve 72 saat süresince HIF1A-AS2-siRNA-1 uygulaması sonucunda H69 hücrelerinin canlılık oranları sırasıyla %94,81, %78,42 ve %65,74 olarak bulunmuştur. HIF1A-AS2-siRNA-2 uygulaması sonrasında ise bu oranlar sırasıyla %95,14, %81,86 ve %61,93 olarak belirlenmiştir. Kontrol-siRNA uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının 48 ve 72 saat süresince HIF1A-AS2-siRNA uygulamaları ile anlamlı şekilde azaldığı, 24 saat sonunda ise hücre canlılığında anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. HIF1A-AS2'nin susturulmasının H69 hücre canlılığı üzerine etkisi,\* p<0,05.

H69AR hücrelerinde ise 24, 48 ve 72 saat süresince HIF1A-AS2-siRNA-1 uygulaması sonrasında hücrelerinin canlılık oranları sırasıyla %97,19, %80,56 ve %65,14'dür. HIF1A-AS2-siRNA-2 uygulandığında ise bu oranlar sırasıyla %96,24, %71,5 ve %58,38 olarak belirlenmiştir. H69AR hücrelerinde de, Kontrol-siRNA uygulanmış grup ile karşılaştırıldığında 48 ve 72 saat süresince HIF1A-AS2-siRNA'ları varlığında hücre canlılığının anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiş, 24 saatlik uygulamanın ise hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür (Şekil 4.10).

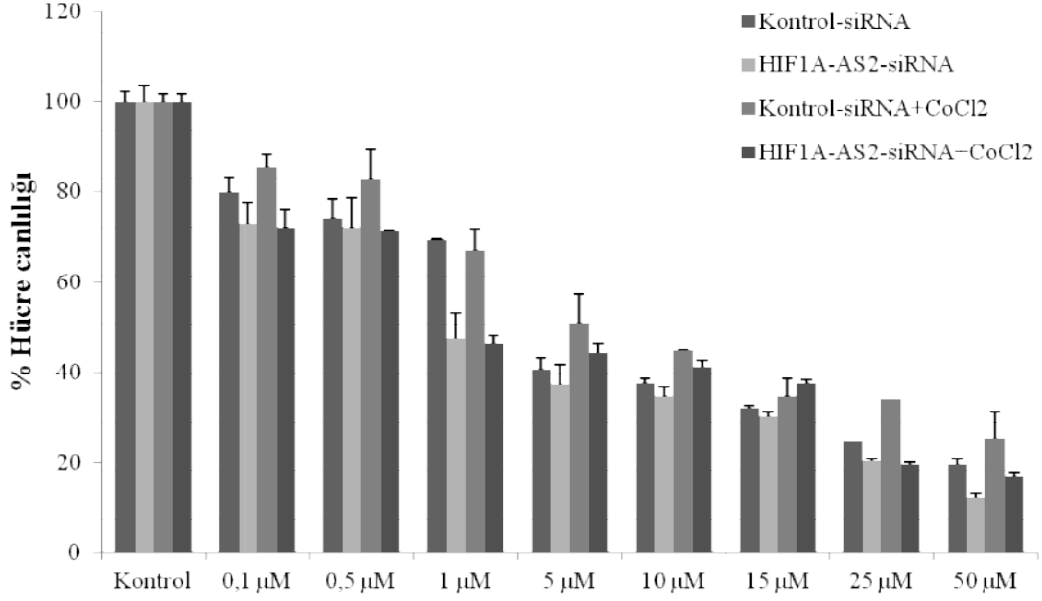


**Şekil 4.10.** HIF1A-AS2'nin susturulmasının H69AR hücre canlılığı üzerine etkisi, \*p<0,05.

Her iki hücre hattında da HIF1A-AS2'yi hedef alan siRNA'lar ile HIF1A-AS2'nin susturulması, Kontrol-siRNA uygulanan grup ile karşılaştırıldığında 24 saat için hücre canlılıklarında anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Ayrıca her iki siRNA'nın hücre canlılıkları üzerine etkileri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durumda, diğer analizlerde her iki hücre hattında da HIF1A-AS2'yi yüksek oranda susturan siRNA'nın (HIF1A-AS2-siRNA-1) kullanılmasına karar verilmiş ve H69 ile H69AR hücrelerine 24 saat süresince Kontrol-siRNA ve HIF1A-AS2-siRNA-1 uygulanmıştır. Sonrasında ise hücreler doksorubisin varlığında normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılmış ve analizler Kontrol-siRNA, HIF1A-AS2-siRNA, Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> ve HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> olmak üzere dört deney grubunda gerçekleştirilmiştir.

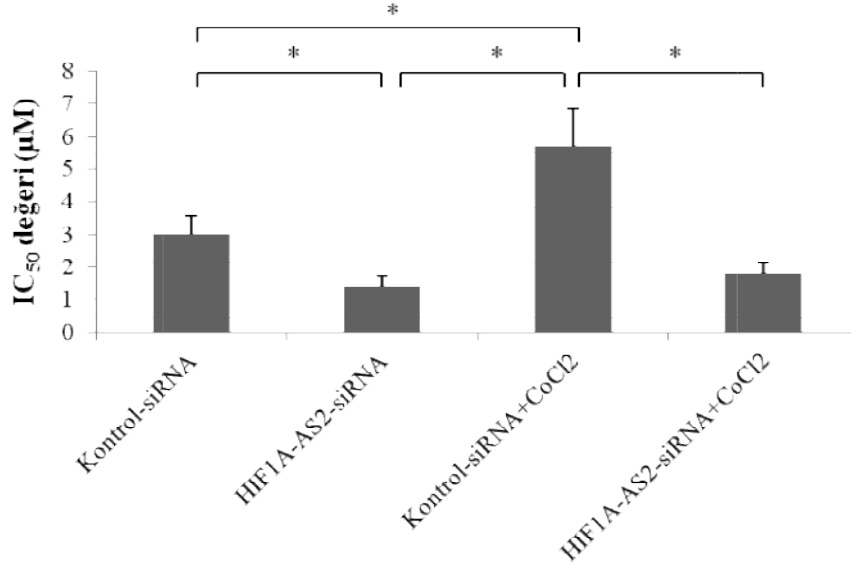
#### **4.5. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Normoksik ve Hipoksik Ortamda İlaç Cevabı Üzerine Etkisi**

HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamda doksorubisine verilen cevap üzerine etkisi XTT analizi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla Kontrol-siRNA ve HIF1A-AS2-siRNA uygulanan hücreler normoksik ve hipoksik ortamda 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda doksorubisin ile muamele edilmiştir. Bu uygulamanın H69 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.11.** Dokсорubisinin H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hücre canlılığı üzerine etkisi

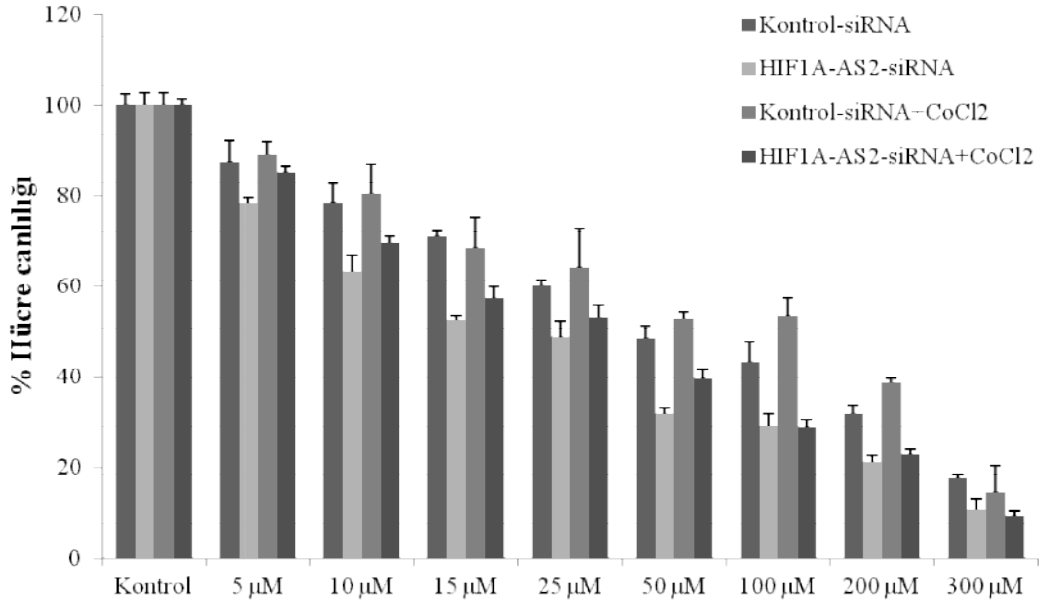
XTT analizinin ardından % hücre canlılığı verileri kullanılarak her deney grubunda dokсорubisinin 48 saat için  $IC_{50}$  değerleri hesaplanmıştır. Buna göre H69 hücreleri ile oluşturulan Kontrol-siRNA, HIF1A-AS2-siRNA, Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> ve HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney gruplarında dokсорubisinin  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 3,02 µM, 1,39 µM, 5,71 µM ve 1,81 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında dokсорubisinin 48 saat için  $IC_{50}$  değerleri, \* p<0,05.

Yapılan istatistiksel analize göre Kontrol-siRNA, HIF1A-AS2-siRNA ve Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney gruplarının IC<sub>50</sub> değerleri birbirlerine göre anlamlı derecede farklıdır. Bununla birlikte HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney grubu ile Kontrol-siRNA grubu arasında IC<sub>50</sub> değerleri bakımından anlamlı bir farklılık yoktur. Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> grubunun IC<sub>50</sub> değeri ile HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> grubunun IC<sub>50</sub> değeri arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.12).

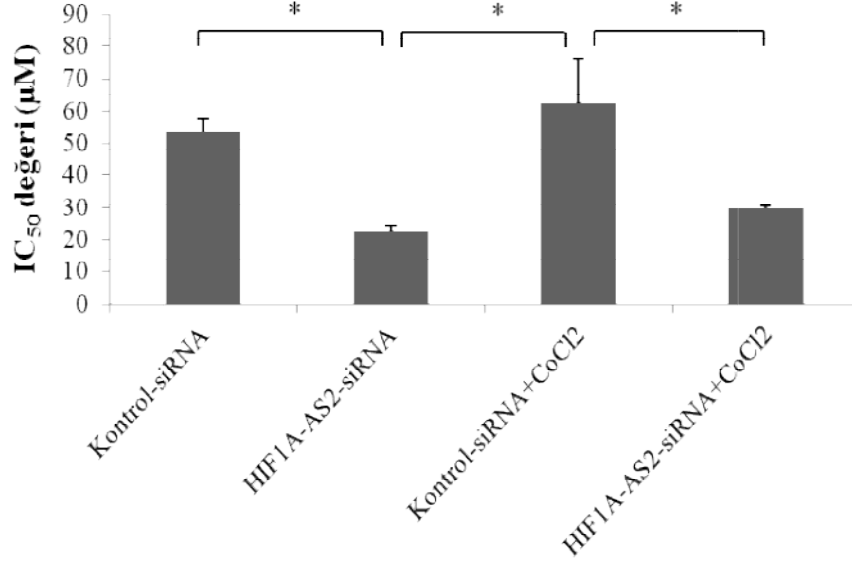
Aynı şekilde, Kontrol-siRNA ve HIF1A-AS2-siRNA uygulanan, hipoksik ve normoksik ortamda çoğaltılan H69AR hücrelerinde 48 saat süresince farklı konsantrasyonlarda doksorubisin uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Doksorubisin H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hücre canlılığı üzerine etkisi.

H69AR hücreleri ile oluşturulan Kontrol-siRNA, HIF1A-AS2-siRNA, Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> ve HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney gruplarında doksorubisin IC<sub>50</sub> değerleri ise sırasıyla 53,60 µM, 22,60 µM, 62,70 µM ve 29,89 µM olarak belirlenmiştir. Kontrol-siRNA deney grubu ile HIF1A-AS2-siRNA deney grubu ve Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney grubu ile HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney grubu arasında IC<sub>50</sub> değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır. Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> grubunun IC<sub>50</sub> değeri ile HIF1A-AS2-siRNA grubunun IC<sub>50</sub> değeri arasındaki farklılık da istatistiksel olarak anlamlıdır. Bununla birlikte Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> ve HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney gruplarının

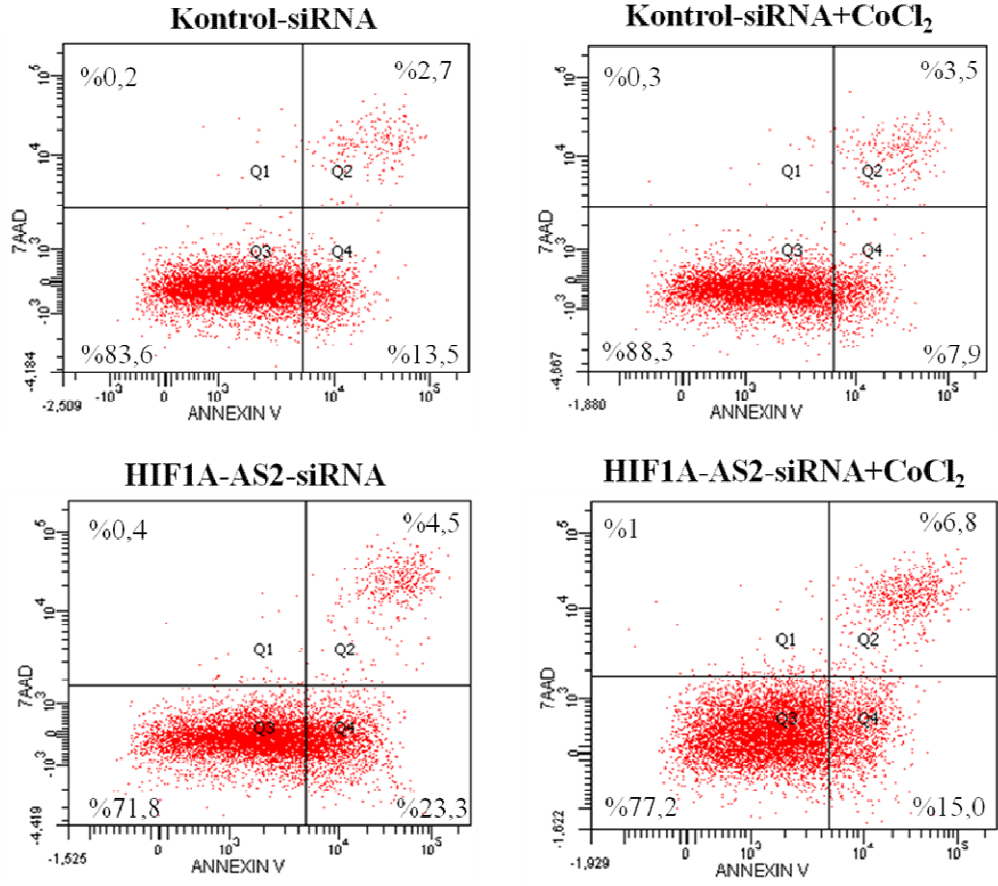
Kontrol-siRNA grubu ile aralarında IC<sub>50</sub> değerleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.14).



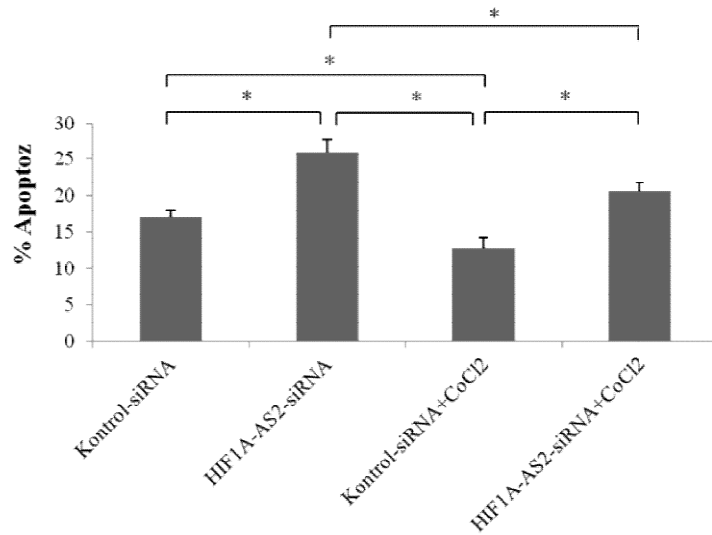
**Şekil 4.14.** H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında doksorubisinin 48 saat için IC<sub>50</sub> değerleri, \* p<0,05.

HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılan hücrelerde doksorubisine verilen cevap üzerine etkisi apoptoz analizi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla Kontrol-siRNA ve HIF1A-AS2-siRNA uygulanan H69 ve H69AR hücreleri normoksik ve hipoksik ortamda 24 saat süresince 10 µM doksorubisin ile muamele edilmiştir. Ardından FITC annexin V yöntemi ile gerçekleştirilen apoptoz analizi ile deney gruplarında canlı (annexin V-/7-AAD-), erken apoptoz (annexin V+/7-AAD-), geç apoptoz (annexin V+/7-AAD+) ve nekroz (annexin V-/7-AAD+) oranları belirlenmiştir. Akım sitometri ile gerçekleştirilen apoptoz analizi sonuçlarına göre H69 hücreleri ile oluşturulan Kontrol-siRNA, HIF1A-AS2-siRNA, Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> ve HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney gruplarında 24 saat süresince 10 µM doksorubisin uygulaması sonucunda ortalama apoptoz oranları sırasıyla %16,97, %25,93, %12,77 ve %20,53 olarak belirlenmiştir. Buna göre; HIF1A-AS2-siRNA uygulaması ile doksorubisinin apoptotik etkisi hipoksik ve normoksik ortamda kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Ayrıca hipoksik ortam doksorubisine bağlı olarak gelişen apoptoz oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.15).

a)



b)

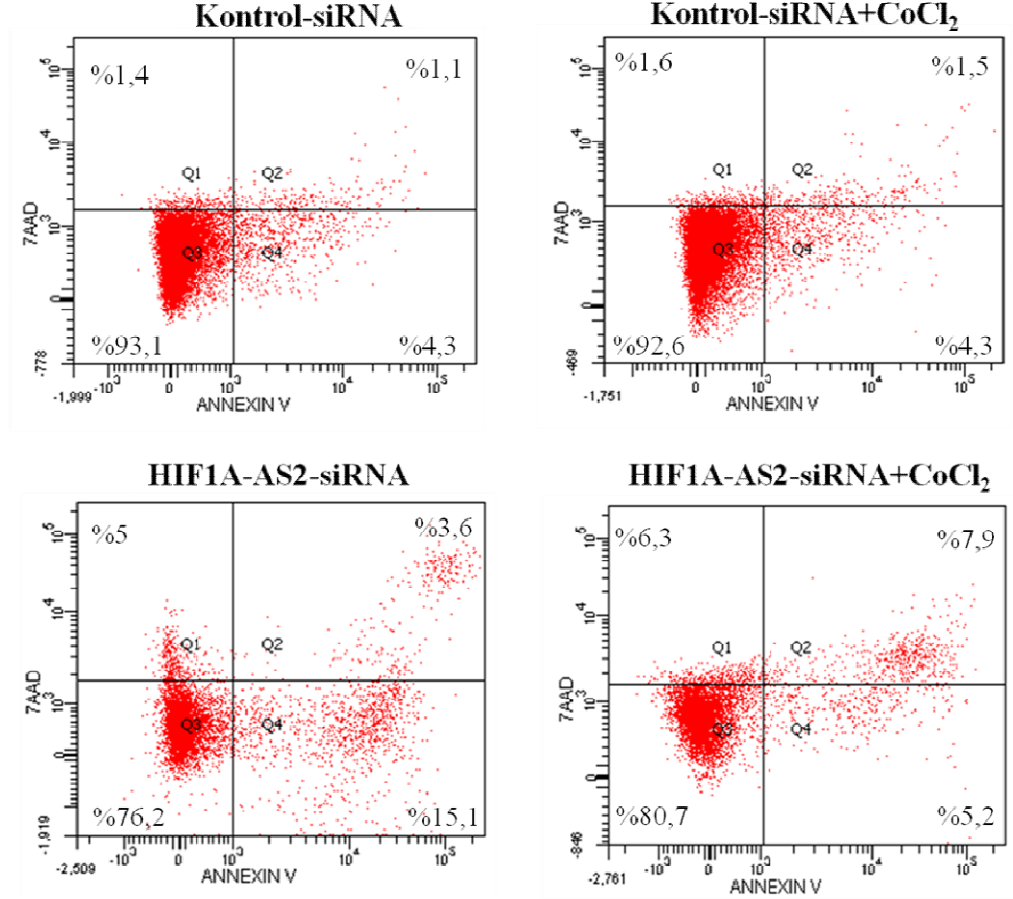


Şekil 4.15. H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında 24 saat süresinde 10 µM doksorubisin uygulamasının apoptoz üzerine etkisi a) akım sitometri sonuçları b) % apoptoz oranları, \* p<0,05.

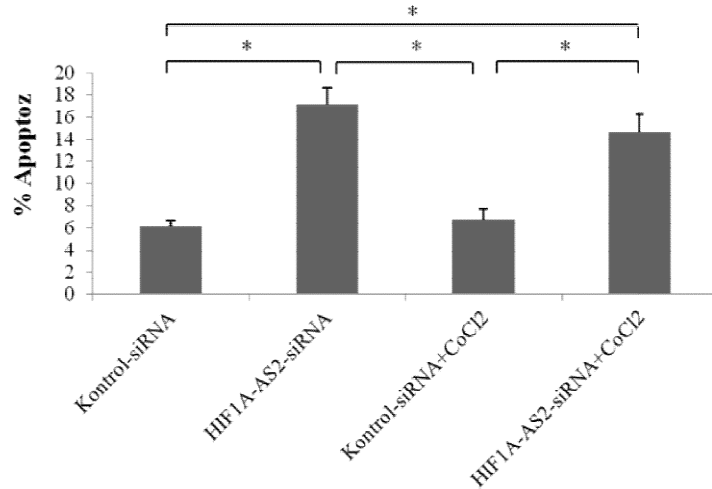
H69AR hücreleri ile oluşturulan Kontrol-siRNA, HIF1A-AS2-siRNA, Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> ve HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney gruplarına 24 saat süresince 10 µM doksorubisin uygulanması sonucunda ortalama apoptoz oranları ise sırasıyla %6,13, %17,13, %6,8 ve %14,6 olarak belirlenmiştir. H69AR hücrelerinde

de HIF1A-AS2-siRNA uygulaması hipoksik ve normoksik ortamda dokсорubisinin apoptotik etkisini kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır. Ancak, H69AR hücrelerinde hipoksik ortam dokсорubisinin apoptotik etkisinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 4.16).

a)



b)

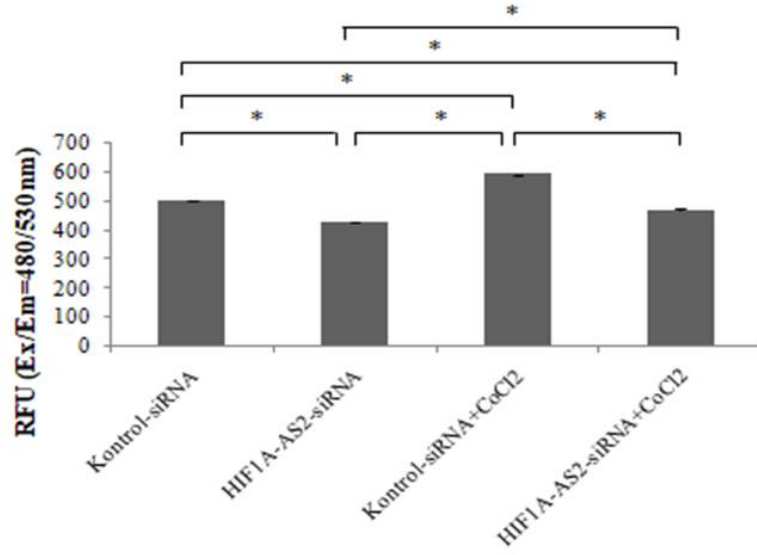


Şekil 4.16. H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında 24 saat süresinde 10 µM dokсорubisinin uygulamasının apoptoz üzerine etkisi a) akım sitometri sonuçları b) % apoptoz oranları, \* p<0,05.

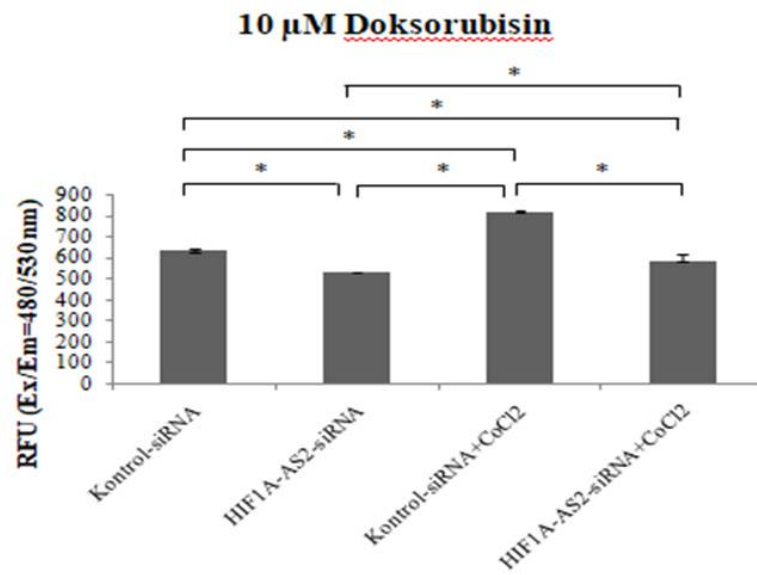
#### 4.6. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Normoksik ve Hipoksik Ortamda Otofaji Üzerine Etkisi

HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamda otofaji üzerine etkisi 10  $\mu$ M doksorubisin varlığında ve yokluğunda değerlendirilmiştir. Otofaji analizi sonuçlarına göre HIF1A-AS2'nin susturulmasına bağlı olarak normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılan H69 hücrelerinde 10  $\mu$ M doksorubisin varlığında ve yokluğunda otofaji istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. Ayrıca hücrelerin hipoksik ortamda bulunması otofajinin artmasına neden olmuştur (Şekil 4.17).

a)



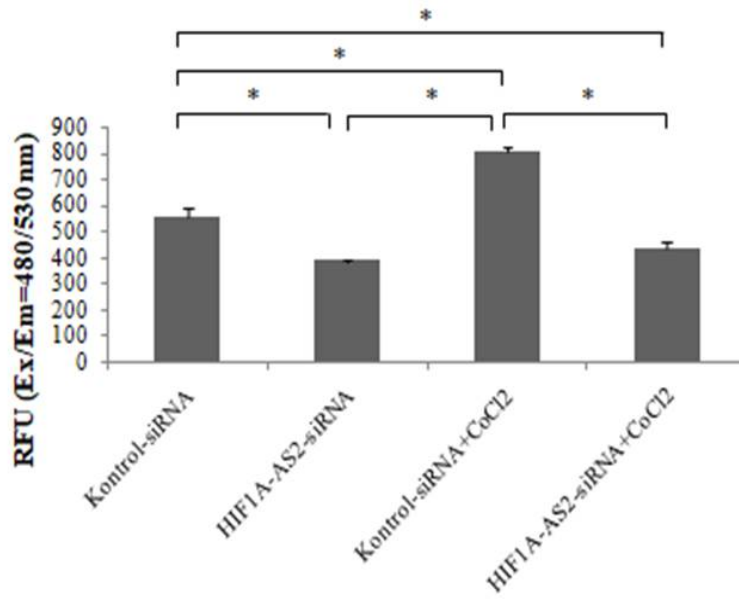
b)



Şekil 4.17. H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında doksorubisin a) yokluğunda ve b) varlığında otofaji miktarları, \* p<0,05.

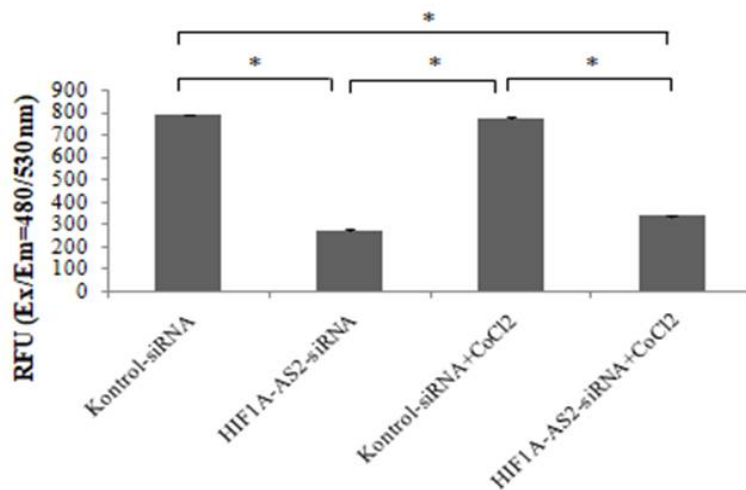
Benzer şekilde HIF1A-AS2'nin susturulması ile normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılan H69AR hücrelerinde 10  $\mu$ M doksorubisin varlığında ve yokluğunda otofaji istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. Ayrıca doksorubisin yokluğunda hipoksik ortam otofajinin artmasına neden olsa da doksorubisin varlığında Kontrol-siRNA ve Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> deney grupları arasında otofaji miktarları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.18).

a)



b)

**10  $\mu$ M Doksorubisin**



**Şekil 4.18.** H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında doksorubisin a) yokluğunda ve b) varlığında otofaji miktarları, \* p<0,05.

#### 4.7. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Normoksik ve Hipoksik Ortamda İlaç Direnci ve Otofaji ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

Kontrol-siRNA ve HIF1A-AS2-siRNA uygulamalarının ardından 10  $\mu$ M doksorubisin varlığında normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılan H69 ve H69AR hücrelerinde ilaç direnci ve otofaji ile ilişkili genlerin yanı sıra HIF1A-AS2 ile etkileşimde olduğu bilenen genlerin mRNA seviyelerinde gözlenen değişimler Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Buna göre, H69 hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması ABCC1, ABCC5, ARNT, ATM, FOS, GSTP1, HIF1A, MVP, TOP2A, TOP2B, XPA, AMBRA1, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG5, ATG7, ATG9A, ATG10, ATG12, BECN1, GABARAP, HDAC6, MAP1LC3A, MAP1LC3B, ULK1, IGF2BP2, DHX9 ve HMGA1 genlerinin ekspresyon seviyelerinde Kontrol-siRNA grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Hipoksik ortam ise H69 hücrelerinde Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ABCC1, ABCC5, ATM, FOS, GSTP1, HIF1A, MVP, MYC, TOP2A, TOP2B, XPA, AMBRA1, ATG4A, ATG4B, ATG4D, ATG7, ATG9A, ATG12, ATG16L1, ATG16L2, BECN1, GABARAP, GABARAPL1, HDAC6, LAMP1, ULK1, DHX9 ve HMGA1 genlerinin ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır. HIF1A-AS2'nin susturulduğu hipoksik ortamdaki hücrelerde ise Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ARNT, ATM, FOS, GSTP1, HIF1A, MVP, TOP2A, TOP2B, XPA, ATG9A, ATG10, ATG12, GABARAP, HDAC6, MAP1LC3B, DHX9 ve HMGA1 genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış; BAX ve ATG4B genlerinin ekspresyon seviyelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı artış belirlenmiştir. Ayrıca Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında; HIF1A-AS2 gen ekspresyonu, HIF1A-AS2-siRNA ve HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> gruplarında sırasıyla 3,23 ve 2,58 kat azalırken Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> grubunda 2,28 kat artmıştır (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.**H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler.

| Gen   | HIF1A-AS2-siRNA<br>Kat değişimi | Kontrol-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
|-------|---------------------------------|---|---|
| ABCB1 | 1,09±0,20; p=0,5048             | 1,01±0,09; p=0,9921                             | -1,09±0,27; p=0,5787                              |
| ABCC1 | <b>-2,23±0,26; p=0,0063</b>     | <b>1,82±0,05; p=0,0010</b>                      | -1,20±0,06; p=0,1487                              |
| ABCC2 | 1,06±0,14; p=0,5250             | -1,19±0,21; p=0,1842                            | -1,13±0,38; p=0,5682                              |
| ABCC3 | 1,17±0,37; p=0,3678             | 1,55±0,47; p=0,1194                             | 1,59±0,34; p=0,0563                               |
| ABCC5 | <b>-2,15±0,27; p=0,0034</b>     | <b>1,46±0,04; p=0,0036</b>                      | -1,04±0,03; p=0,5595                              |
| ABCG2 | -1,21±0,25; p=0,1264            | -1,18±0,34; p=0,3236                            | -1,20±0,35; p=0,2799                              |
| APC   | 1,02±0,22; p=0,8304             | 1,28±0,23; p=0,0991                             | 1,23±0,18; p=0,1015                               |

**Tablo 4.1.** H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler (devamı).

| Gen     | HIF1A-AS2-siRNA<br>Kat değişimi | Kontrol-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
|---------|---------------------------------|---|---|
| ARNT    | <b>-3,11±0,01; p=0,0011</b>     | 1,06±0,01; p=0,5236                             | <b>-1,48±0,13; p=0,0212</b>                       |
| ATM     | <b>-2,43±0,22; p=0,0002</b>     | <b>1,31±0,03; p=0,0011</b>                      | <b>-1,64±0,04; p=0,0003</b>                       |
| BAX     | 1,98±0,60; p=0,0912             | 1,10±0,39; p=0,5178                             | <b>1,23±0,08; p=0,0150</b>                        |
| BCL2    | 1,04±0,04; p=0,1588             | 1,16±0,17; p=0,1019                             | 1,08±0,09; p=0,1456                               |
| BLMH    | -1,16±0,16; p=0,1205            | 1,07±0,21; p=0,4990                             | 1,06±0,03; p=0,2500                               |
| BRCA1   | 1,11±0,13; p=0,2371             | 1,14±0,01; p=0,0791                             | 1,23±0,13; p=0,0896                               |
| BRCA2   | 1,08±0,14; p=0,2590             | 1,13±0,13; p=0,0907                             | 1,74±0,57; p=0,1154                               |
| CLPTM1L | 1,06±0,31; p=0,5806             | 1,03±0,19; p=0,6575                             | 1,11±0,12; p=0,1135                               |
| CYP1A1  | -1,05±0,21; p=0,6802            | -1,00±0,24; p=0,9365                            | -1,03±0,08; p=0,5767                              |
| CYP1A2  | -1,05±0,16; p=0,6942            | -1,11±0,24; p=0,5088                            | -1,31±0,16; p=0,1000                              |
| CYP2B6  | 1,06±0,29; p=0,6129             | -1,08±0,09; p=0,1902                            | -1,15±0,28; p=0,2981                              |
| CYP2C8  | -1,17±0,22; p=0,1437            | -1,09±0,46; p=0,7704                            | -1,32±0,27; p=0,0505                              |
| CYP2E1  | 1,03±0,26; p=0,7503             | 1,02±0,14; p=0,6999                             | -1,25±0,26; p=0,0944                              |
| CYP3A4  | -1,07±0,3; p=0,1161             | 1,06±0,12; p=0,3371                             | 1,19±0,22; p=0,1473                               |
| DHFR    | 1,12±0,27; p=0,4113             | 1,46±0,43; p=0,1310                             | 1,52±0,30; p=0,0502                               |
| EPHX1   | 1,06±0,15; p=0,5760             | 1,21±0,20; p=0,1433                             | 1,08±0,27; p=0,5673                               |
| ERCC3   | -1,14±0,23; p=0,2338            | -1,09±0,08; p=0,0905                            | 1,19±0,31; p=0,2401                               |
| FOS     | <b>-1,80±0,12; p=0,0037</b>     | <b>2,91±0,34; p=0,0085</b>                      | <b>-1,90±0,52; p=0,0266</b>                       |
| GSK3A   | 1,17±0,11; p=0,0967             | 1,17±0,20; p=0,1815                             | 1,26±0,02; p=0,0109                               |
| GSTP1   | <b>-2,50±0,12; p=0,0000</b>     | <b>1,58±0,05; p=0,0000</b>                      | <b>-2,28±0,11; p=0,0000</b>                       |
| HIF1A   | <b>-2,35±0,01; p=0,0000</b>     | <b>2,48±0,09; p=0,0001</b>                      | <b>-2,19±0,13; p=0,0001</b>                       |
| MSH2    | 1,18±0,17; p=0,1259             | -1,06±0,06; p=0,3269                            | 1,05±0,28; p=0,6752                               |
| MVP     | <b>-4,84±0,10; p=0,0002</b>     | <b>1,37±0,05; p=0,0065</b>                      | <b>-4,96±0,17; p=0,0002</b>                       |
| MYC     | 1,04±0,36; p=0,7052             | <b>1,41±0,03; p=0,0003</b>                      | 1,13±0,28; p=0,3460                               |
| RB1     | 1,05±0,21; p=0,6579             | 1,07±0,22; p=0,5725                             | 1,22±0,38; p=0,2985                               |
| SOD1    | 1,06±0,21; p=0,4888             | -1,03±0,10; p=0,5654                            | 1,13±0,15; p=0,1381                               |
| SULT1E1 | 1,18±0,23; p=0,1553             | -1,02±0,13; p=0,7097                            | -1,47±0,44; p=0,0737                              |
| TOP1    | -1,28±0,30; p=0,0985            | 1,06±0,15; p=0,3766                             | 1,03±0,16; p=0,6314                               |
| TOP2A   | <b>-1,44±0,21; p=0,0069</b>     | <b>1,42±0,06; p=0,0003</b>                      | <b>-1,92±0,19; p=0,0003</b>                       |
| TOP2B   | <b>-1,41±0,12; p=0,0082</b>     | <b>1,40±0,09; p=0,0044</b>                      | <b>-1,56±0,12; p=0,0032</b>                       |
| TP53    | 1,13±0,03; p=0,0864             | 1,19±0,16; p=0,1156                             | 1,82±0,51; p=0,0808                               |
| TPMT    | 1,19±0,31; p=0,2628             | -1,06±0,18; p=0,5442                            | -1,34±0,32; p=0,0835                              |
| UGCG    | 1,10±0,32; p=0,4674             | 1,03±0,26; p=0,7381                             | -1,22±0,24; p=0,1060                              |
| XPA     | <b>-1,91±0,06; p=0,0099</b>     | <b>1,39±0,10; p=0,0336</b>                      | <b>-1,97±0,10; p=0,0092</b>                       |
| XPC     | -1,06±0,02; p=0,5610            | -1,21±0,11; p=0,1664                            | -1,10±0,14; p=0,4449                              |
| AMBRA1  | <b>-2,37±0,18; p=0,0008</b>     | <b>1,19±0,05; p=0,0376</b>                      | 1,00±0,05; p=0,9898                               |
| ATG3    | -1,04±0,07; p=0,3022            | 1,07±0,04; p=0,0519                             | -1,04±0,23; p=0,7952                              |
| ATG4A   | -1,05±0,11; p=0,3956            | <b>3,13±0,02; p=0,0000</b>                      | -1,13±0,16; p=0,1159                              |
| ATG4B   | <b>-2,23±0,15; p=0,0000</b>     | <b>2,23±0,15; p=0,0008</b>                      | <b>1,51±0,07; p=0,0004</b>                        |
| ATG4C   | <b>-1,43±0,02; p=0,0014</b>     | 1,06±0,01; p=0,1780                             | 1,02±0,42; p=0,7852                               |
| ATG4D   | <b>-2,15±0,01; p=0,0002</b>     | <b>2,71±0,03; p=0,0000</b>                      | 1,11±0,23; p=0,3376                               |
| ATG5    | <b>-5,41±0,14; p=0,0036</b>     | -1,15±0,05; p=0,3432                            | -1,48±1,16; p=0,5166                              |
| ATG7    | <b>-2,42±0,1; p=0,0081</b>      | <b>1,43±0,01; p=0,0274</b>                      | 1,07±0,07; p=0,6923                               |
| ATG9A   | <b>-1,74±0,33; p=0,0085</b>     | <b>1,90±0,29; p=0,0149</b>                      | <b>-1,43±0,30; p=0,0353</b>                       |
| ATG9B   | -1,12±0,1; p=0,1083             | 1,09±0,01; p=0,1697                             | 1,62±0,59; p=0,1529                               |
| ATG10   | <b>-1,16±0,2; p=0,0244</b>      | 1,01±0,25; p=0,8700                             | <b>-1,26±0,12; p=0,0214</b>                       |
| ATG12   | <b>-1,28±0,23; p=0,0442</b>     | <b>1,31±0,06; p=0,0006</b>                      | <b>-1,38±0,01; p=0,0000</b>                       |
| ATG16L1 | -1,04±0,06; p=0,5950            | <b>5,56±0,26; p=0,0015</b>                      | -1,07±0,10; p=0,4735                              |

**Tablo 4.1.** H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler (devamı).

| Gen       | HIF1A-AS2-siRNA<br>Kat değişimi | Kontrol-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
|-----------|---------------------------------|---|---|
| ATG16L2   | -1,14±0,09; p=0,1096            | <b>1,72±0,05; p=0,0003</b>                      | 1,16±0,32; p=0,3362                               |
| BECN1     | <b>-1,74±0,14; p=0,0387</b>     | <b>2,63±0,13; p=0,0012</b>                      | 1,14±0,20; p=0,4894                               |
| DRAM1     | -1,19±0,46; p=0,5531            | -1,22±0,12; p=0,4105                            | -1,16±0,36; p=0,5552                              |
| GABARAP   | <b>-1,43±0,05; p=0,0008</b>     | <b>2,75±0,05; p=0,0000</b>                      | <b>-1,63±0,05; p=0,0002</b>                       |
| GABARAPL1 | 1,01±0,10; p=0,8871             | <b>1,31±0,11; p=0,0257</b>                      | 1,30±0,47; p=0,2541                               |
| GABARAPL2 | -1,06±0,26; p=0,6758            | -1,04±0,01; p=0,6296                            | -1,02±0,50; p=0,9538                              |
| HDAC6     | <b>-3,07±0,05; p=0,0116</b>     | <b>2,64±0,11; p=0,0011</b>                      | <b>-1,84±0,14; p=0,0410</b>                       |
| IRGM      | 1,34±0,58; p=0,2962             | -1,03±0,37; p=0,9344                            | -1,07±0,10; p=0,4735                              |
| LAMP1     | -1,44±0,31; p=0,0526            | <b>2,04±0,09; p=0,0004</b>                      | -1,13±0,01; p=0,1320                              |
| MAP1LC3A  | <b>-2,97±0,19; p=0,0019</b>     | 1,35±0,23; p=0,0833                             | -1,11±0,33; p=0,5684                              |
| MAP1LC3B  | <b>-1,44±0,22; p=0,0108</b>     | 1,18±0,22; p=0,1548                             | <b>-1,86±0,36; p=0,0058</b>                       |
| NPC1      | 1,02±0,15; p=0,6777             | -1,19±0,57; p=0,5288                            | 1,07±0,55; p=0,6456                               |
| RAB24     | 1,27±0,24; p=0,1905             | 1,16±0,17; p=0,3568                             | -1,02±0,04; p=0,7710                              |
| RGS19     | -1,05±0,01; p=0,5835            | -1,24±0,18; p=0,1353                            | -1,15±0,15; p=0,2606                              |
| ULK1      | <b>-3,17±0,20; p=0,0078</b>     | <b>2,85±0,02; p=0,0002</b>                      | 1,70±0,42; p=0,0867                               |
| WIP1      | -1,05±0,01; p=0,5546            | -1,25±0,18; p=0,1186                            | -1,17±0,13; p=0,1966                              |
| IGF2BP2   | <b>-1,33±0,02; p=0,0028</b>     | 1,01±0,10; p=0,8576                             | 1,51±0,37; p=0,0814                               |
| DHX9      | <b>-7,39±0,10; p=0,0000</b>     | <b>2,72±0,04; p=0,0000</b>                      | <b>-1,21±0,05; p=0,0005</b>                       |
| HMGA1     | <b>-6,43±0,11; p=0,0000</b>     | <b>1,26±0,03; p=0,0043</b>                      | <b>-1,19±0,01; p=0,0176</b>                       |
| HIF1A-AS2 | <b>-3,23±0,02; p=0,0000</b>     | <b>2,28±0,05; p=0,0000</b>                      | <b>-2,58±0,15; p=0,0002</b>                       |

H69AR hücrelerinde ise HIF1A-AS2'nin susturulması, Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ABCC1, ABCC5, ARNT, ATM, FOS, GSTP1, HIF1A, MVP, MYC, UGCG, XPA, AMBRA1, ATG3, ATG4A, ATG9A, ATG9B, ATG10, ATG12, BECN1, HDAC6, LAMP1, MAP1LC3A, MAP1LC3B, RAB24, RGS19, ULK1, DHX9 ve HMGA1 gen ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır. Hipoksik ortam Kontrol-siRNA grubu ile karşılaştırıldığında ATM, FOS, GSK3A, GSTP1, HIF1A, MYC, TOP2A, TOP2B, TP53, UGCG, XPA, AMBRA1, ATG3, ATG4C, ATG4D, ATG5, ATG9A, ATG12, BECN1, DRAM1, GABARAPL1, GABARAPL2, LAMP1, MAP1LC3B, RAB24, ULK1, IGF2BP2 DHX9 ve HMGA1 gen ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır. HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> grubunda ise Kontrol-siRNA grubuna göre ABCC1, ABCC2, ARNT, ATM, HIF1A, MVP, UGCG, ATG4D, ATG9A, ATG10, BECN1, HDAC6, LAMP1, MAP1LC3B, RAB24, ULK1, HMGA1 gen ekspresyonlarına azalma; MYC, TP53 ve IGF2BP2 gen ekspresyonlarında artış tespit edilmiştir. HIF1A-AS2 gen ekspresyonu ise Kontrol-siRNA grubuna göre HIF1A-AS2-siRNA ve HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> gruplarında sırasıyla 7,39 ve 5,26 kat azalırken, Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> grubunda 2,13 kat artmıştır (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler.

| Gen     | HIF1A-AS2-siRNA<br>Kat değişimi | Kontrol-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
|---------|---------------------------------|---|---|
| ABCB1   | -1,06±0,13; p=0,3073            | 1,02±0,05; p=0,3554                             | -1,09±0,16; p=0,2708                              |
| ABCC1   | <b>-1,60±0,03; p=0,0406</b>     | 1,19±0,05; p=0,2562                             | <b>-1,56±0,07; p=0,0467</b>                       |
| ABCC2   | 1,10±0,01; p=0,3135             | -1,27±0,25; p=0,1379                            | <b>-2,30±0,87; p=0,0482</b>                       |
| ABCC3   | -1,14±0,05; p=0,0841            | -1,05±0,28; p=0,7518                            | 1,19±0,21; p=0,1599                               |
| ABCC5   | <b>-1,48±0,07; p=0,0012</b>     | -1,04±0,19; p=0,7351                            | -1,28±0,49; p=0,2981                              |
| ABCG2   | -1,15±0,15; p=0,0991            | -1,04±0,01; p=0,2856                            | 1,09±0,20; p=0,3605                               |
| APC     | 1,16±0,65; p=0,5167             | 1,17±0,25; p=0,2809                             | 1,29±0,20; p=0,0894                               |
| ARNT    | <b>-1,63±0,10; p=0,0035</b>     | 1,02±0,10; p=0,8012                             | <b>-1,43±0,16; p=0,0149</b>                       |
| ATM     | <b>-1,49±0,15; p=0,0030</b>     | <b>1,38±0,07; p=0,0018</b>                      | <b>-1,27±0,15; p=0,0198</b>                       |
| BAX     | -1,16±0,54; p=0,6490            | 1,01±0,15; p=0,8077                             | -1,60±0,55; p=0,0777                              |
| BCL2    | 1,47±0,58; p=0,1985             | 1,26±0,30; p=0,1570                             | -1,06±0,59; p=0,9947                              |
| BLMH    | -1,22±0,11; p=0,0918            | 1,24±0,44; p=0,3195                             | -1,05±0,16; p=0,6689                              |
| BRCA1   | 1,77±0,61; p=0,1272             | -1,14±0,01; p=0,0668                            | -1,24±0,63; p=0,5537                              |
| BRCA2   | 1,10±0,29; p=0,4469             | -1,27±0,23; p=0,0596                            | -1,17±0,16; p=0,0888                              |
| CLPTM1L | -1,41±0,79; p=0,4590            | -1,53±0,15; p=0,1311                            | -1,08±0,21; p=0,6484                              |
| CYP1A1  | -1,27±0,26; p=0,0758            | 1,17±0,35; p=0,3115                             | 1,10±0,28; p=0,4107                               |
| CYP1A2  | 1,16±0,11; p=0,0600             | 1,29±0,22; p=0,0641                             | -1,01±0,01; p=0,8183                              |
| CYP2B6  | 1,20±0,47; p=0,3580             | 1,12±0,23; p=0,2963                             | 1,21±0,20; p=0,0989                               |
| CYP2C8  | 1,15±0,13; p=0,0728             | 1,08±0,13; p=0,3349                             | 1,06±0,11; p=0,2527                               |
| CYP2E1  | 1,38±0,78; p=0,3270             | 1,06±0,05; p=0,3285                             | 1,54±0,34; p=0,0611                               |
| CYP3A4  | -1,23±0,19; p=0,0528            | 1,13±0,17; p=0,1704                             | 1,08±0,06; p=0,0712                               |
| DHFR    | 1,13±0,11; p=0,0830             | -1,08±0,40; p=0,7591                            | -1,10±0,44; p=0,7144                              |
| EPHX1   | 1,03±0,46; p=0,7637             | -1,04±0,18; p=0,7087                            | 1,23±0,60; p=0,3875                               |
| ERCC3   | 1,97±0,52; p=0,0816             | -1,45±0,79; p=0,3940                            | 1,14±0,66; p=0,5917                               |
| FOS     | <b>-2,67±0,93; p=0,0360</b>     | <b>1,89±0,09; p=0,0023</b>                      | 1,05±0,02; p=0,7219                               |
| GSK3A   | 1,21±0,37; p=0,2696             | <b>2,17±0,1; p=0,0000</b>                       | 1,95±0,67; p=0,1192                               |
| GSTP1   | <b>-1,24±0,06; p=0,0090</b>     | <b>1,62±0,09; p=0,0009</b>                      | 1,11±0,10; p=0,1268                               |
| HIF1A   | <b>-2,45±0,15; p=0,0006</b>     | <b>2,23±0,20; p=0,0029</b>                      | <b>-2,39±0,07; p=0,0005</b>                       |
| MSH2    | -1,00±0,12; p=0,9825            | -1,07±0,25; p=0,5764                            | -1,15±0,35; p=0,4120                              |
| MVP     | <b>-1,91±0,39; p=0,0060</b>     | -1,14±0,25; p=0,2624                            | <b>-1,39±0,03; p=0,0003</b>                       |
| MYC     | <b>-1,23±0,02; p=0,0118</b>     | <b>4,00±0,30; p=0,0034</b>                      | <b>1,69±0,08; p=0,0006</b>                        |
| RB1     | 1,16±0,14; p=0,0722             | -1,06±0,35; p=0,8109                            | -1,11±0,41; p=0,6331                              |
| SOD1    | 1,02±0,01; p=0,8222             | -1,08±0,21; p=0,5177                            | 1,11±0,52; p=0,5676                               |
| SULT1E1 | -1,11±0,14; p=0,3894            | 1,07±0,25; p=0,6571                             | 1,34±0,44; p=0,2256                               |
| TOP1    | -1,01±0,07; p=0,7963            | 1,06±0,03; p=0,3091                             | 1,10±0,02; p=0,1111                               |
| TOP2A   | -1,13±0,21; p=0,2146            | <b>2,31±0,01; p=0,0000</b>                      | 1,01±0,24; p=0,8257                               |
| TOP2B   | 1,05±0,20; p=0,5169             | <b>2,80±0,04; p=0,0000</b>                      | 1,27±0,31; p=0,1506                               |
| TP53    | 1,49±0,22; p=0,1554             | <b>2,53±0,23; p=0,0136</b>                      | <b>1,68±0,05; p=0,0475</b>                        |
| TPMT    | -1,03±0,16; p=0,7354            | -1,17±0,01; p=0,2185                            | -1,00±0,05; p=0,9149                              |
| UGCG    | <b>-1,18±0,13; p=0,0309</b>     | <b>1,93±0,11; p=0,0003</b>                      | <b>-1,15±0,07; p=0,0086</b>                       |
| XPA     | <b>-1,77±0,09; p=0,0003</b>     | <b>2,13±0,17; p=0,0017</b>                      | 1,05±0,30; p=0,6709                               |
| XPC     | -1,08±0,11; p=0,6272            | -1,29±0,11; p=0,2949                            | -1,12±0,41; p=0,6605                              |
| AMBRA1  | <b>-1,09±0,03; p=0,0169</b>     | <b>2,08±0,13; p=0,0005</b>                      | 1,18±0,62; p=0,4566                               |
| ATG3    | <b>-1,72±0,02; p=0,0001</b>     | <b>2,61±0,17; p=0,0009</b>                      | 1,19±0,19; p=0,1194                               |
| ATG4A   | <b>-1,11±0,05; p=0,0000</b>     | 1,06±0,15; p=0,3713                             | 1,04±0,10; p=0,3901                               |
| ATG4B   | -1,04±0,01; p=0,3171            | 1,18±0,24; p=0,1866                             | -1,04±0,36; p=0,9051                              |
| ATG4C   | -1,10±0,05; p=0,4396            | <b>2,15±0,05; p=0,0009</b>                      | 1,69±0,64; p=0,1680                               |
| ATG4D   | -1,02±0,24; p=0,9136            | <b>1,76±0,26; p=0,0134</b>                      | <b>-1,24±0,17; p=0,0251</b>                       |

**Tablo 4.2.** H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler (devamı).

| Gen       | HIF1A-AS2-siRNA<br>Kat değişimi | Kontrol siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
|-----------|---------------------------------|---|---|
| ATG5      | -1,27±0,06; p=0,2842            | <b>4,71±0,34; p=0,0052</b>                      | 1,42±0,39; p=0,2405                               |
| ATG7      | 1,17±0,29; p=0,6618             | 1,10±0,14; p=0,8664                             | 1,32±0,45; p=0,4194                               |
| ATG9A     | <b>-1,38±0,04; p=0,0202</b>     | <b>2,28±0,05; p=0,0000</b>                      | <b>-1,74±0,04; p=0,0045</b>                       |
| ATG9B     | <b>-5,56±0,30; p=0,0043</b>     | 1,59±0,31; p=0,0714                             | -1,15±0,15; p=0,3820                              |
| ATG10     | <b>-1,45±0,25; p=0,0130</b>     | -1,08±0,30; p=0,7481                            | <b>-1,47±0,06; p=0,0000</b>                       |
| ATG12     | <b>-2,03±0,02; p=0,0000</b>     | <b>2,87±0,39; p=0,0135</b>                      | 1,69±0,51; p=0,0993                               |
| ATG16L1   | -1,31±0,30; p=0,2874            | -1,57±0,08; p=0,1076                            | -1,24±0,39; p=0,4159                              |
| ATG16L2   | 1,30±0,27; p=0,2120             | 1,47±0,29; p=0,1012                             | 1,14±0,28; p=0,5156                               |
| BECN1     | <b>-3,63±0,14; p=0,0004</b>     | <b>1,59±0,07; p=0,0021</b>                      | <b>-1,96±0,28; p=0,0054</b>                       |
| DRAM1     | -1,71±0,72; p=0,1124            | <b>1,49±0,07; p=0,0010</b>                      | 1,21±0,33; p=0,2491                               |
| GABARAP   | -1,18±0,39; p=0,4477            | 1,02±0,58; p=0,8184                             | -1,16±0,45; p=0,5693                              |
| GABARAPL1 | -1,75±0,77; p=0,1239            | <b>1,97±0,06; p=0,0001</b>                      | 1,07±0,60; p=0,6552                               |
| GABARAPL2 | 1,01±0,10; p=0,8244             | <b>5,22±0,24; p=0,0010</b>                      | -1,07±0,24; p=0,5728                              |
| HDAC6     | <b>-1,61±0,05; p=0,0002</b>     | 1,09±0,45; p=0,5793                             | <b>-3,34±0,60; p=0,0010</b>                       |
| IRGM      | -1,27±0,24; p=0,0683            | -1,03±0,15; p=0,7601                            | -1,01±0,29; p=0,9919                              |
| LAMP1     | <b>-1,35±0,10; p=0,0201</b>     | <b>1,46±0,01; p=0,0018</b>                      | <b>-1,26±0,10; p=0,0397</b>                       |
| MAP1LC3A  | <b>-2,03±0,07; p=0,0126</b>     | 1,17±0,06; p=0,8031                             | -1,20±0,04; p=0,4550                              |
| MAP1LC3B  | <b>-2,30±0,03; p=0,0000</b>     | <b>1,21±0,06; p=0,0094</b>                      | <b>-2,41±0,01; p=0,0000</b>                       |
| NPC1      | -1,12±0,12; p=0,3079            | -1,08±0,06; p=0,3866                            | -1,32±0,29; p=0,1229                              |
| RAB24     | <b>-1,26±0,05; p=0,0088</b>     | <b>1,40±0,02; p=0,0007</b>                      | <b>-1,37±0,08; p=0,0045</b>                       |
| RGS19     | <b>-1,56±0,01; p=0,0000</b>     | -1,00±0,25; p=0,9430                            | 1,01±0,29; p=0,8437                               |
| ULK1      | <b>-2,37±0,08; p=0,0131</b>     | <b>1,48±0,05; p=0,0300</b>                      | <b>-1,60±0,04; p=0,0482</b>                       |
| WIPI      | 1,26±0,10; p=0,1170             | -1,13±0,02; p=0,3424                            | -1,19±0,15; p=0,2424                              |
| IGF2BP2   | -1,05±0,31; p=0,8033            | <b>2,70±0,02; p=0,0000</b>                      | <b>1,31±0,05; p=0,0221</b>                        |
| DHX9      | <b>-1,48±0,14; p=0,0066</b>     | <b>2,08±0,12; p=0,0006</b>                      | -1,14±0,04; p=0,0779                              |
| HMGA1     | <b>-1,61±0,05; p=0,0000</b>     | <b>1,57±0,01; p=0,0000</b>                      | <b>-1,65±0,16; p=0,0008</b>                       |
| HIF1A-AS2 | <b>-7,39±0,12; p=0,0000</b>     | <b>2,13±0,09; p=0,0001</b>                      | <b>-5,26±0,05; p=0,0004</b>                       |

Hipoksik ortamda HIF1A-AS2'nin susturulmasının ilgili genlerin ekspresyonları üzerine etkisini göstermek amacıyla her iki hücre hattında Kontrol-siRNA+CoCl<sub>2</sub> grubuna göre HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> grubunda gen ekspresyonlarında gözlenen değişimler Tablo 4.3'te sunulmuştur.

**Tablo 4.3.** HIF1A-AS2'nin susturulmasının hipoksik ortamda hedef gen ekspresyonları üzerine etkisi.

| Gen   | H69   | H69AR   |
|-------|---|---|
|       | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
| ABCB1 | -1,10±0,27; p=0,4925                              | -1,11±0,16; p=0,1851                              |
| ABCC1 | <b>-2,17±0,06; p=0,0000</b>                       | <b>-1,86±0,04; p=0,0000</b>                       |
| ABCC2 | 1,06±0,38; p=0,7056                               | -1,81±0,87; p=0,1698                              |
| ABCC3 | 1,02±0,35; p=0,9734                               | 1,25±0,21; p=0,1868                               |
| ABCC5 | <b>-1,53±0,03; p=0,0000</b>                       | -1,24±0,49; p=0,4016                              |
| ABCG2 | -1,02±0,35; p=0,9356                              | 1,13±0,20; p=0,2163                               |
| APC   | -1,04±0,18; p=0,7214                              | 1,10±0,20; p=0,5105                               |
| ARNT  | <b>-1,58±0,13; p=0,0004</b>                       | <b>-1,46±0,16; p=0,0067</b>                       |
| ATM   | <b>-2,14±0,04; p=0,0000</b>                       | <b>-1,75±0,15; p=0,0007</b>                       |

**Tablo 4.3.**HIF1A-AS2'nin susturulmasının hipoksik ortamda hedef gen ekspresyonları üzerine etkisi (devamı).

| Gen     | H69   | H69AR   |
|---------|---|---|
|         | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
| BAX     | 1,12±0,08; p=0,6014                               | -1,62±0,56; p=0,0820                              |
| BCL2    | -1,08±0,09; p=0,3565                              | -1,33±0,60; p=0,3734                              |
| BLMH    | -1,01±0,03; p=0,8789                              | -1,29±0,17; p=0,2482                              |
| BRCA1   | 1,08±0,14; p=0,2315                               | -1,06±0,63; p=0,9473                              |
| BRCA2   | 1,53±0,58; p=0,1720                               | 1,08±0,17; p=0,5357                               |
| CLPTM1L | 1,08±0,12; p=0,4816                               | 1,41±0,21; p=0,3463                               |
| CYP1A1  | -1,03±0,09; p=0,7477                              | -1,06±0,29; p=0,7356                              |
| CYP1A2  | -1,19±0,17; p=0,2208                              | -1,30±0,01; p=0,0539                              |
| CYP2B6  | -1,07±0,28; p=0,6595                              | 1,08±0,20; p=0,5591                               |
| CYP2C8  | -1,21±0,28; p=0,4069                              | -1,01±0,11; p=0,8796                              |
| CYP2E1  | -1,28±0,26; p=0,0952                              | 1,45±0,34; p=0,0754                               |
| CYP3A4  | 1,12±0,22; p=0,3180                               | -1,04±0,06; p=0,5674                              |
| DHFR    | 1,04±0,30; p=0,9041                               | -1,02±0,44; p=0,9506                              |
| EPHX1   | -1,13±0,27; p=0,4323                              | 1,27±0,60; p=0,3564                               |
| ERCC3   | 1,30±0,31; p=0,1298                               | 1,66±0,67; p=0,3037                               |
| FOS     | <b>-5,52±0,53; p=0,0044</b>                       | <b>-1,80±0,02; p=0,0002</b>                       |
| GSK3A   | 1,08±0,02; p=0,4415                               | -1,11±0,68; p=0,8965                              |
| GSTP1   | <b>-3,61±0,11; p=0,0000</b>                       | <b>-1,46±0,10; p=0,0025</b>                       |
| HIF1A   | <b>-5,43±0,13; p=0,0000</b>                       | <b>-5,31±0,05; p=0,0005</b>                       |
| MSH2    | 1,11±0,29; p=0,4076                               | -1,08±0,36; p=0,7325                              |
| MVP     | <b>-6,77±0,17; p=0,0000</b>                       | -1,21±0,03; p=0,1445                              |
| MYC     | -1,25±0,29; p=0,1074                              | <b>-2,36±0,08; p=0,0088</b>                       |
| RB1     | 1,14±0,38; p=0,4757                               | -1,05±0,41; p=0,8429                              |
| SOD1    | 1,16±0,15; p=0,1283                               | 1,20±0,52; p=0,4139                               |
| SULT1E1 | -1,43±0,44; p=0,1088                              | 1,25±0,44; p=0,3185                               |
| TOP1    | -1,03±0,16; p=0,7456                              | 1,04±0,02; p=0,0762                               |
| TOP2A   | <b>-2,73±0,20; p=0,0000</b>                       | <b>-2,28±0,24; p=0,0001</b>                       |
| TOP2B   | <b>-2,19±0,12; p=0,0002</b>                       | <b>-2,21±0,31; p=0,0008</b>                       |
| TP53    | 1,54±0,51; p=0,1428                               | <b>-1,39±0,05; p=0,0354</b>                       |
| TPMT    | -1,27±0,32; p=0,1816                              | 1,16±0,05; p=0,3293                               |
| UGCG    | -1,25±0,25; p=0,1930                              | <b>-2,21±0,07; p=0,0002</b>                       |
| XPA     | <b>-2,73±0,10; p=0,0001</b>                       | <b>-2,03±0,30; p=0,0053</b>                       |
| XPC     | 1,10±0,15; p=0,2599                               | 1,15±0,42; p=0,4118                               |
| AMBRA1  | <b>-1,19±0,05; p=0,0046</b>                       | -1,77±0,62; p=0,0609                              |
| ATG3    | -1,11±0,24; p=0,3697                              | <b>-2,20±0,19; p=0,0022</b>                       |
| ATG4A   | <b>-3,54±0,16; p=0,0000</b>                       | -1,02±0,10; p=0,7685                              |
| ATG4B   | <b>-1,47±0,07; p=0,0067</b>                       | -1,23±0,36; p=0,3145                              |
| ATG4C   | -1,04±0,42; p=0,9542                              | -1,27±0,64; p=0,4943                              |
| ATG4D   | <b>-2,44±0,23; p=0,0001</b>                       | <b>-2,19±0,17; p=0,0072</b>                       |
| ATG5    | -1,29±1,15; p=0,8164                              | <b>-6,70±0,39; p=0,0034</b>                       |
| ATG7    | <b>-1,34±0,07; p=0,0003</b>                       | 1,21±0,45; p=0,3536                               |
| ATG9A   | <b>-2,72±0,30; p=0,0069</b>                       | <b>-3,96±0,04; p=0,0000</b>                       |
| ATG9B   | 1,48±0,59; p=0,1945                               | <b>-1,83±0,16; p=0,0226</b>                       |
| ATG10   | -1,27±0,12; p=0,1114                              | -1,36±0,07; p=0,4157                              |
| ATG12   | <b>-1,82±0,01; p=0,0000</b>                       | -1,69±0,57; p=0,1145                              |
| ATG16L1 | <b>-5,94±0,11; p=0,0014</b>                       | 1,27±0,39; p=0,2154                               |

**Tablo 4.3.** HIF1A-AS2'nin susturulmasının hipoksik ortamda hedef gen ekspresyonları üzerine etkisi (devamı).

| Gen       | H69   | H69AR   |
|-----------|---|---|
|           | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
| ATG16L2   | -1,48±0,32; p=0,0242                              | -1,29±0,29; p=0,1980                              |
| BECN1     | -2,31±0,20; p=0,0009                              | -3,11±0,28; p=0,0001                              |
| DRAM1     | 1,05±0,37; p=0,6912                               | -1,24±0,34; p=0,1882                              |
| GABARAP   | -4,48±0,05; p=0,0000                              | -1,18±0,46; p=0,5721                              |
| GABARAPL1 | -1,00±0,47; p=0,8864                              | -1,84±0,60; p=0,0376                              |
| GABARAPL2 | 1,01±0,50; p=0,8047                               | -5,60±0,24; p=0,0010                              |
| HDAC6     | -4,86±0,14; p=0,0000                              | -3,63±0,60; p=0,0194                              |
| IRGM      | -1,04±0,10; p=0,7445                              | 1,01±0,30; p=0,8667                               |
| LAMP1     | -2,31±0,01; p=0,0000                              | -1,84±0,10; p=0,0000                              |
| MAP1LC3A  | -1,50±0,34; p=0,0633                              | -1,40±0,04; p=0,0005                              |
| MAP1LC3B  | -2,20±0,37; p=0,0081                              | -2,92±0,01; p=0,0000                              |
| NPC1      | 1,27±0,56; p=0,4640                               | -1,22±0,29; p=0,1696                              |
| RAB24     | -1,19±0,04; p=0,0849                              | -1,92±0,08; p=0,0000                              |
| RGS19     | 1,08±0,16; p=0,4799                               | 1,01±0,30; p=0,9164                               |
| ULK1      | -1,68±0,42; p=0,0196                              | -2,36±0,05; p=0,0000                              |
| WIP1      | 1,07±0,14; p=0,5023                               | -1,06±0,15; p=0,4022                              |
| IGF2BP2   | 1,49±0,37; p=0,0860                               | -2,07±0,05; p=0,0000                              |
| DHX9      | -3,29±0,05; p=0,0000                              | -2,36±0,04; p=0,0002                              |
| HMGA1     | -1,51±0,04; p=0,0000                              | -2,58±0,17; p=0,0000                              |
| HIF1A-AS2 | -5,90±0,15; p=0,0000                              | -11,20±0,07; p=0,0000                             |

HIF1A-AS2'nin susturulduğu durumda normoksik ve hipoksik ortamın karşılaştırılması amacıyla her iki hücre hattında HIF1A-AS2-siRNA grubuna göre HIF1A-AS2-siRNA+CoCl<sub>2</sub> grubunda gen ekspresyonlarında gözlenen değişimler Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.4.** HIF1A-AS2'nin susturulduğu normoksik ortama göre hipoksik ortamda hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler.

| Gen     | H69   | H69AR   |
|---------|---|---|
|         | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
| ABCB1   | 1,32±0,16; p=0,1034                               | -1,02±0,16; p=0,8250                              |
| ABCC1   | 1,87±0,07; p=0,0018                               | 1,03±0,05; p=0,2906                               |
| ABCC2   | -1,06±0,53; p=0,9493                              | -2,53±0,88; p=0,0204                              |
| ABCC3   | -1,33±0,20; p=0,0700                              | 1,36±0,21; p=0,0346                               |
| ABCC5   | 2,06±0,04; p=0,0007                               | 1,16±0,49; p=0,4391                               |
| ABCG2   | -1,11±0,12; p=0,2212                              | 1,25±0,20; p=0,0973                               |
| APC     | 1,20±0,18; p=0,1864                               | -2,27±0,13; p=0,0841                              |
| ARNT    | 2,09±0,14; p=0,0006                               | 1,14±0,16; p=0,1599                               |
| ATM     | 1,48±0,04; p=0,0064                               | 1,18±0,15; p=0,1330                               |
| BAX     | -1,61±0,09; p=0,1559                              | -1,38±0,56; p=0,3600                              |
| BCL2    | 1,04±0,10; p=0,4002                               | -1,55±0,60; p=0,2639                              |
| BLMH    | 1,23±0,03; p=0,2607                               | 1,17±0,16; p=0,1257                               |
| BRCA1   | 1,11±0,14; p=0,2456                               | -2,18±0,63; p=0,1121                              |
| BRCA2   | 1,61±0,58; p=0,1482                               | -1,28±0,16; p=0,1491                              |
| CLPTM1L | 1,04±0,13; p=0,8427                               | 1,31±0,21; p=0,5847                               |

**Tablo 4.4.** HIF1A-AS2'nin susturulduğu normoksik ortama göre hipoksik ortamda hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler (devamı).

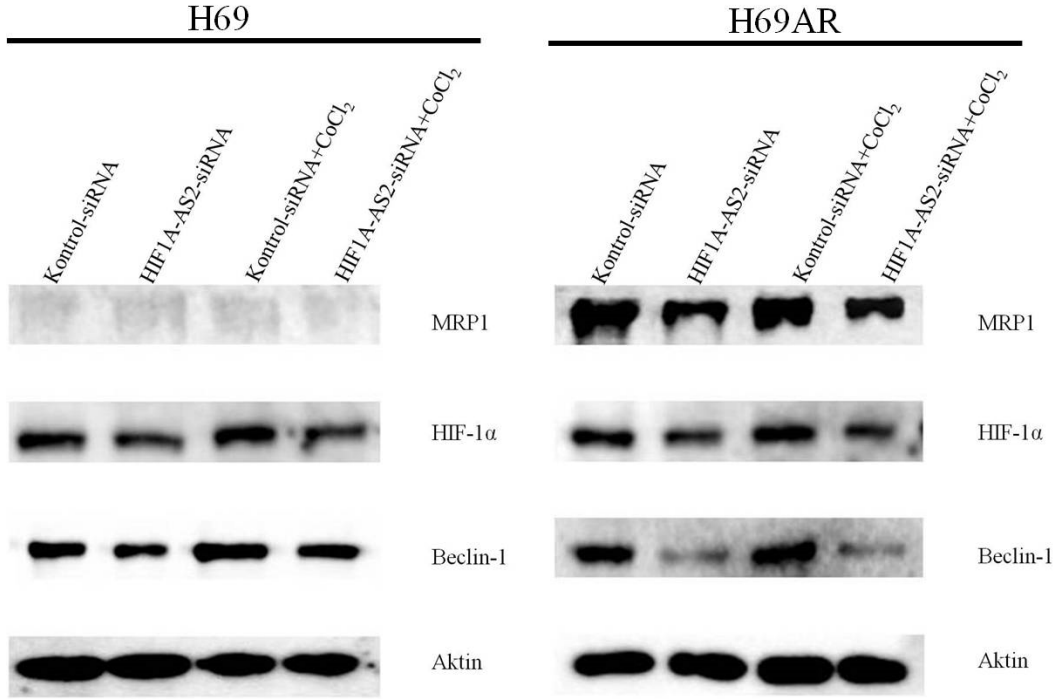
| Gen       | H69   | H69AR   |
|-----------|---|---|
|           | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
| CYP1A1    | 1,02±0,09; p=0,9051                               | 1,39±0,29; p=0,1054                               |
| CYP1A2    | -1,13±0,29; p=0,4469                              | -1,17±0,10; p=0,0538                              |
| CYP2B6    | -1,22±0,28; p=0,2921                              | 1,01±0,01; p=0,9341                               |
| CYP2C8    | -1,11±0,14; p=0,2689                              | -1,08±0,11; p=0,3149                              |
| CYP2E1    | -1,29±0,26; p=0,1670                              | 1,11±0,34; p=0,9237                               |
| CYP3A4    | -1,11±0,16; p=0,2885                              | <b>1,33±0,06; p=0,0179</b>                        |
| DHFR      | 1,09±0,12; p=0,2561                               | -1,24±0,44; p=0,3239                              |
| EPHX1     | 1,02±0,27; p=0,8504                               | 1,19±0,60; p=0,5507                               |
| ERCC3     | 1,36±0,31; p=0,1279                               | -1,73±0,67; p=0,1898                              |
| FOS       | -1,06±0,53; p=0,9493                              | <b>2,81±0,02; p=0,0151</b>                        |
| GSK3A     | 1,08±0,02; p=0,1781                               | 1,60±0,68; p=0,2173                               |
| GSTP1     | 1,09±0,12; p=0,2561                               | <b>1,38±0,10; p=0,0032</b>                        |
| HIF1A     | 1,07±0,14; p=0,2685                               | 1,03±0,07; p=0,7350                               |
| MSH2      | -1,13±0,29; p=0,4469                              | -1,15±0,36; p=0,4445                              |
| MVP       | -1,02±0,17; p=0,8010                              | 1,38±0,04; p=0,0959                               |
| MYC       | 1,08±0,28; p=0,7113                               | <b>2,08±0,08; p=0,0001</b>                        |
| RB1       | 1,07±0,14; p=0,2685                               | -1,29±0,41; p=0,2129                              |
| SOD1      | 1,06±0,16; p=0,6187                               | 1,09±0,52; p=0,5942                               |
| SULT1E1   | -1,02±0,17; p=0,8010                              | 1,48±0,44; p=0,1246                               |
| TOP1      | 1,32±0,16; p=0,1034                               | <b>1,12±0,02; p=0,0166</b>                        |
| TOP2A     | -1,33±0,20; p=0,0700                              | 1,15±0,24; p=0,3362                               |
| TOP2B     | -1,11±0,12; p=0,2213                              | 1,20±0,32; p=0,2825                               |
| TP53      | 1,08±0,02; p=0,1781                               | 1,13±0,05; p=0,2660                               |
| TPMT      | 1,08±0,29; p=0,7113                               | 1,02±0,05; p=0,7735                               |
| UGCG      | 1,06±0,16; p=0,6187                               | 1,03±0,08; p=0,6966                               |
| XPA       | -1,03±0,10; p=0,5580                              | <b>1,85±0,30; p=0,0180</b>                        |
| XPC       | -1,04±0,15; p=0,5776                              | -1,04±0,42; p=0,9586                              |
| AMBRA1    | <b>2,38±0,05; p=0,0001</b>                        | 1,28±0,62; p=0,3337                               |
| ATG3      | 1,01±0,24; p=0,8880                               | <b>2,03±0,20; p=0,0027</b>                        |
| ATG4A     | -1,08±0,16; p=0,3746                              | <b>1,15±0,10; p=0,0287</b>                        |
| ATG4B     | <b>3,36±0,07; p=0,0000</b>                        | -1,00±0,36; p=0,9111                              |
| ATG4C     | 1,47±0,42; p=0,1120                               | 1,87±0,65; p=0,1195                               |
| ATG4D     | <b>2,39±0,23; p=0,0030</b>                        | -1,22±0,17; p=0,1780                              |
| ATG5      | 3,65±1,15; p=0,0829                               | -1,12±0,40; p=0,5845                              |
| ATG7      | <b>2,58±0,07; p=0,0000</b>                        | 1,13±0,46; p=0,5584                               |
| ATG9A     | 1,21±0,31; p=0,3482                               | <b>-1,26±0,04; p=0,0005</b>                       |
| ATG9B     | 1,81±0,60; p=0,1101                               | <b>4,82±0,16; p=0,0002</b>                        |
| ATG10     | -1,08±0,13; p=0,1883                              | -1,01±0,07; p=0,8349                              |
| ATG12     | -1,08±0,01; p=0,4265                              | <b>3,45±0,52; p=0,0236</b>                        |
| ATG16L1   | -1,02±0,11; p=0,6564                              | 1,06±0,39; p=0,7571                               |
| ATG16L2   | 1,32±0,32; p=0,1231                               | -1,14±0,29; p=0,4541                              |
| BECN1     | <b>1,98±0,20; p=0,0042</b>                        | <b>1,85±0,28; p=0,0157</b>                        |
| DRAM1     | 1,02±0,37; p=0,9616                               | 2,06±0,34; p=0,0695                               |
| GABARAP   | <b>-1,14±0,05; p=0,0129</b>                       | 1,02±0,46; p=0,9181                               |
| GABARAPL1 | 1,28±0,47; p=0,2601                               | 1,87±0,60; p=0,1996                               |
| GABARAPL2 | 1,04±0,50; p=0,7721                               | -1,08±0,25; p=0,5243                              |
| HDAC6     | <b>1,67±0,14; p=0,0021</b>                        | <b>-2,07±0,60; p=0,0159</b>                       |

**Tablo 4.4.** HIF1A-AS2'nin susturulduğu normoksik ortama göre hipoksik ortamda hedef gen ekspresyonlarındaki değişimler (devamı).

| Gen       | H69   | H69AR   |
|-----------|---|---|
|           | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi | HIF1A-AS2-siRNA+CoCl <sub>2</sub><br>Kat değişimi |
| IRGM      | -1,43±0,10; p=0,2276                              | 1,25±0,29; p=0,2159                               |
| LAMP1     | 1,27±0,01; p=0,1167                               | 1,07±0,10; p=0,3203                               |
| MAP1LC3A  | <b>2,67±0,34; p=0,0098</b>                        | <b>1,69±0,04; p=0,0000</b>                        |
| MAP1LC3B  | -1,29±0,37; p=0,2130                              | <b>-1,05±0,01±; p=0,0348</b>                      |
| NPC1      | 1,04±0,56; p=0,7318                               | -1,18±0,30; p=0,2703                              |
| RAB24     | -1,31±0,05; p=0,0673                              | -1,09±0,09; p=0,1073                              |
| RGS19     | -1,10±0,16; p=0,2041                              | <b>1,57±0,29; p=0,0335</b>                        |
| ULK1      | 5,39±0,42; p=0,0080                               | <b>1,48±0,01; p=0,0001</b>                        |
| WIP1      | -1,11±0,13; p=0,1115                              | <b>-1,51±0,15; p=0,0040</b>                       |
| IGF2BP2   | <b>2,01±0,38; p=0,0261</b>                        | <b>1,37±0,01; p=0,0494</b>                        |
| DHX9      | <b>6,11±0,05; p=0,0000</b>                        | <b>1,30±0,04; p=0,0075</b>                        |
| HMGAI     | <b>5,39±0,07; p=0,0000</b>                        | -1,02±0,16; p=0,7756                              |
| HIF1A-AS2 | <b>1,25±0,15; p=0,0286</b>                        | <b>1,40±0,03; p=0,0011</b>                        |

#### 4.8. HIF1A-AS2'nin Susturulmasının Normoksik ve Hipoksik Ortamda MRP1, HIF-1 $\alpha$ ve Beclin-1 Proteinleri Üzerine Etkisi

HIF1A-AS2'nin susturulmasının 10  $\mu$ M doksorubisin uygulanmış, normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılan hücrelerde MRP1, HIF-1 $\alpha$  ve Beclin-1 proteinleri üzerine etkisi western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, her iki hücre hattında da, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında normoksik ve hipoksik ortamda HIF-1 $\alpha$  ve Beclin-1 protein seviyeleri azalmıştır, hipoksik ortam ise bu proteinlerin ifadesinde artışa yol açmıştır. Ayrıca, H69AR hücrelerinde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında HIF1A-AS2'nin susturulması normoksik ve hipoksik ortamda MRP1 protein seviyesini azaltmıştır. H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında ise MRP1 proteini western blot yöntemi ile görüntülenememiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. H69 ve H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında MRP1, HIF1- $\alpha$  ve Beclin-1 protein seviyeleri.

## 5. TARTIŞMA

Kemoterapi, erken ve ileri evre tümörlerin birinci basamak tedavisinde kullanılan bir yöntemdir. Ancak, ilaç direncinin kemoterapötik ajanların etkinliğini ciddi şekilde sınırlandırması, bu tedavi yönteminin uygulanmasının önünde büyük bir engel oluşturmaktadır. Kemoterapötik direnç; ilaç hedefinde değişiklik, sağ kalım yollarının aktivasyonu, hücre ölümünün inhibisyonu, ilaç metabolizmasında değişiklik gibi çeşitli mekanizmaların etkisinde gerçekleşen bir durumdur (Huang ve ark. 2020). Bu mekanizmalarda rol oynayan ve ilaç direncinde etkili olabilecek proteinler ile bunları kodlayan genlerin tespit edilmesini kapsayan çalışmalar literatürde geniş yer bulmaktadır. Bununla birlikte, genomik teknolojilerindeki son gelişmeler ile hücrede binlerce ncRNA molekülünün varlığının ortaya konmasının ardından gerçekleştirilen analizler, proteinlerin yanı sıra ncRNA'ların da kemoterapötik dirençte etkili olabileceklerini göstermektedir (Li ve ark. 2017; Jiang ve ark. 2020).

ncRNA'ların önemli bir sınıfını oluşturan lncRNA'lar; uzunlukları 200 nt ile 100 kb arasında değişen, protein kodlayan genlere göre ekspresyonları daha düşük ve genellikle dokuya spesifik olan, ORF'den yoksun transkriptlerdir (Bhat ve ark. 2016). lncRNA'lar; transkripsiyon, splicing, epigenetik gibi pek çok mekanizmada düzenleyici role sahiptir; buna bağlı olarak hücre döngüsü, hücre farklılaşması, gelişim ve pluripotensi gibi önemli biyolojik süreçler ile karsinogenez gibi çeşitli patolojik süreçlerde etkilidir (Huarte 2015; Liu ve ark. 2020). Son yıllarda ise kanserde ilaç direncinde etkili olan yeni bir faktör olarak tanımlanmaları ile çok sayıda lncRNA'nın çeşitli kanser türlerinde ilaç direnci ile ilişkisi ortaya konmuştur. Örneğin; mide kanserinde çoklu ilaç direncinde MRUL (Wang ve ark. 2014) ve PVT1 (Zhang ve ark. 2015); pankreas kanserinde gemsitabin direncinde HOTTIP (Li ve ark. 2015); meme kanserinde tamoksifen direncinde HOTAIR (Xue ve ark. 2016); mesane kanserinde sisplatin direncinde UCA1 (Pan ve ark. 2016); hepatosellüler karsinomada doksorubisin direncinde H19 (Schultheiss ve ark. 2017) lncRNA'larının etkili oldukları gösterilmiştir. Bu lncRNA'ların mekanizmaları ve hedef genleri iyi bir şekilde tanımlanmış olsa da çok sayıda lncRNA'nın ilaç direncindeki etki mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasında da hipoksi ile indüklendiği bilinen bir lncRNA olan HIF1A-AS2'nin normoksik ve

hipoksik koşullarda KHAK hücrelerinde otofaji üzerinden kemoterapötik dirençteki olası etkisinin açığa çıkartılması amaçlanmıştır.

HIF1A geninin 3' bölgesinden köken alan ve HIF1A mRNA'sının 3' UTR bölgesine bağlanabilen HIF1A-AS2, HIF1A'nın bir antisens transkriptidir (Chen ve ark. 2017). Yapılan literatür taraması, HIF1A-AS2'nin diğer lncRNA'lar gibi çeşitli biyolojik ve patolojik süreçleri içerisine alan geniş bir yelpazede etkili olabildiğini göstermektedir. Biyolojik süreçteki rolüne dair bir çalışma Wu ve ark. (2018) tarafından gerçekleştirilmiş, HIF1A-AS2'nin IL6'yı baskılayan miR-665'in süngeri olarak görev yaptığı ve PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu aracılığıyla osteojenik farklılaşmada rol oynadığı belirtilmiştir. Koroner arter hastalığı için lncRNA'ların biyobelirteç olarak potansiyellerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise HIF1A-AS2'nin yeni bir biyobelirteç olarak düşünölebileceğinin belirtilmesi, HIF1A-AS2'nin çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynayabileceğini göstermektedir (Zhang ve ark. 2019). Benzer şekilde HIF1A-AS2'nin preeklampsi için yeni bir prognostik belirteç olabileceğinin belirtildiği bir diğer çalışma da HIF1A-AS2'nin hastalıkların patogeneğinde etkili olabileceğini destekler niteliktedir (Wu ve ark. 2019). Çeşitli tümör dokuları ve kanser hücreleri ile gerçekleştirilen çok sayıda çalışma HIF1A-AS2'nin kanser patogeneğinde de rol oynadığını göstermektedir. Örneğin; HIF1A-AS2'nin mide kanseri tümör dokularında yüksek oranda ifade edildiği, HIF1A-AS2'nin susturulmasının hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Chen ve ark. 2015). Benzer şekilde HIF1A-AS2'nin mesane kanseri dokularında da yüksek oranda eksprese edildiği, HIF1A-AS2'nin ekspresyon düzeyi ile ileri patolojik evre arasında pozitif bir ilişkinin olduğu ortaya konmuştur. HIF1A-AS2'nin susturulmasının mesane kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiği, apoptozu ise indüklediği belirtilmiştir (Chen ve ark. 2016). Kolorektal kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada HIF1A-AS2'nin miR-129-5p'i baskılayarak DNMT3A ekspresyonundaki artış ile birlikte hücre proliferasyonu, hücre invazyonu ve EMT oluşumunu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Lin ve ark. 2018). Wang ve ark. (2019) üçlü negatif meme kanseri dokularında HIF1A-AS2 ekspresyonunun normal dokulara göre daha yüksek olduğunu, HIF1A-AS2'nin yüksek ekspresyonunun üçlü negatif meme kanseri hastalarında lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve kötü histolojik evre ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Araştırmacılar, HIF1A-AS2'nin susturulmasının hücre

migrasyon ve invazyonunu azalttığını ortaya koymuştur. Osteosarkom hücrelerinde de HIF1A-AS2'nin aşırı ekspresyonunun miR-129-5p'nin baskılanması aracılığıyla hücre proliferasyonunu, hücre döngüsünün ilerlemesini ve invazyonu artırdığı belirtilmiştir (Wang ve ark. 2019). Osteosarkom hücreleri ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada HIF1A-AS2'nin miR-33b-5p süngeri olarak görev yaptığı; HIF1A-AS2, miR-33b-5p ve miR-33b-5p'in hedefi olan SIRT6 etkileşiminin hücre sağ kalımı ve migrasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (Lin ve ark. 2020). Görüldüğü gibi HIF1A-AS2'nin kanser ile ilişkisini ortaya koymaya yönelik çalışmalar hücre proliferasyonu, hücre invazyonu ve migrasyonuna yöneliktir. Literatürde, HIF1A-AS2'nin kanserde ilaç direnci ile ilişkisini araştırmaya yönelik olarak az sayıda çalışma bulunmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada HIF1A-AS2'nin hücre proliferasyonunu ve invazyonunu artırmasının yanı sıra paklitaksel direncine de katkı sağladığı gösterilmiştir (Jiang ve ark. 2016). Chen ve ark. (2019) HIF1A-AS2'nin mesane kanserinde apoptozu engelleyerek sisplatin direncinde rol oynadığını belirtmiştir.

Bu tez çalışmasında KHAK hücrelerinde HIF1A-AS2'nin kemoterapötik direnç ile ilişkisi H69 ve H69AR hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. KHAK hücrelerinde ilaç direncinin araştırıldığı çalışmalarda bu iki hücre hattı sıklıkla kullanılmakta olup H69 hücrelerinin doksorubisine duyarlı, H69AR hücrelerinin ise doksorubisine dirençli olduğu belirtilmektedir (Sun ve ark. 2018; Chen ve ark. 2020). Doksorubisin; 1970'lerde *Streptomyces peucetius* var. *caesius*'dan izole edilen doğal bir antrasiklin antibiyotik olup meme, akciğer, mide, over ve tiroid kanserleri gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Thorn ve ark. 2011). Doksorubisinin kanser hücreleri üzerine etkisi birkaç mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan biri, doksorubisinin DNA'ya interkalasyon yapması ve bunun sonucunda DNA onarımının engellenmesidir. Diğer bir mekanizma doksorubisinin topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu önlemesidir. Son mekanizma ise serbest radikal üretimine bağlı olarak DNA hasarı ve hücre ölümünün meydana gelmesidir (Taymaz-Nikerel ve ark. 2018). XTT analizi sonuçlarına göre, doksorubisinin H69 ve H69AR hücrelerinde 48 saat için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 2,74 µM ve 50,72 µM olarak belirlenmiştir. XTT analizinin yanı sıra qPZR analizinden elde edilen sonuçlar da iki hücre hattı arasındaki farklılığı ortaya koymaktadır. H69AR hücrelerinde ABCC1 mRNA

seviyesinin H69 hücrelerine kıyasla 55,33 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, H69AR hücrelerinin doksorubisine dirençli olduğunu göstermekte olup H69 ve H69AR hücrelerinin ilaç direncini konu alan bu tez çalışmasında kullanılabilirliklerini doğrulamaktadır.

Tez başlangıcında gerçekleştirilen diğer bir analiz, iki hücre hattının qPZR yöntemi ile HIF1A-AS2 seviyeleri bakımından karşılaştırılmasıdır. Buna göre; H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2 seviyesi H69 hücrelerine kıyasla 3,92 kat fazla bulunmuştur. İlk basamak tedavi sonrası kısmi yanıtın gözlemlendiği KHAK hastalarına ait dokular ile stabil veya ilerlemiş KHAK hastalarına ait dokularda lncRNA ve miRNA ekspresyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada da, HIF1A-AS2 ifadesinin kemoterapiye yanıt vermeyen stabil veya ilerlemiş hastalara ait doku örneklerinde kısmi yanıt verenlere göre 5,03 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Kuang ve ark. 2020). Literatüre ek olarak tez çalışmasından elde ettiğimiz bu sonuç göz önüne alındığında, HIF1A-AS2'nin KHAK'da ilaç direnci ile ilişkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasında HIF1A-AS2'nin KHAK hücrelerinde ilaç direnci ile ilişkisi normoksik ve hipoksik koşullarda değerlendirilmiştir. Tümörün kontrolsüz ve hızlı çoğalmasına bağlı olarak oksijen seviyesinde azalma olarak bilinen hipoksi, bütün solid tümörlerde tümör mikroçevresinin tipik bir özelliğidir (Jing ve ark. 2019). Hücrenin hipoksiye yanıtı HIF ailesine ait transkripsiyon faktörleri tarafından yürütülür ve kanser hücrelerinin hipoksiye adaptasyonunu sağlayan, hücre proliferasyonu, apoptoz, metastaz, invazyon, anjiyogenez ile ilişkili çok sayıda genin ekspresyonu bu transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. (Wigerup ve ark. 2016). Hipoksinin önemli düzenleyicilerinden biri HIF1'dir. Heterodimer yapıda olan HIF1; HIF-1 $\alpha$  ve HIF-1 $\beta$  olmak üzere iki alt birimden oluşur (Greijer ve van der Wall 2004). Tez çalışmasında *in vitro* hipoksik ortam, hücrelerin 24 saat süresince CoCl<sub>2</sub> ile toksik olmayan doz olarak belirlenen 100  $\mu$ M konsantrasyonunda muamele edilmesi ile oluşturulmuştur. CoCl<sub>2</sub>'nin HIF-1 $\alpha$ 'nın ekspresyonunu artırdığı, prolin hidrosilaz enzimlerini inhibe ederek HIF-1 $\alpha$ 'nın degradasyonunu önlediği bilinmektedir. Ayrıca şelatör olarak da görev yapan CoCl<sub>2</sub>, hemoglobinin yapısında bulunan Fe<sup>+2</sup>,nin yerine geçerek hücrenin oksijen alımını bozmaktadır. Bu etkileri nedeniyle CoCl<sub>2</sub>, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda hipoksik ortamın oluşturulmasında sıklıkla tercih edilen bir kimyasaldır (An ve ark. 2018). qPZR analizi sonuçlarına

göre, 24 saat süresince 100 µM CoCl<sub>2</sub> uygulaması sonrasında, HIF1A geninin ekspresyon seviyesi H69 ve H69AR hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla sırasıyla 2,71 ve 2,69 kat daha fazla bulunmuştur. Ayrıca, HIF1A-AS2 seviyesi de 100 µM CoCl<sub>2</sub> uygulaması sonrasında H69 ve H69AR hücrelerinde kontrol gruplarına kıyasla sırasıyla 2,06 ve 2,33 kat artmıştır. Bu sonuçlar, 100 µM CoCl<sub>2</sub> uygulaması ile hücrelerde hipoksik ortamın oluştuğunu göstermiş, ayrıca literatür ile uyumlu olarak HIF1A-AS2'nin hipoksi ile indüklenen bir lncRNA olduğunu ortaya koymuştur (Uchida ve ark. 2004; Chen ve ark. 2017; Ma ve ark. 2019).

H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2 ifadesi RNA interferans (RNAi) yaklaşımlarından biri olan siRNA transfeksiyon yöntemi ile baskılanmıştır. RNAi; ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan doğal bir mekanizmadır. Bu mekanizmada; küçük, çift zincirli RNA molekülleri ve çeşitli proteinlerden oluşan RNA-indükleyici Susturma Kompleksi (RISC) aracılığıyla hedef mRNA'nın degradasyonu gerçekleştirilir ya da translasyonu baskılanır. Sentetik siRNA'lar aracılığıyla da hücrede bu mekanizmanın devreye sokulmasıyla hedef genin susturulması sağlanmaktadır. (Lennox ve Behlke, 2016). Bu tez çalışmasında HIF1A-AS2'yi susturmaya yönelik olarak iki siRNA kullanılmış ve en yüksek susturma oranları H69 hücrelerinde %73,4; H69AR hücrelerinde ise %87,7 olarak belirlenmiştir. Ardından gerçekleştirilen XTT analizi ile HIF1A-AS2'nin susturulmasının hücre canlılığı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Buna göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, her iki hücre hattında da HIF1A-AS2'nin susturulması 24 saat için hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamış, 48. ve 72. saatlerde ise hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Chen ve ark. (2015) tarafından mide kanseri hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmada da HIF1A-AS2'nin susturulmasının 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığı üzerine anlamlı etkisinin bulunmadığı, anlamlı azalmanın 72. ve 96. saatlerde olduğu ortaya konmuştur. Osteosarkom ve mesane kanseri hücrelerinde ise HIF1A-AS2'nin susturulması 24. saatte de hücre canlılığını azaltmıştır (Chen ve ark. 2016; Lin ve ark. 2020). Dolayısıyla HIF1A-AS2'nin susturulmasının kanser hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi 24 saat için değişkenlik gösterebilmektedir.

Tez çalışmasında, HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamdaki hücrelerin doksorubisine verdikleri cevap üzerine etkisi, sitotoksisite ve apoptoz analizleri ile değerlendirilmiştir. H69 ve H69AR hücrelerinde, normoksik ve

hipoksik ortamda HIF1A-AS2'nin susturulması, kontrol gruplarına kıyasla doksorubisinin 48 saat için IC<sub>50</sub> değerlerini anlamlı şekilde azaltmıştır. Apoptoz analizi sonuçlarına göre de H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması ile 10 µM doksorubisin varlığında, normoksik ve hipoksik ortamda, apoptoz oranlarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlar HIF1A-AS2'nin susturulması ile normoksik ve hipoksik ortamda, H69 ve H69AR hücrelerinin doksorubisin duyarlılıklarının arttığını göstermektedir. Sitotoksikite ve apoptoz analizinden elde edilen bir diğer sonuca göre, hipoksi, H69 hücrelerinin doksorubisin duyarlılığında azalmaya neden olmuştur. Hipoksi, akciğer kanseri gibi solid tümörlerde kemoterapiye karşı direnç gelişimine sebep olan bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Wohlkoenig ve ark. 2017; Zhou ve ark. 2020). H69 hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması ise hipoksinin bu etkisini geri döndürür nitelikte sonuçlara yol açmıştır. Bununla birlikte hipoksinin, hali hazırda doksorubisine dirençli olan H69AR hücrelerinde böyle bir etkisi bulunmamıştır. Benzer şekilde; H69 hücrelerinde doksorubisine bağlı apoptoz oranları bakımından HIF1A-AS2'nin susturulduğu normoksik ve hipoksik ortamlar arasında anlamlı farklılık tespit edilirken, H69AR hücrelerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu sonuç da hipoksinin H69AR hücrelerinden ziyade H69 hücrelerinin ilaç duyarlılığında etkili olduğunu göstermektedir.

H69 ve H69AR hücrelerinde normoksik ve hipoksik ortamda HIF1A-AS2'nin susturulmasının doksorubisine verilen cevap üzerine etkisi, moleküler düzeyde ilaç direnci ile ilişkilendirilen çeşitli genlerin mRNA seviyelerinin qPCR analizi ile belirlenmesi ile değerlendirilmiştir. ABC taşıyıcıları olarak isimlendirilen ve ilaçları hücre dışına pompalayarak biyoyararlanımlarını azaltan proteinleri kodlayan ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5 ve ABCG2 genlerinin ekspresyon seviyeleri de bu yöntemle analiz edilmiştir (Choi 2005). Elde edilen sonuçlara göre; doksorubisin varlığında H69 hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması, normoksik ve hipoksik ortamda kontrol gruplarına göre ABCC1 ve ABCC5 gen ekspresyonlarında anlamlı azalmaya neden olmuştur. H69AR hücrelerinde ise HIF1A-AS2'nin susturulması ile kontrol gruplarına kıyasla normoksik ortamda ABCC1 ve ABCC5 gen ekspresyonları, hipoksik ortamda ise ABCC1 gen ekspresyonları anlamlı şekilde azalmıştır. Ayrıca hipoksik ortam, H69 hücrelerinde ABCC1 ve ABCC5 gen ekspresyonlarında anlamlı bir artışa neden

olmuştur. HIF1A-AS2'nin susturulması ise hipoksinin bu genler üzerindeki etkisini mRNA düzeyinde baskılamıştır. ABCC1 geni ilk defa KHAK'da tanımlanan ve direkt olarak KHAK'da ilaç direnci ile ilişkilendirilen MRP1 proteinini kodlaması nedeniyle oldukça önemlidir (Munoz 2007). HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamda MRP1 proteini üzerine etkisi de western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Buna göre; H69AR hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında, ABCC1 geninin mRNA düzeyinde gözlenen değişimler protein seviyesinde de gözlenmiş olup, normoksik ve hipoksik ortamda HIF1A-AS2'nin susturulması MRP1 protein seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Bu sonuç, HIF1A-AS2'nin KHAK'da ilaç direnci ile ilişkilendirilebilecek bir lncRNA olabileceğinin diğer bir göstergesidir. Bununla birlikte, hipoksik ortam H69AR hücrelerinde MRP1 protein seviyesinde bir artışa neden olmamıştır. Apoptoz ve sitotoksosite analizinden elde ettiğimiz sonuçları destekler nitelikteki bu sonuç da hipoksinin H69AR hücrelerinde ilaç direncini artırıcı bir etkisinin olmadığını göstermektedir. H69 hücreleri ile oluşturulan deney gruplarında ise MRP1 proteini western blot yöntemi ile literatür ile uyumlu olarak tespit edilememiştir (Dury ve ark. 2017; Pérès ve ark. 2017; Chewchuk ve ark. 2018).

HIF1A-AS2'nin susturulması, her iki hücre hattında da normoksik ve hipoksik ortamda kontrol gruplarına kıyasla ilaç direnci ile ilişkilendirilen ARNT, ATM, FOS, GSTP1 ve XPA genlerinin mRNA seviyelerinde anlamlı azalmalara neden olmuştur. ARNT geni, oksijen yoksunluğuna yanıt olarak oluşan HIF1 transkripsiyon faktörünün HIF-1 $\beta$  alt birimini kodlamaktadır (Tsay ve ark. 2013). İlaça duyarlı kanser hücrelerinde ARNT'nin azalan ekspresyonu ile sisplatin ile indüklenen hücre ölümü arasında pozitif bir ilişki olduğu, siplatine dirençli hücrelerde ARNT'nin baskılanmasının bu hücreleri sisplatine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Chan ve ark. 2013). ATM, Ser/Thr protein kinazların fosfatidilinositol 3-kinaza bağlı kinaz ailesinin bir üyesidir ve artmış ekspresyonu KHDAK'da sisplatin direnci ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca ATM ekspresyonu kanser hücrelerinde metastaz ve EMT sürecine de katkı sağlamaktadır (Shen ve ark. 2019). FOS geni; aktif protein 1'i (AP-1) oluşturmak için c-JUN gen ürünü ile dimerize olan c-fos nüklear transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. AP-1'in bir bileşeni olarak c-fos; sinyal iletimi, hücre farklılaşması, proliferasyon, apoptoz ve tümör ilerlemesinde rol oynayan bir protoonkogen olarak tanımlanmaktadır (Chiu ve ark.

1988). Ayrıca, ilaca dirençli kanser hücrelerinde c-fos ekspresyonunun da yüksek olduğu ortaya konmuştur (Moorehead ve Singh 2000; Li ve ark. 2018). Shi ve ark. (2013) tarafından meme kanseri hücreleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada da c-fos'un susturulmasının doksorubisine dirençli MCF-7 hücrelerini kemoterapötik ajanlara karşı daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir. GSTP1 geni, hücre savunma sisteminde görevli GST ailesinin bir üyesi olan ve detoksifikasyonda önemli rol oynayan GSTP1 enzimini kodlamaktadır. Bu enzim aracılığıyla gerçekleşen detoksifikasyon reaksiyonlarının kemoterapötik ajanların etkinliğini azalttığı bilinmektedir (Ogino ve ark. 2019). MRP1'in önemli bir glutatyon konjugatı taşıyıcı olması nedeniyle GST enzimleri ile MRP1'in birlikte yüksek ekspresyonunun ilaç direncine daha çok katkı sağladığı düşünülmektedir (Morrow ve ark. 1998). XPA geni ise platin bazlı kemoterapötik ajanlar ile oluşan DNA lezyonlarının tamirinde görev alması nedeniyle artan ekspresyonu özellikle cisplatin direnci ile ilişkilendirilen, DNA hasarının tanınmasında rol oynayan proteini kodlamaktadır (Fu ve ark. 2015). Bu bilgiler göz önüne alındığında HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamda H69AR hücrelerinde ilaç direncini azaltacak, H69 hücrelerinde ise ilaç duyarlılığını artıracak şekilde sonuçlara yol açabilecek önemli genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonlarını etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca, hipoksik ortam iki hücre hattında da yukarıda belirtilen genlerden ATM, FOS ve GSTP1 genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol gruplarına kıyasla anlamlı artışa neden olmuştur. Bu genler tarafından kodlanan proteinlerin hipoksiye cevap olarak aktive edilebilmeleri, ilgili genlerin mRNA seviyesindeki artışı açıklar niteliktedir (Premkumar ve ark. 2000; Mishra ve ark. 2012; Olcina ve ark. 2014). Bununla birlikte, her iki hücre hattında da HIF1A-AS2'nin susturulması ile hipoksik ortamın bu genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisini baskılanmıştır.

H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması, normoksik ve hipoksik ortamdaki hücrelerde kontrol gruplarına kıyasla HIF1A gen ekspresyonunda da anlamlı azalmaya neden olmuştur. Ayrıca, her iki hücre hattında da hipoksik ortama bağlı olarak HIF1A geninin ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir. mRNA seviyesinde gözlenen bu değişim HIF-1 $\alpha$  proteini seviyesinin değerlendirildiği western blot analizinde de tespit edilmiştir. Dolayısıyla, KHAK hücrelerinde HIF1A-AS2'nin HIF1A ekspresyonunu pozitif yönde düzenlediği

düşünülmektedir. Guo ve ark. (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da *in vivo* ve *in vitro* meme kanseri hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması, HIF-1 $\alpha$  protein seviyesinde azalma ile sonuçlanmıştır. Araştırmacılar, HIF1A-AS2'nin susturulmasına bağlı olarak ifadesinde artışın gözlemlendiği miR-548c-3p'nin, HIF-1 $\alpha$ /VEGF yolağını inhibe ettiğini belirtmiştir. Li ve ark. (2017) tarafından insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ile gerçekleştirilen çalışmada da HIF1A-AS2'nin HIF1A üzerindeki pozitif yönde düzenleyici etkisi, HIF1A'nın postranskripsiyonel olarak susmasına yol açan miR-153-3p'nin süngeri olarak görev yapması ile açıklanmıştır. HIF1A-AS2'nin HIF1A üzerinde inhibe edici bir etkisinin olduğu belirtilmiş olsa da, bunun aksini gösteren çalışmalara ek olarak tez çalışmasından da elde ettiğimiz sonuç, HIF1A-AS2'nin HIF1A üzerindeki etkisinin miRNA gibi faktörlerin devreye girmesi ile pozitif yönde olabileceğini göstermektedir (Uchida ve ark. 2004; Chen ve ark. 2017; Li ve ark. 2017; Guo ve ark. 2019).

KHDAK hücreleri ile yapılan bir çalışmada HIF1A'nın susturulmasının hipoksiye bağlı olarak gelişen EMT ve ilaç direncini engellediği belirtilmiştir (Kogita ve ark. 2014). Li ve ark. (2015)'lerinin yaptığı çalışmada da meme kanseri hücrelerinde HIF1A'nın susturulmasının kanser hücrelerinin ilaca duyarlılığını artırdığı, migrasyon ve invazyon kapasitelerini azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, HIF1AS2'nin susturulmasına bağlı olarak HIF1A mRNA ve protein seviyesinde gözlenen azalmanın H69 hücrelerinde ilaç duyarlılığının artmasına, H69AR hücrelerinde ise ilaç direncinin azalmasına katkı sağladığı düşünülmektedir. qPZR ve western blot analizinden elde edilen diğer bir sonuca göre; hipoksik ortamın HIF1A mRNA ve protein seviyeleri üzerine etkisi, HIF1A-AS2'nin susturulması durumunda baskılanmıştır. Bu nedenle, H69 hücrelerinde hipoksiye bağlı olarak gelişen ilaç duyarlılığındaki azalmanın, HIF1A-AS2'nin susturulması sonucunda HIF1A ekspresyonundaki azalma ile ilişkili olarak engellendiği düşünülmektedir.

HIF1A-AS2'nin HIF1A mRNA'sı ile ilişkisi lncRNA-mRNA etkileşiminin bir örneğidir. Mineo ve ark. (2016) ise lncRNA-protein etkileşimini gösterir nitelikte olarak HIF1A-AS2'nin, IGF2BP2 ve DHX9 proteinleri ile direkt olarak ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, HIF1A-AS2'nin IGF2BP2 ve DHX9 proteinleri ile etkileşiminin HMGA1 mRNA ekspresyonunu artırdığını göstermiştir. HMGA1 geni, DNA'nın küçük oluğundaki A-T'ce zengin bölgelere bağlanabilen ve

böylece hücre döngüsü, embriyolojik gelişim, apoptoz gibi biyolojik süreçleri düzenlemesi ile mimari özellikte olduğu belirtilen bir transkripsiyon faktörü kodlamaktadır (Fu ve ark. 2018). Karsinogenez süreci ile de ilişkilendirilen HMGA1'in akciğer kanseri (Hillion ve ark. 2009), meme kanseri (Chiappetta ve ark. 2010), kolorektal kanser (Williams ve ark. 2015), glioblastoma (Colamaio ve ark. 2016) gibi kanserlerde ekspresyonunun yüksek olduğu belirtilmektedir. Ayrıca; kanserde ilaç direnci ile ilişkilendirilen HMGA1'in susturulmasının, kanser hücrelerinde ilaç duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (Kim ve ark. 2016; Wang ve ark. 2017). HIF1A-AS2'nin mesane kanseri hücrelerinde ilaç direnci üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada da HIF1A-AS2 ile HMGA1 ekspresyonu arasında pozitif bir ilişkinin olduğu, bu hücrelerde HIF1A-AS2 ya da HMGA1'in susturulmasının ilaç duyarlılığını artırarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Chen ve ark. 2019). Bu tez çalışmasında da HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamda IGF2BP2, DHX9 ve HMGA1 gen ekspresyonları üzerine etkisi qPZR analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS'nin susturulması, normoksik ve hipoksik ortamda kontrol gruplarına kıyasla DHX9 ve HMGA1 gen ekspresyonlarını anlamlı şekilde azaltmıştır. H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması ile hem normoksik hem hipoksik ortamda IGF2BP2 gen ekspresyonunun da anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, iki hücre hattında da hipoksiye bağlı olarak gözlenen ilgili genlerin ekspresyonlarındaki artışın HIF1A-AS2'nin susturulması ile engellendiği görülmüştür. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamda ilaç duyarlılığını artırıcı etkisinin HMGA1 ile ilişkili olabileceği de düşünülmektedir.

Yukarıda bahsi geçen genlere ek olarak, H69 hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması kontrol gruplarına göre, normoksik ve hipoksik ortamda MVP, TOP2A ve TOP2B genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalmaya neden olmuştur. H69AR hücrelerinde ise HIF1A-AS2'nin susturulması ile kontrol gruplarına göre normoksik ortamda MVP, MYC ve UGCG genlerinin, hipoksik ortamda ise MYC, TOP2A, TOP2B, TP53 ve UGCG genlerinin ekspresyon seviyeleri anlamlı şekilde azalmıştır. Ayrıca, hipoksik ortam H69 hücrelerinde MVP, MYC, TOP2A ve TOP2B genlerinin, H69AR hücrelerinde ise GSK3A, MYC, TOP2A, TOP2B, TP53 ve UGCG genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı artışa neden olmuştur.

MVP geni; nukleositoplazmik taşımada görevli bir ribonükleoprotein partikülünün ana bileşenini olan, akciğer direnç proteini (LRP) olarak da isimlendirilen proteini kodlamaktadır (Bai ve ark. 2019). Bu proteinin ilaç direnci ile ilişkisi; ribonükleoprotein partikülünün platin türevli ilaçları nükleustan sitoplazmaya taşınması, sonrasında ise ilaçların ABC taşıyıcıları aracılığıyla hücre dışına atılması ile açıklanmaktadır (Janikova ve ark. 2016). MVP ekspresyonundaki artış ilaç direncinin yanı sıra kanserde metastaz ve EMT süreci ile de ilişkilendirilmektedir (Lee ve ark. 2017; Xiao ve ark. 2019). DNA sarmalının gevşetilmesinde rol oynayarak replikasyon ve transkripsiyonu kolaylaştıran topoizomeraz enzim ailesinin bir üyesi olan TOP2B, doksorubisin ve etoposid gibi KHAK tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların da hedefini oluşturmaktadır (Heestand ve ark. 2017). TOP2B'nin artan ekspresyonu over kanseri ve karaciğer kanseri hastalarında düşük sağ kalım oranı ile ilişkilendirilmiştir (Bai ve ark. 2016; Liu ve ark. 2018). DNA'nın topolojik yapısını düzenleyen topoizomeraz enzim ailesinin bir diğer üyesini kodlayan TOP2A gen ekspresyonunun da akciğer kanseri dokularında yüksek olduğu belirtilmiş; susturulmasının akciğer kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonu, migrasyon ve invazyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kou ve ark. 2020). KHAK hastaları ile yapılan bir çalışmada da yüksek TOP2B ekspresyonu ilaca daha düşük cevap, yüksek TOP2A ekspresyonu da kötü sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (Dingemans ve ark. 1999). KHAK ve KDAK da dahil olmak üzere çoğu kanser türünde yüksek oranda ifade edildiği bilinen ve onkogen olarak tanımlanan MYC geni, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, apoptoz gibi biyolojik süreçlerde görev alan c-myc transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır (Kim ve ark. 2006; Lu ve ark. 2016; Dragoj ve ark. 2019). Kanserde hücre proliferasyonu, hücre sağ kalımı, genomik instabilite, metastaz ve anjiyogenez ile ilişkilendirilen MYC'in inhibisyonunun kanser hücrelerinde ilaç direncini azaltabileceği ve tedavi etkinliğini artırabileceği düşünülmektedir (Wolfer ve Ramaswamy 2011; Pan ve ark. 2014; Li ve ark. 2017). UGCG; tüm glikosfingolipitlerin öncüsü olan glikosilseramidin üretiminde görevli sfingolipid metabolizmasında önemli bir enzimi kodlamaktadır (Wegner ve ark. 2018). KML hücreleri ile yapılan bir çalışmada çoklu ilaç direncinin yüksek UGCG ekspresyonu ile ilişkili olduğu, UGCG inhibisyonunun kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlara karşı daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Salustiano ve ark. 2020). Wegner ve ark. (2018) UGCG ekspresyonundaki artışla ilişkili olarak seramid miktarındaki artışın meme kanseri hücrelerinde Akt

aktivasyonu aracılığıyla hücre proliferasyonunu ve doksorubisin direncini indüklediğini göstermiştir.

Sonuç olarak, H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması, normoksik ve hipoksik ortamda hücrelerin doksorubisin duyarlılığını artıran çok sayıda genin ekspresyon seviyesini etkilemiştir. Bununla birlikte hipoksik ortam, ilaç duyarlılığında azalmaya sebep olabilecek çok sayıda genin ekspresyonunu artırmıştır. HIF1A-AS2'nin susturulduğu durumda normoksik ortama göre hipoksik ortamda da benzer genlerin ekspresyonlarında değişim gözlenmesi, hipoksinin etkisini doğrulamaktadır. Bununla birlikte HIF1A-AS2'nin susturulması ile hipoksinin bu genler üzerindeki etkisinin baskılandığı görülmektedir.

Tez çalışmasında HIF1A-AS2'nin normoksik ve hipoksik koşullarda KHAK hücrelerinde kemoterapötik dirençteki olası etkisi otofaji ile ilişkili olarak ele alınmıştır. Bu amaçla, HIF1A-AS2 ifadesi susturulmuş normoksik ve hipoksik ortamdaki hücreler ile doksorubisin varlığında ve yokluğunda otofaji analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri qPZR analizi ile değerlendirilmiştir.

Otofaji analizi sonuçlarına göre; HIF1A-AS2'nin susturulması ile normoksik ve hipoksik ortamda çoğaltılan H69 ve H69AR hücrelerinde, 10 µM doksorubisin varlığında ve yokluğunda otofaji, kontrol gruplarına kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır. Ayrıca hipoksik ortam, H69 hücrelerinde doksorubisin varlığında ve yokluğunda otofajinin artmasına neden olmuştur. H69AR hücrelerinde ise hipoksik ortam doksorubisin yokluğunda otofajiyi artırsa da, doksorubisin varlığında otofaji miktarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

qPZR analizi sonuçlarına göre; HIF1A-AS2'nin susturulması, H69 ve H69AR hücrelerinde normoksik ve hipoksik ortamda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında otofajinin başlama, uzama, olgunlaşma, füzyon ve bozunma basamaklarında görevli proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonlarında anlamlı azalmaya neden olmuştur (Parzych ve Klionsky 2014). Ayrıca, hipoksik ortamın her iki hücre hattında da otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını anlamlı şekilde artırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, hipoksinin bu genlerin ekspresyonları üzerine etkisinin HIF1A-AS2'nin susturulması ile engellediği belirlenmiştir.

Otofajinin kanserde tartışmalı bir rolü olduğu düşünülse de, ilaç direncinde etkili olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca, otofajinin çeşitli ajanlar aracılığıyla düzenlenmesi kanserde yeni bir tedavi stratejisi olarak karşımıza çıkmaktadır (Towers ve Thorburn 2016; Li ve ark. 2019). Akciğer kanseri hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, H69 hücrelerinin de içerisinde bulunduğu nöroendokrin karaktere sahip hücrelerde otofaji belirteci LC3'ün yüksek oranda eksprese edildiği ve bu hücrelerde otofajinin hücre proliferasyonu ve sağ kalımda rol oynadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada nöroendokrin karakterdeki akciğer kanseri hücrelerinin otofaji inhibitörlerine daha duyarlı olduğu da ortaya konmuştur (Hong ve ark. 2013). Benzer şekilde Rupniewska ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada da KHAK hücrelerinin otofaji inhibitörlerine karşı daha duyarlı olduğu, bu hücrelerde otofaji inhibisyonunun yeni bir tedavi stratejisi olarak denenmesi gerektiği belirtilmiştir. Akciğer kanseri hücreleri ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada da otofaji inhibisyonunun hücre proliferasyonunu azalttığı ve kanser hücrelerini sisplatin'e daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Kaminsky ve ark. 2012).

Tez çalışmasında HIF1A-AS2'nin susturulmasının normoksik ve hipoksik ortamda, doksorubisin varlığında otofaji üzerine etkisi; otofagozom oluşumu için gerekli olan PI3KC3 kompleksinin ana bileşeni Beclin-1 protein seviyesinin western blot yöntemi ile analiz edilmesiyle de değerlendirilmiştir (Sun ve ark. 2009). Buna göre; HIF1A-AS2'nin susturulması ile H69 ve H69AR hücrelerinde normoksik ve hipoksik ortamda Beclin-1 protein seviyesi azalmıştır. Ayrıca, her iki hücre hattında hipoksiye bağlı olarak Beclin-1 protein seviyesinde artış meydana gelmiştir. Bununla birlikte, HIF1A-AS2'nin susturulması ile hipoksinin Beclin-1 protein seviyesi üzerindeki artırıcı etkisi baskılanmıştır. Çeşitli kanser hücreleri ile yapılan çalışmalar Beclin-1'in apoptoz, hücre proliferasyonu ve ilaç direnci ile de ilişkili olduğu ortaya koymuştur. Örneğin, kolorektal kanseri hücrelerinde BECN1'in susturulmasının otofaji ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, apoptozu ise indüklediği gösterilmiştir (Liu ve ark. 2017). Chen ve ark. (2020) tarafından gastrointestinal stromal tümör hücrelerinde BECN1'in susturulmasının hücreleri imatinibe daha duyarlı hale getirdiği belirtilmiştir. İlaça dirençli KHAK hücrelerinde de BECN1'in siRNA ile susturulmasının ilaç duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (Yang ve ark. 2017). Bu bilgiler ışığında H69 ve H69AR hücrelerinde otofajinin koruyucu bir rolü

olduğu, HIF1A-AS2'nin susturulması ile normoksik ve hipoksik ortamda otofajinin azalmasının bu hücrelerde ilaç duyarlılığını artırdığı düşünölmektedir.

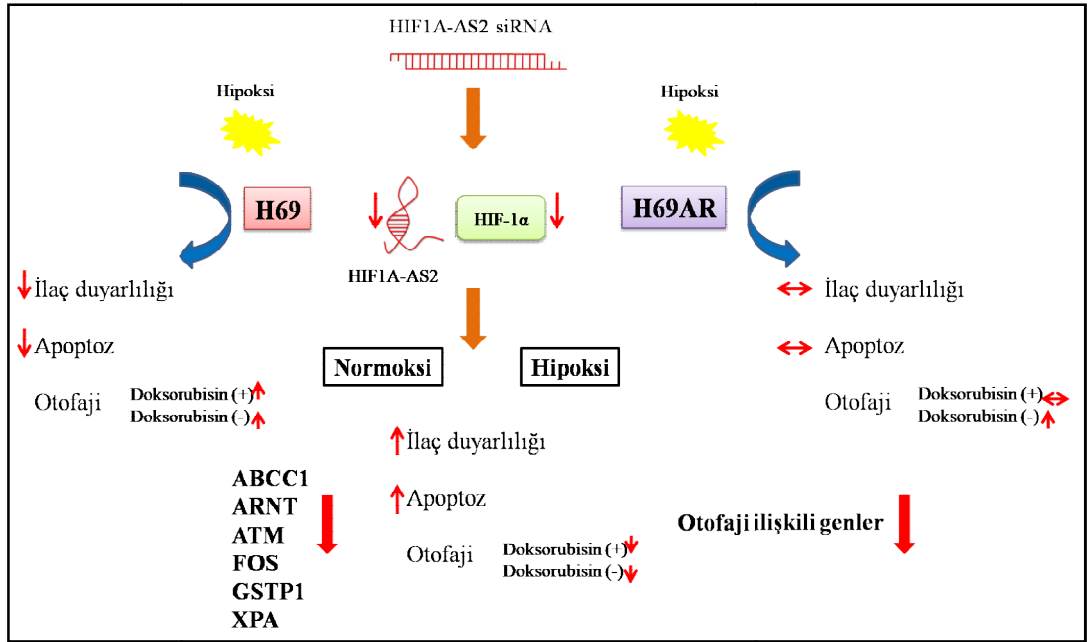
## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanserde tanımlanmış temel mekanizmaların dışında çok sayıda faktörün ilaç direncinde etkili olabileceği belirtilmektedir. Bu tez çalışmasında da, HIF1A-AS2 lncRNA'nın KHAK hücrelerinde ilaç direnci üzerine olası etkisi otofaji üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 6.1.'de şematize edilmiş olup, bu sonuçlara göre;

- H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması, normoksik ve hipoksik ortamda doksorubisinin IC<sub>50</sub> değerlerinde kontrol gruplarına kıyasla anlamlı azalmaya neden olmuştur.
- HIF1A-AS2'nin susturulması normoksik ve hipoksik ortamda H69 ve H69AR hücrelerinde doksorubisine bağlı apoptozu artırmıştır.
- Hipoksik ortam H69 hücrelerinin doksorubisin duyarlılığında azalmaya neden olurken, H69AR hücrelerinde doksorubisine verilen cevap üzerine etkisi bulunmamıştır.
- H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması normoksik ve hipoksik ortamda ilaç duyarlılığını artırabilecek çok sayıda genin ekspresyonunu değiştirmiştir. Ayrıca, H69AR hücrelerinde direnç ile ilişkili MRP1 protein seviyesinin HIF1A-AS2'nin susturulması ile normoksik ve hipoksik ortamda azaldığı tespit edilmiştir.
- H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması normoksik ve hipoksik ortamda doksorubisin yokluğunda ve varlığında otofaji miktarında azalmaya neden olmuştur.
- H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulması normoksik ve hipoksik ortamda otofajiyi inhibe edecek şekilde çok sayıda genin ekspresyonunu değiştirmiştir. Her iki hücre hattında da HIF1A-AS2'nin susturulması ile normoksik ve hipoksik ortamda otofaji ile ilişkili Beclin-1 protein seviyesi azalmıştır.
- Hipoksik ortam, H69 ve H69AR hücrelerinde ilaç direnci ve otofaji ile ilişkili çok sayıda genin ekspresyonunda artışa yol açmıştır. Sitotoksikite ve apoptoz analizi sonuçları ise hipoksinin, hali hazırda dirençli olan H69AR hücrelerinde ilaç direncini daha da artırıcı bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, gen ekspresyon seviyelerinde değişimin gözlemlendiği ilaç direnci ile ilişkili genlerin hücre invazyonu ve migrasyonunda

da rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle H69AR hücrelerinde hipoksinin, invazyonu artırıcı bir etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bu görüşü doğrulamaya yönelik olarak ek invazyon ve migrasyon analizleri gerçekleştirilebilir. H69 hücrelerinde ise hipoksi, ilaç duyarlılığını azaltmıştır. HIF1A-AS2'nin susturulması ile hipoksinin bu etkisi baskılanmıştır.

- KHAK hücrelerinde HIF1A-AS2, HIF1A ekspresyonunu pozitif yönde düzenlemektedir.



Şekil 6.1. Tez çalışmasından elde edilen sonuçların şematize hali.

Elde edilen sonuçlara göre; normoksik ve hipoksik ortamda, H69 ve H69AR hücrelerinde HIF1A-AS2'nin susturulmasının en önemli etkisi HIF-1 $\alpha$ 'nın baskılanması ve otofajinin inhibe edilmesidir. Literatüre göre, KHAK hipoksik bir tümör olarak değerlendirilmekte ve bu tümörde otofaji inhibisyonunun tedavi etkinliğini artıracacağı belirtilmektedir. Sitotoksisite, apoptoz ve otofaji analizlerinden elde ettiğimiz sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, HIF1A-AS2'nin susturulmasının bir sonucu olarak otofajinin inhibe olmasının, hücrelerin doksorubisin duyarlılığını artırdığı görülmektedir. Moleküler analizler ile desteklenen bu sonuç, KHAK hücrelerinde ilaç duyarlılığının hipoksi-HIF1A-AS2-otofaji ekseninde düzenlendiği göstermektedir. Bununla birlikte mekanizmanın tam olarak aydınlatılması, özellikle shRNA kullanarak HIF1A-AS2-miRNA etkileşiminin araştırılacağı daha kapsamlı moleküler analizler ve *in vivo* modeller ile gerçekleştirilebilecek daha ileri çalışmalar ile mümkün olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- Adams C, Cazzanelli G, Rasul S, Hitchinson B, Hu Y, Coombes RC, Raguz S, Yagüe E. Apoptosis inhibitor TRIAP1 is a novel effector of drug resistance. *Oncol Rep.* 2015; 34(1): 415-22.
- Akhtar N, Bansal JG. Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer.* 2017; 41(5): 328-39.
- Alexandrov K, Rojas M, Satarug S. The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. *Toxicol Lett.* 2010; 198(1): 63-8.
- Alfarouk KO, Stock CM, Taylor S, Walsh M, Muddathir AK, Verduzco D, Bashir AH, Mohammed OY, Elhassan GO, Harguindey S, Reshkin SJ, Ibrahim ME, Rauch C. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell Int.* 2015; 15: 71.
- An S, Zhou M, Li Z, Feng M, Cao G, Lu S, Liu L. Administration of CoCl<sub>2</sub> improves functional recovery in a rat model of sciatic nerve transection injury. *Int J Med Sci.* 2018; 15(13): 1423-32.
- Archer VE. Lung cancer risks of underground miners: cohort and case-control studies. *Yale J Biol Med.* 1988; 61(3): 183-93.
- Asfar T, Arheart KL, Koru-Sengul T, Byrne MM, Dietz NA, Chen CJ, Lee DJ. National estimates and correlates of secondhand smoke exposure in US cancer survivors. *J Cancer Surviv.* 2017; 11(4): 469-76.
- Azad NA, Shah ZA, Pandith AA, Rasool R, Rasool J, Baba SM, Aziz SA, Jeelani S. Analysis of ABL kinase domain mutations as a probable cause of imatinib resistance in Chronic Myeloid Leukemia patients of Kashmir. *Meta Gene.* 2018; 17: 93-8.
- Azzariti A, Porcelli L, Quatralè AE, Silvestris N, Paradiso A. The coordinated role of CYP450 enzymes and P-gp in determining cancer resistance to chemotherapy. *Curr Drug Metab.* 2011; 12(8): 713-21.
- Bai H, Wang C, Qi Y, Xu J, Li N, Chen L, Jiang B, Zhu X, Zhang H, Li X, Yang Q, Ma J, Xu Y, Ben J, Chen Q. Major vault protein suppresses lung cancer cell proliferation by inhibiting STAT3 signaling pathway. *BMC Cancer.* 2019; 19(1): 454.
- Bai Y, Li LD, Li J, Lu X. Targeting of topoisomerases for prognosis and drug resistance in ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2016; 9(1): 35.
- Baranello L, Bertozzi D, Fogli MV, Pommier Y, Capranico G. DNA topoisomerase I inhibition by camptothecin induces escape of RNA polymerase II from promoter-proximal pause site, antisense transcription and histone acetylation at the human HIF-1 $\alpha$  gene locus. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38(1): 159-71.
- Barros-Dios JM, Ruano-Ravina A, Pérez-Ríos M, Castro-Bernárdez M, Abal-Arca J, Tojo-Castro M. Residential radon exposure, histologic types, and lung cancer risk. A case-control study in Galicia, Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012; 21(6): 951-8.
- Bhat SA, Ahmad SM, Mumtaz PT, Malik AA, Dar MA, Urwat U, Shah RA, Ganai NA. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Noncoding RNA Res.* 2016; 1(1): 43-50.
- Birring SS, Peake MD. Symptoms and the early diagnosis of lung cancer. *Thorax.* 2005; 60(4): 268-9.
- Bitencourt R, Zalberg I, Louro ID. Imatinib resistance: a review of alternative inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011; 33(6): 470-5.
- Bradley SH, Kennedy MPT, Neal RD. Recognising lung cancer in primary care. *Adv Ther.* 2019; 36(1): 19-30.
- Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J.* 2001; 18(6): 1059-68.
- Brannan C, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol.* 1990; 10(1): 28-36.

- 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 Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394-424.
- Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, Bickeböller H, Rosenberger A, McCormack V, Muscat JE, Yang P, Wichmann HE, Brueske-Hohlfeld I, Schwartz AG, Cote ML, Tjønneland A, Friis S, Le Marchand L, Zhang ZF, Morgenstern H, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Zaridze D, Rudnai P, Fabianova E, Foretova L, Janout V, Bencko V, Schejbalova M, Brennan P, Mates IN, Lazarus P, Field JK, Raji O, McLaughlin JR, Liu G, Wiencke J, Neri M, Ugolini D, Andrew AS, Lan Q, Hu W, Orlow I, Park BJ, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Am J Epidemiol.* 2012; 176(7): 573-85.
- Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R, Willard HF. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature.* 1991; 349(6304): 38-44.
- Chan HS, Lu Y, Grogan TM, Haddad G, Hipfner DR, Cole SP, Deeley RG, Ling V, Gallie BL. Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of P-glycoprotein. *Cancer Res.* 1997; 57(12): 2325-30.
- Chan HS, Thorner PS, Haddad G, Ling V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol.* 1990; 8(4): 689-704.
- Chan YY, Kalpana S, Chang WC, Chang WC, Chen BK. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator enhances cisplatin resistance by upregulating MDR1 expression in cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2013; 84(4): 591-602.
- Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, Dinger ME. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *J Cancer.* 2013; 108(12): 2419-25.
- Chen D, Wu L, Liu L, Gong Q, Zheng J, Peng C, Deng J. Comparison of HIF1A-AS1 and HIF1A-AS2 in regulating HIF-1 $\alpha$  and the osteogenic differentiation of PDLCs under hypoxia. *Int J Mol Med.* 2017; 40(5): 1529-36.
- Chen LS, Kaphingst KA. Risk perceptions and family history of lung cancer: differences by smoking status. *Public Health Genomics.* 2011; 14(1): 26-34.
- Chen M, Zhuang C, Liu Y, Li J, Dai F, Xia M, Zhan Y, Lin J, Chen Z, He A, Xu W, Zhao G, Guo Y, Cai Z, Huang W. Tetracycline-inducible shRNA targeting antisense long non-coding RNA HIF1A-AS2 represses the malignant phenotypes of bladder cancer. *Cancer Lett.* 2016; 376(1): 155-64.
- Chen R, Li D, Zheng M, Chen B, Wei T, Wang Y, Li M, Huang W, Tong Q, Wang Q, Zhu Y, Fang W, Guo L, Fang S. FGFR1 affects chemoresistance of small-cell lung cancer by modulating the PI3K/Akt pathway via ENO1. *J Cell Mol Med.* 2020; 24(3): 2123-34.
- Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L, Zhang J. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1806(2): 220-9.
- Chen W, Li Z, Liu H, Jiang S, Wang G, Sun L, Li J, Wang X, Yu S, Huang J, Dong Y. MicroRNA-30a targets BECLIN-1 to inactivate autophagy and sensitizes gastrointestinal stromal tumor cells to imatinib. *Cell Death Dis.* 2020; 11(3): 198.
- Chen WG, Sun J, Shen WW, Yang SZ, Zhang Y, Hu X, Qiu H, Xu SC, Chu TW. Sema4D expression and secretion are increased by HIF-1 $\alpha$  and inhibit osteogenesis in bone metastases of lung cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2019; 36(1): 39-56.
- Chen WM, Huang MD, Kong R, Xu TP, Zhang EB, Xia R, Sun M, De W, Shu YQ. Antisense long noncoding RNA HIF1A-AS2 is upregulated in gastric cancer and associated with poor prognosis. *Dig Dis Sci.* 2015; 60(6): 1655-62.
- Chen X, Liu M, Meng F, Sun B, Jin X, Jia C. The long noncoding RNA HIF1A-AS2 facilitates cisplatin resistance in bladder cancer. *J Cell Biochem.* 2019; 120(1): 243-52.
- Chen YT, Feng B, Chen LB. Update of research on drug resistance in small cell lung cancer chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(8): 3577-81.

- Cheng YW, Lee H, Shiau MY, Wu TC, Huang TT, Chang YH. Human papillomavirus type 16/18 up-regulates the expression of interleukin-6 and antiapoptotic Mcl-1 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(15): 4705-12.
- Chewchuk S, Boorman T, Edwardson D, Parissenti AM. Bile acids increase doxorubicin sensitivity in ABCC1-expressing tumour cells. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 5413.
- Chiappetta G, Ottaiano A, Vuttariello E, Monaco M, Galdiero F, Gallipoli A, Pilotti S, Jodice G, Siranoush M, Colombo M, Ripamonti CB, Pallante PL, Radice P, Fusco A. HMGA1 protein expression in familial breast carcinoma patients. *Eur J Cancer.* 2010; 46(2): 332-9.
- Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell.* 1988; 54(4): 541-52.
- Cho HJ, Yoon IS. Pharmacokinetic interactions of herbs with cytochrome p450 and p-glycoprotein. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015: 736431.
- Choi CH. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* 2005; 5: 30.
- Chorawala MR, Oza PM, Shah GB. Mechanisms of anticancer drugs resistance: An overview. *IJPSDR.* 2012; 4(1): 1-9.
- Clarke R, Leonessa F, Trock B. Multidrug resistance/P-glycoprotein and breast cancer: review and meta-analysis. *Semin Oncol.* 2005; 32(7): 9-15.
- Colamaio M, Tosti N, Puca F, Mari A, Gattardo R, Kuzay Y, Federico A, Pepe A, Sarnataro D, Ragozzino E, Raia M, Hirata H, Gemei M, Mimori K, Del Vecchio L, Battista S, Fusco A. HMGA1 silencing reduces stemness and temozolomide resistance in glioblastoma stem cells. *Expert Opin Ther Targets.* 2016; 20(10): 1169-79.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 1992; 258(5088): 1650-4.
- Cole SP, Downes HF, Mirski SE, Clements DJ. Alterations in glutathione and glutathione-related enzymes in a multidrug-resistant small cell lung cancer cell line. *Mol Pharmacol.* 1990; 37(2): 192-7.
- Corrales L, Rosell R, Cardona AF, Martín C, Zatarain-Barrón ZL, Arrieta O. Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020; 148: 102895.
- Cree IA, Charlton P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer.* 2017; 17(1): 10.
- Cruz JA, Westhof E. The dynamic landscapes of RNA architecture. *Cell.* 2009; 136: 604-9.
- Cryer AM, Thorley AJ. Nanotechnology in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Pharmacol Ther.* 2019; 198: 189-205.
- Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15(2): 81-94.
- Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, Deo H, Falk R, Forastiere F, Hakama M, Heid I, Kreienbrock L, Kreuzer M, Lagarde F, Mäkeläinen I, Muirhead C, Oberaigner W, Pershagen G, Ruano-Ravina A, Ruosteenoja E, Rosario AS, Tirmarche M, Tomásek L, Whitley E, Wichmann HE, Doll R. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ.* 2005; 330(7485): 223.
- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364-78.
- De Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2018; 7(3): 220-33.
- Demedts IK, Vermaelen KY, van Meerbeeck JP. Treatment of extensive-stage small cell lung carcinoma: current status and future prospects. *Eur Respir J.* 2010; 35(1): 202-15.

- Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhhattar R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012; 22: 1775-89.
- Di L. The role of drug metabolizing enzymes in clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014; 10(3): 379-93.
- Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA, van der Valk P, Postmus PE, Giaccone G. Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1999; 5(8): 2048-58.
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Röder M, Kokocinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I, Baer MT, Bar NS, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, Derrien T, Drenkow J, Dumais E, Dumais J, Duttagupta R, Falconnet E, Fastuca M, Fejes-Toth K, Ferreira P, Foissac S, Fullwood MJ, Gao H, Gonzalez D, Gordon A, Gunawardena H, Howald C, Jha S, Johnson R, Kapranov P, King B, Kingswood C, Luo OJ, Park E, Persaud K, Preall JB, Ribeca P, Risk B, Robyr D, Sammeth M, Schaffer L, See LH, Shahab A, Skancke J, Suzuki AM, Takahashi H, Tilgner H, Trout D, Walters N, Wang H, Wrobel J, Yu Y, Ruan X, Hayashizaki Y, Harrow J, Gerstein M, Hubbard T, Reymond A, Antonarakis SE, Hannon G, Giddings MC, Ruan Y, Wold B, Carninci P, Guigó R, Gingeras TR. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012; 489(7414): 101-8.
- Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. *Br J Cancer.* 2005; 92(3): 426-9.
- Dooley AL, Winslow MM, Chiang DY, Banerji S, Stransky N, Dayton TL, Snyder EL, Senna S, Whittaker CA, Bronson RT, Crowley D, Barretina J, Garraway L, Meyerson M, Jacks T. Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer. *Genes Dev.* 2011; 25(14): 1470-5.
- Dragoj M, Bankovic J, Podolski-Renic A, Buric SS, Pesic M, Tanic N, Stankovic T. Association of overexpressed *MYC* gene with altered *PHACTR3* and *E2F4* genes contributes to non-small cell lung carcinoma pathogenesis. *J Med Biochem.* 2019; 38(2): 188-95.
- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001; 344(14): 1038-42.
- Du P, Wang Y, Chen L, Gan Y, Wu Q. High ERCC1 expression is associated with platinum-resistance, but not survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett.* 2016; 12(2): 857-62.
- Dury L, Nasr R, Lorendeau D, Comsa E, Wong I, Zhu X, Chan KF, Chan TH, Chow L, Falson P, Di Pietro A, Baubichon-Cortay H. Flavonoid dimers are highly potent killers of multidrug resistant cancer cells overexpressing MRP1. *Biochem Pharmacol.* 2017; 124: 10-8.
- El-Awady R, Saleh E, Hashim A, Soliman N, Dallah A, Elrasheed A, Elakraa G. The role of eukaryotic and prokaryotic ABC transporter family in failure of chemotherapy. *Front Pharmacol.* 2017; 7: 535.
- Elliott L, Loomis D, Dement J, Hein MJ, Richardson D, Stayner L. Lung cancer mortality in North Carolina and South Carolina chrysotile asbestos textile workers. *Occup Environ Med.* 2012; 69(6): 385-90.
- Ellis PM, Al-Saleh K. Multitargeted anti-angiogenic agents and NSCLC: clinical update and future directions. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012; 84(1): 47-58.
- ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012; 489: 57-74
- ENCODE Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature.* 2007; 447(7146): 799-816.

- Endo K, Maehara Y, Kusumoto T, Ichiyoshi Y, Kuwano M, Sugimachi K. Expression of multidrug-resistance-associated protein (MRP) and chemosensitivity in human gastric cancer. *Int J Cancer*. 1996; 68(3): 372-7.
- Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G, 3rd Kenny PJ, Wahlestedt C. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med*. 2008; 14: 723-30.
- Faghihi MA, Wahlestedt C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 637-43.
- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*. 2014; 24(1): 24-41.
- Fennell DA, Summers Y, Cadranel J, Benepal T, Christoph DC, Lal R, Das M, Maxwell F, Visseren-Grul C, Ferry D. Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev*. 2016; 44: 42-50.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018; 103: 356-87.
- Ferone G, Song JY, Sutherland KD, Bhaskaran R, Monkhorst K, Lambooij JP, Proost N, Gargiulo G, Berns A. SOX2 is the determining oncogenic switch in promoting lung squamous cell carcinoma from different cells of origin. *Cancer Cell*. 2016; 30(4): 519-32.
- Fox W, Scadding JG. Medical Research Council comparative trial of surgery and radiotherapy for primary treatment of small-celled or oat-celled carcinoma of bronchus. Ten-year follow-up. *Lancet*. 1973; 2(7820): 63-5.
- Fu F, Wang T, Wu Z, Feng Y, Wang W, Zhou S, Ma X, Wang S. HMGA1 exacerbates tumor growth through regulating the cell cycle and accelerates migration/invasion via targeting miR-221/222 in cervical cancer. *Cell Death Dis*. 2018; 9(6): 594.
- Fu X, Hu J, Han HY, Hua YJ, Zhou L, Shuai WD, Du WY, Kuang CM, Chen S, Huang W, Liu RY. High expression of XPA confers poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma patients treated with platinum-based chemoradiotherapy. *Oncotarget*. 2015; 6(29): 28478-90.
- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012; 31(15): 1869-83.
- Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galietta A, Rostagno R, Scapozza L. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol*. 2003; 4(2):75-85.
- Gaskin J, Coyle D, Whyte J, Krewski D. Utility gains from reductions in the modifiable burden of lung cancer attributable to residential radon in Canada. *Can J Public Health*. 2018; 109(4): 598-609.
- Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*. 2008; 9(9): 859-64.
- Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer*. 2011; 10: 38.
- Gifford AJ, Haber M, Witt TL, Whetstine JR, Taub JW, Matherly LH, Norris MD. Role of the E45K-reduced folate carrier gene mutation in methotrexate resistance in human leukemia cells. *Leukemia*. 2002; 16(12): 2379-87.
- Gloyme SR. A case of oat-cell carcinoma of the lung occurring in asbestosis. *Tubercule* 1936; 18: 100-1.
- Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med*. 2002; 53: 615-27.
- Granger CL. Physiotherapy management of lung cancer. *J Physiother*. 2016; 62(2): 60-7.
- Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*. 2004; 57(10): 1009-14.
- Guillemette C, Lévesque É, Rouleau M. Pharmacogenomics of human uridine diphosphoglucuronosyltransferases and clinical implications. *Clin Pharmacol Ther*. 2014; 96(3): 324-39.

- Guo X, Lee S, Cao P. The inhibitive effect of sh-HIF1A-AS2 on the proliferation, invasion, and pathological damage of breast cancer via targeting miR-548c-3p through regulating HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in vitro and vivo. *Onco Targets Ther.* 2019; 12: 825-834.
- Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010; 464(7291): 1071-6.
- Gupta SK, Thum T. Non-coding RNAs as orchestrators of autophagic processes. *J Mol Cell Cardiol.* 2016; 95: 26-30.
- Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature.* 2012; 482: 339-46.
- Han D, Wang G, Sun L, Ren X, Shang W, Xu L, Li S. Comparison of irinotecan/platinum versus etoposide/platinum chemotherapy for extensive-stage small cell lung cancer: A meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2017; 26(6).
- Hang B, Wang P, Zhao Y, Chang H, Mao J, Snijders AM. Thirdhand smoke: Genotoxicity and carcinogenic potential, *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 2020; 6(1): 27-34.
- Hao XY, Bergh J, Brodin O, Hellman U, Mannervik B. Acquired resistance to cisplatin and doxorubicin in a small cell lung cancer cell line is correlated to elevated expression of glutathione-linked detoxification enzymes. *Carcinogenesis.* 1994; 15(6): 1167-73.
- Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, Kameyama H, Hasegawa K, Niimori-Kita K, Ito T. Notch1 controls cell chemoresistance in small cell lung carcinoma cells. *Thorac Cancer.* 2016; 7(1): 123-8.
- He Y, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Kinzler KW. The antisense transcriptomes of human cells. *Science.* 2008; 322: 1855-7.
- Heestand GM, Schwaederle M, Gatalica Z, Arguello D, Kurzrock R. Topoisomerase expression and amplification in solid tumours: Analysis of 24,262 patients. *Eur J Cancer.* 2017; 83: 80-87.
- Hillion J, Wood LJ, Mukherjee M, Bhattacharya R, Di Cello F, Kowalski J, Elbahloul O, Segal J, Poirier J, Rudin CM, Dhara S, Belton A, Joseph B, Zucker S, Resar LM. Upregulation of MMP-2 by HMGA1 promotes transformation in undifferentiated, large-cell lung cancer. *Mol Cancer Res.* 2009; 7(11): 1803-12.
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13(10): 714-26.
- Hong SK, Kim JH, Starenki D, Park JI. Autophagy sensitivity of neuroendocrine lung tumor cells. *Int J Oncol.* 2013; 43(6): 2031-8.
- Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel).* 2014; 6(3): 1769-92.
- <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/36134,siy2018trpdf.pdf?0>
- <https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>
- [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_Istatistikleri\\_2015.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf)
- <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-11351>
- <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-119>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Huang W, Yang Y, Wu J, Niu Y, Yao Y, Zhang J, Huang X, Liang S, Chen R, Chen S, Guo L. Circular RNA cESRP1 sensitises small cell lung cancer cells to chemotherapy by sponging miR-93-5p to inhibit TGF- $\beta$  signalling. *Cell Death Differ.* 2020; 27(5): 1709-27.
- Huang YE, Zhou S, Liu H, Zhou X, Yuan M, Hou F, Wang L, Jiang W. Identification of drug resistance associated ncRNAs based on comprehensive heterogeneous network. *Life Sci.* 2020; 243: 117256.
- Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med.* 2015; 21(11): 1253-61.

- Hurley JH, Young LN. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu Rev Biochem.* 2017; 86: 225-44.
- Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, Isagawa T, Jones MH, Virtanen C, Shimane M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E, Ishikawa S, Aburatani H, Nomura H, Ishikawa Y. Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization. *Oncogene.* 2005; 24(47): 7105-13.
- Inamura K. Lung Cancer: Understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Front Oncol.* 2017; 7: 193.
- Islami F, Torre LA, Jemal A. Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Transl Lung Cancer Res.* 2015; 4(4): 327-38.
- Janikova M, Zizkova V, Skarda J, Kharraishvili G, Radova L, Kolar Z. Prognostic significance of miR-23b in combination with P-gp, MRP and LRP/MVP expression in non-small cell lung cancer. *Neoplasma.* 2016; 63(4): 576-87.
- Jassem J. The role of radiotherapy in lung cancer: where is the evidence? *Radiother Oncol.* 2007; 83(2): 203-13.
- Jett JR, Schild SE, Kesler KA, Kalemkerian GP. Treatment of small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; 143: e400S-419S.
- Jiang W, Xia J, Xie S, Zou R, Pan S, Wang ZW, Assaraf YG, Zhu X. Long non-coding RNAs as a determinant of cancer drug resistance: Towards the overcoming of chemoresistance via modulation of lncRNAs. *Drug Resist Updat.* 2020; 50: 100683.
- Jiang YZ, Liu YR, Xu XE, Jin X, Hu X, Yu KD, Shao ZM. Transcriptome analysis of triple-negative breast cancer reveals an integrated mRNA-lncRNA signature with predictive and prognostic value. *Cancer Res.* 2016; 76(8): 2105-14.
- Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, Shu Y. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer.* 2019; 18(1): 157.
- Jokić M, Vlašić I, Rinneburger M, Klümper N, Spiro J, Vogel W, Offermann A, Kämpers C, Fritz C3, Schmitt A, Riabinska A, Wittersheim M, Michels S, Ozretić L, Florin A, Welcker D, Akyuz MD, Nowak M, Erkel M, Wolf J, Büttner R, Schumacher B, Thomale J, Persigehl T, Maintz D, Perner S, Reinhardt HC. *Erc1* deficiency promotes tumorigenesis and increases cisplatin sensitivity in a Tp53 context-specific manner. *Mol Cancer Res.* 2016; 14(11): 1110-23.
- Kameda T, Takahashi K, Kim R, Jiang Y, Movahed M, Park EK, Rantanen J. Asbestos: use, bans and disease burden in Europe. *Bull World Health Organ.* 2014; 92(11): 790-7.
- 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.
- Kanwal M, Ding XJ, Cao Y. Familial risk for lung cancer. *Oncol Lett.* 2017; 13(2):535-42.
- Karachaliou N, Pilotto S, Lazzari C, Bria E, de Marinis F, Rosell R. Cellular and molecular biology of small cell lung cancer: an overview. *Transl Lung Cancer Res.* 2016; 5(1): 2-15.
- Kartal-Yandim M, Adan-Gokbulut A, Baran Y. Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Crit Rev Biotechnol.* 2016; 36(4): 716-26.
- Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Frith M, Ravasi T, Pang KC, Hallinan J, Mattick J, Hume DA, Lipovich L, Batalov S, Engström PG, Mizuno Y, Faghihi MA, Sandelin A, Chalk AM, Mottagui-Tabar S, Liang Z, Lenhard B, Wahlestedt C; RIKEN Genome Exploration Research Group; Genome Science Group (Genome Network Project Core Group); FANTOM Consortium. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science.* 2005; 309: 1564-66.
- Kettunen E, Hernandez-Vargas H, Cros MP, Durand G, Le Calvez-Kelm F, Stuopelyte K, Jarmalaite S, Salmenkivi K, Anttila S, Wolff H, Herceg Z, Husgafvel-Pursiainen K. Asbestos-associated genome-wide DNA methylation changes in lung cancer. *Int J Cancer.* 2017; 141(10): 2014-29.

- Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016; 13(5): 273-90.
- Kim AS, Ko HJ, Kwon JH, Lee JM. Exposure to secondhand smoke and risk of cancer in never smokers: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15(9).
- Kim CH, Lee YC, Hung RJ, McNallan SR, Cote ML, Lim WY, Chang SC, Kim JH, Ugolini D, Chen Y, Liloglou T, Andrew AS, Onega T, Duell EJ, Field JK, Lazarus P, Le Marchand L, Neri M, Vineis P, Kiyohara C, Hong YC, Morgenstern H, Matsuo K, Tajima K, Christiani DC, McLaughlin JR, Bencko V, Holcatova I, Boffetta P, Brennan P, Fabianova E, Foretova L, Janout V, Lissowska J, Mates D, Rudnai P, Szeszenia-Dabrowska N, Mukeria A, Zaridze D, Seow A, Schwartz AG, Yang P, Zhang ZF. Exposure to secondhand tobacco smoke and lung cancer by histological type: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Int J Cancer*. 2014; 135(8): 1918-30.
- Kim DK, Seo EJ, Choi EJ, Lee SI, Kwon YW, Jang IH, Kim SC, Kim KH, Suh DS, Seong-Jang K, Lee SC, Kim JH. Crucial role of HMGA1 in the self-renewal and drug resistance of ovarian cancer stem cells. *Exp Mol Med*. 2016; 48(8): e255.
- Kim YH, Girard L, Giacomini CP, Wang P, Hernandez-Boussard T, Tibshirani R, Minna JD, Pollack JR. Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene*. 2006; 25(1): 130-8.
- Kirchner P, Bourdenx M, Madrigal-Matute J, Tiano S, Diaz A, Bartholdy BA, Will B, Cuervo AM. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS Biol*. 2019; 17(5): e3000301.
- Kogita A, Togashi Y, Hayashi H, Sogabe S, Terashima M, De Velasco MA, Sakai K, Fujita Y, Tomida S, Takeyama Y, Okuno K, Nakagawa K, Nishio K. Hypoxia induces resistance to ALK inhibitors in the H3122 non-small cell lung cancer cell line with an ALK rearrangement via epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol*. 2014; 45(4): 1430-6.
- Koinis F, Kotsakis A, Georgoulas V. Small cell lung cancer (SCLC): no treatment advances in recent years. *Transl Lung Cancer Res*. 2016; 5(1): 39-50.
- Koshiyama M, Yoshida M, Fujii H, Konishi M, Nanno H, Hayashi M, Tauchi K. Expression of multidrug resistance-associated protein in endometrial carcinomas: correlation with clinicopathology and prognosis. *Ann Diagn Pathol*. 1999; 3(2): 81-7.
- Kou F, Sun H, Wu L, Li B, Zhang B, Wang X, Yang L. TOP2A promotes lung adenocarcinoma cells' malignant progression and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *J Cancer*. 2020; 11(9): 2496-508.
- Krewski D, Lubin JH, Zielinski JM, Alavanja M, Catalan VS, Field RW, Klotz JB, Létourneau EG, Lynch CF, Lyon JL, Sandler DP, Schoenberg JB, Steck DJ, Stolwijk JA, Weinberg C, Wilcox HB. A combined analysis of North American case-control studies of residential radon and lung cancer. *J Toxicol Environ Health A*. 2006; 69(7): 533-97.
- Krewski D, Lubin JH, Zielinski JM, Alavanja M, Catalan VS, Field RW, Klotz JB, Létourneau EG, Lynch CF, Lyon JI, Sandler DP, Schoenberg JB, Steck DJ, Stolwijk JA, Weinberg C, Wilcox HB. Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiology*. 2005; 16(2): 137-45.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 2010; 40(2): 280-93.
- Kuang P, Chen P, Wang L, Li W, Chen B, Liu Y, Xu Y, Wang H, Zhao S, Ye L, Yu F, Ji H, He Y. RNA sequencing analysis of small cell lung cancer reveals candidate chemotherapy insensitivity long noncoding RNAs and microRNAs. *Ann Transl Med*. 2020; 8(4): 121.
- Leary M, Heerboth S, Lapinska K, Sarkar S. Sensitization of drug resistant cancer cells: A matter of combination therapy. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(12).
- Lee HM, Joh JW, Seo SR, Kim WT, Kim MK, Choi HS, Kim SY, Jang YJ, Sinn DH, Choi GS, Kim JM, Kwon CHD, Chang HJ, Kim DS, Ryu CJ. Cell-surface major vault protein promotes cancer

- progression through harboring mesenchymal and intermediate circulating tumor cells in hepatocellular carcinomas. *Sci Rep.* 2017 Oct; 7(1): 13201.
- Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1856(2): 189-210.
- Lennox KA, Behlke MA. Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(2): 863-77.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132(1): 27-42.
- Li G, Hu X, Sun L, Li X, Li J, Li T, Zhang X. C-fos upregulates P-glycoprotein, contributing to the development of multidrug resistance in HEP-2 laryngeal cancer cells with VCR-induced resistance. *Cell Mol Biol Lett.* 2018; 23: 6.
- Li J, Ni L, Dong C. Immune checkpoint receptors in cancer: redundant by design? *Curr Opin Immunol.* 2017; 45: 37-42.
- Li L, Wang M, Mei Z, Cao W, Yang Y, Wang Y, Wen A. lncRNAs HIF1A-AS2 facilitates the up-regulation of HIF-1 $\alpha$  by sponging to miR-153-3p, whereby promoting angiogenesis in HUVECs in hypoxia. *Biomed Pharmacother.* 2017; 96: 165-72.
- Li Q, Ma R, Zhang M. CoCl<sub>2</sub> increases the expression of hypoxic markers HIF-1 $\alpha$ , VEGF and CXCR4 in breast cancer MCF-7 cells. *Oncol Lett.* 2018; 15(1): 1119-24.
- Li QQ, Xie YK, Wu Y, Li LL, Liu Y, Miao XB, Liu QZ, Yao KT, Xiao GH. Sulforaphane inhibits cancer stem-like cell properties and cisplatin resistance through miR-214-mediated downregulation of c-MYC in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(7): 12067-80.
- Li S, Wei Q, Li Q, Zhang B, Xiao Q. Down-regulating HIF-1 $\alpha$  by lentivirus-mediated shRNA for therapy of triple negative breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2015; 16(6): 866-75.
- Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69(7): 1125-36.
- Li X, Shen JK, Hornicek FJ, Xiao T, Duan Z. Noncoding RNA in drug resistant sarcoma. *Oncotarget.* 2017; 8(40): 69086-104.
- Li X, Zhou Y, Li Y, Yang L, Ma Y, Peng X, Yang S, Liu J, Li H. Autophagy: A novel mechanism of chemoresistance in cancers. *Biomed Pharmacother.* 2019; 119: 109415.
- Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, Zhang DM, Chen ZS. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer.* 2017; 36(1): 52.
- Li Z, Zhao X, Zhou Y, Liu Y, Zhou Q, Ye H, Wang Y, Zeng J, Song Y, Gao W, Zheng S, Zhuang B, Chen H, Li W, Li H, Li H, Fu Z, Chen R. The long non-coding RNA HOTTIP promotes progression and gemcitabine resistance by regulating HOXA13 in pancreatic cancer. *J Transl Med.* 2015; 13: 84.
- Lim SM, Choi JW, Hong MH, Jung D, Lee CY, Park SY, Shim HS, Sheen S, Kwak KI, Kang DR, Cho BC, Kim HR. Indoor radon exposure increases tumor mutation burden in never-smoker patients with lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2019; 131: 139-46.
- Lin H, Zhao Z, Hao Y, He J, He J. Long noncoding RNA HIF1A-AS2 facilitates cell survival and migration by sponging miR-33b-5p to modulate SIRT6 expression in osteosarcoma. *Biochem Cell Biol.* 2020; 98(2): 284-92.
- Lin J, Shi Z, Yu Z, He Z. LncRNA HIF1A-AS2 positively affects the progression and EMT formation of colorectal cancer through regulating miR-129-5p and DNMT3A. *Biomed Pharmacother.* 2018; 98: 433-39.
- Liu K, Gao L, Ma X, Huang JJ, Chen J, Zeng L, Ashby CR Jr, Zou C, Chen ZS. Long non-coding RNAs regulate drug resistance in cancer. *Mol Cancer.* 2020; 19(1): 54.
- Liu L, Gerson SL. Targeted modulation of MGMT: clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(2): 328-31.
- Liu L, Zhao WM, Yang XH, Sun ZQ, Jin HZ, Lei C, Jin B, Wang HJ. Effect of inhibiting Beclin-1 expression on autophagy, proliferation and apoptosis in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2017; 14(4): 4319-24.

- Liu LM, Xiong DD, Lin P, Yang H, Dang YW, Chen G. DNA topoisomerase 1 and 2A function as oncogenes in liver cancer and may be direct targets of nitidine chloride. *Int J Oncol.* 2018; 53(5): 1897-912.
- Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Human P-glycoprotein contains a greasy ball-and-socket joint at the second transmission interface. *J Biol Chem.* 2013; 288(28): 20326-33.
- Lu Y, Zhou X, Xu L, Rong C, Shen C, Bian W. Long noncoding RNA ANRIL could be transactivated by c-Myc and promote tumor progression of non-small-cell lung cancer. *Oncotargets Ther.* 2016; 9: 3077-84.
- Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract.* 2005; 14(1): 35-48.
- Ma C, Wei S, Song Y. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *J Thorac Dis.* 2011; 3(1): 10-8.
- Ma CP, Liu H, Yi-Feng Chang I, Wang WC, Chen YT, Wu SM, Chen HW, Kuo YP, Shih CT, Li CY, Tan BC. ADAR1 promotes robust hypoxia signaling via distinct regulation of multiple HIF-1 $\alpha$ -inhibiting factors. *EMBO Rep.* 2019; 20(5).
- Macanas-Pirard P, Broekhuizen R, González A, Oyanadel C, Ernst D, García P, Montecinos VP, Court F, Ocqueteau M, Ramirez P, Nervi B. Resistance of leukemia cells to cytarabine chemotherapy is mediated by bone marrow stroma, involves cell-surface equilibrative nucleoside transporter-1 removal and correlates with patient outcome. *Oncotarget.* 2017; 8(14): 23073-86.
- Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J.* 2016; 48(3): 889-902.
- Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv Pharm Bull.* 2017; 7(3): 339-48.
- Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J.* 2015; 17(1): 65-82.
- Marcus JL, Leyden WA, Chao CR, Horberg MA, Klein DB, Quesenberry CP Jr, Towner WJ, Silverberg MJ. Immunodeficiency, AIDS-related pneumonia, and risk of lung cancer among HIV-infected individuals. *AIDS.* 2017; 31(7): 989-93.
- Massó-Vallés D, Beaulieu ME, Soucek L. MYC, MYCL and MYCN as therapeutic targets in lung cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2020; 24(2):101-14.
- Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(12): 961-7.
- McFadyen MC, McLeod HL, Jackson FC, Melvin WT, Doehmer J, Murray GI. Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62(2): 207-12.
- Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH. Combined action and regulation of phase II enzymes and multidrug resistance proteins in multidrug resistance in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2008; 34(6): 505-20.
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics.* 2009; 10(3): 155-9.
- Michael M, Doherty MM. Tumoral drug metabolism: Overview and its implications for cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 205-29.
- Mineo M, Ricklefs F, Rooj AK, Lyons SM, Ivanov P, Ansari KI, Nakano I, Chiocca EA, Godlewski J, Bronisz A. The long non-coding RNA HIF1A-AS2 facilitates the maintenance of mesenchymal glioblastoma stem-like cells in hypoxic niches. *Cell Rep.* 2016; 15(11): 2500-9.
- Mishra A, Ali Z, Vibhuti A, Kumar R, Alam P, Ram R, Thinlas T, Mohammad G, Pasha MA. CYBA and GSTP1 variants associate with oxidative stress under hypobaric hypoxia as observed in high-altitude pulmonary oedema. *Clin Sci (Lond).* 2012; 122(6): 299-309.
- Mishra MV, Louie AV, Gondi V, Slotman B. The evolving role of radiotherapy in the management of small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2018; 10(21): 2545-54.

- Moore AM, Einhorn LH, Estes D, Govindan R, Axelson J, Vinson J, Breen TE, Yu M, Hanna NH. Gefitinib in patients with chemo-sensitive and chemo-refractory relapsed small cell cancers: a Hoosier Oncology Group phase II trial. *Lung Cancer*. 2006; 52(1): 93-7.
- Moorehead RA, Singh G. Influence of the proto-oncogene c-fos on cisplatin sensitivity. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59(4): 337-45.
- Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40: 6391-400.
- Morrow CS, Smitherman PK, Townsend AJ. Combined expression of multidrug resistance protein (MRP) and glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) in MCF7 cells and high level resistance to the cytotoxicities of ethacrynic acid but not oxazaphosphorines or cisplatin. *Biochem Pharmacol*. 1998; 56(8): 1013-21.
- Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*. 2007; 59(12): 752-7.
- Munroe SH, Lazar MA. Inhibition of c-erbA mRNA splicing by a naturally occurring antisense RNA. *J Biol Chem*. 1991; 266: 22083-6.
- Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015; 3: 83-92.
- Nanayakkara AK, Follit CA, Chen G, Williams NS, Vogel PD, Wise JG. Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 967.
- Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83(8): 1084-103.
- Nooter K, Brutel de la Riviere G, Look MP, van Wingerden KE, Henzen-Logmans SC, Scheper RJ, Flens MJ, Klijn JG, Stoter G, Foekens JA. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1997; 76(4): 486-93.
- Norris MD, Bordow SB, Marshall GM, Haber PS, Cohn SL, Haber M. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996; 334(4): 231-8.
- Nuurva K, Mäkitaro R, Huhti E, Kamel D, Vähäkangas K, Bloigu R, Soini Y, Pääkkö P. p53 protein accumulation in lung carcinomas of patients exposed to asbestos and tobacco smoke. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150(2): 528-33.
- Ogino S, Konishi H, Ichikawa D, Matsubara D, Shoda K, Arita T, Kosuga T, Komatsu S, Shiozaki A, Okamoto K, Kishimoto M, Otsuji E. Glutathione S-transferase Pi 1 is a valuable predictor for cancer drug resistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2019; 110(2): 795-804.
- Ohmori T, Podack ER, Nishio K, Takahashi M, Miyahara Y, Takeda Y, Kubota N, Funayama Y, Ogasawara H, Ohira T, Ohta S, Saijo N. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993; 192(1): 30-6.
- O'Keefe LM, Taylor G, Huxley RR, Mitchell P, Woodward M, Peters SAE. Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2018; 8(10): e021611.
- Okuma HS, Horinouchi H, Kitahara S, Asao T, Sunami K, Goto Y, Kanda S, Fujiwara Y, Nokihara H, Yamamoto N, Ohe Y. Comparison of amrubicin and weekly cisplatin/etoposide/irinotecan in patients with relapsed small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2017; 18(2): 234-40.
- Olcina MM, Grand RJ, Hammond EM. ATM activation in hypoxia - causes and consequences. *Mol Cell Oncol*. 2014; 1(1): e29903.
- Ota E, Abe Y, Oshika Y, Iwasaki M, Inoue H, Yamazaki H, Ueyema Y, Takagi K, Ogata T, Tamaoki N, Nakamura M. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1995; 72(3): 550-4.

- Pan J, Li X, Wu W, Xue M, Hou H, Zhai W, Chen W. Long non-coding RNA UCA1 promotes cisplatin/gemcitabine resistance through CREB modulating miR-196a-5p in bladder cancer cells. *Cancer Lett.* 2016; 382(1): 64-76.
- Pan XN, Chen JJ, Wang LX, Xiao RZ, Liu LL, Fang ZG, Liu Q, Long ZJ, Lin DJ. Inhibition of c-Myc overcomes cytotoxic drug resistance in acute myeloid leukemia cells by promoting differentiation. *PLoS One.* 2014; 9(8): e105381.
- Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005; 2(3): e73.
- Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(3): 460-73.
- Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, Bièche I. ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J.* 2011; 25: 444-8.
- Pathania S, Bhatia R, Baldi A, Singh R, Rawal RK. Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance. *Biomed Pharmacother.* 2018; 105: 53-65.
- Paz-Elizur T, Krupsky M, Blumenstein S, Elinger D, Schechtman E, Livneh Z. DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(17): 1312-9.
- Pérès B, Nasr R, Zariouh M, Lecerf-Schmidt F, Di Pietro A, Baubichon-Cortay H, Boumendjel A. Ferrocene-embedded flavonoids targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer cells through collateral sensitivity. *Eur J Med Chem.* 2017; 130: 346-53.
- Pignon JP, Arriagada R, Ihde DC, Johnson DH, Perry MC, Souhami RL, Brodin O, Joss RA, Kies MS, Lebeau B. A meta-analysis of thoracic radiotherapy for small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 1992; 327(23): 1618-24.
- Pirker R, Filipits M. From crizotinib to lorlatinib: continuous improvement in precision treatment of ALK-positive non-small cell lung cancer. *ESMO Open.* 2019; 4(5): e000548.
- Premkumar DR, Adhikary G, Overholt JL, Simonson MS, Cherniack NS, Prabhakar NR. Intracellular pathways linking hypoxia to activation of c-fos and AP-1. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 475: 101-9.
- Qiu YF, Liu ZG, Yang WJ, Zhao Y, Tang J, Tang WZ, Jin Y, Li F, Zhong R, Wang H. Research progress in the treatment of small cell lung cancer. *J Cancer.* 2017; 8(1): 29-38.
- Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet.* 2016; 17(1): 47-62.
- Ragin C, Obikoya-Malomo M, Kim S, Chen Z, Flores-Obando R, Gibbs D, Koriyama C, Aguayo F, Koshiol J, Caporaso NE, Carpagnano GE, Ciotti M, Dosaka-Akita H, Fukayama M, Goto A, Spandidos DA, Gorgoulis V, Heideman DA, van Boerdonk RA, Hiroshima K, Iwakawa R, Kastrinakis NG, Kinoshita I, Akiba S, Landi MT, Eugene Liu H, Wang JL, Mehra R, Khuri FR, Lim WT, Owonikoko TK, Ramalingam S, Sarchianaki E, Syrjanen K, Tsao MS, Sykes J, Hee SW, Yokota J, Zaravinos A, Taioli E. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis.* 2014; 35(6): 1267-75.
- Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Leiby MA, Lubiniecki GM, Shentu Y, Rangwala R, Brahmer JR; KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2016; 375(19): 1823-33.
- Rice AJ, Park A, Pinkett HW. Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014; 49(5): 426-37.
- Rinaldi M, Cauchi C, Gridelli C. First line chemotherapy in advanced or metastatic NSCLC. *Ann Oncol.* 2006; 17(5): 64-7.
- Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, Gadgeel SM, Hida T, Kowalski DM, Dols MC, Cortinovis DL, Leach J, Polikoff J, Barrios C, Kabbinar F, Frontera OA, De Marinis F, Turna H, Lee JS, Ballinger M, Kowanetz M, He P, Chen DS, Sandler A, Gandara DR; OAK Study Group. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously

- treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017; 389(10066): 255-65.
- Rizvi NA, Hellmann MD, Brahmer JR, Juergens RA, Borghaei H, Gettinger S, Chow LQ, Gerber DE, Laurie SA, Goldman JW, Shepherd FA, Chen AC, Shen Y, Nathan FE, Harbison CT, Antonia S. Nivolumab in combination with platinum-based doublet chemotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2016; 34(25): 2969-79.
- Rodriguez E, Lilenbaum RC. Small cell lung cancer: past present and future. *CurrD Oncol Rep*. 2010; 12: 327-34.
- Rodriguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*. 2006; 25(11): 1679-91.
- Rowbotham SP, Kim CF. Diverse cells at the origin of lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(13): 4745-6.
- Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, Dive C, Dowlati A, George J, Heymach JV, Johnson JE, Lehman JM, MacPherson D, Massion PP, Minna JD, Oliver TG, Quaranta V, Sage J, Thomas RK, Vakoc CR, Gazdar AF. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer*. 2019; 19(5): 289-97.
- Rupniewska E, Roy R, Mauri FA, Liu X, Kaliszczak M, Bellezza G, Cagini L, Barbareschi M, Ferrero S, Tommasi AM, Aboagye E, Seckl MJ, Pardo OE. Targeting autophagy sensitises lung cancer cells to Src family kinase inhibitors. *Oncotarget*. 2018; 9(44): 27346-62.
- Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi P.P. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*. 2011; 146: 353-8.
- Salustiano EJ, da Costa KM, Freire-de-Lima L, Mendonça-Previato L, Previato JO. Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reverts multidrug resistance by differentially modulating ABC transporters in chronic myeloid leukemias. *J Biol Chem*. 2020; 295(19): 6457-71.
- Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, Plummer R, Calvert H, Weller M, Wick W. Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(10): 2900-8.
- Sarode P, Mansouri S, Karger A, Schaefer MB, Grimminger F, Seeger W, Savai R. Epithelial cell plasticity defines heterogeneity in lung cancer. *Cell Signal*. 2020; 65: 109463.
- Sartorius UA, Krammer PH. Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2002; 97(5): 584-92.
- Sauna ZE, Ambudkar SV. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(1): 13-23.
- Schultheiss CS, Laggai S, Czepukojc B, Hussein UK, List M, Barghash A, Tierling S, Hosseini K, Golob-Schwarzl N, Pokorny J, Hachenthal N, Schulz M, Helms V, Walter J, Zimmer V, Lammert F, Bohle RM, Dandolo L, Haybaeck J, Kiemer AK, Kessler SM. The long non-coding RNA *H19* suppresses carcinogenesis and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Cell Stress*. 2017; 1(1): 37-54.
- Seedhouse CH, Grundy M, White P, Li Y, Fisher J, Yakunina D, Moorman AV, Hoy T, Russell N, Burnett A, Pallis M; National Cancer Research Network. Sequential influences of leukemia-specific and genetic factors on p-glycoprotein expression in blasts from 817 patients entered into the National Cancer Research Network acute myeloid leukemia 14 and 15 trials. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(23): 7059-66.
- Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 2008; 9(1): 105-27.
- Sharom FJ. Complex interplay between the P-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: its role in modulating protein function. *Front Oncol*. 2014; 4: 41.
- Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, Kim DW, Camidge DR, Solomon BJ, Varella-Garcia M, Iafrate AJ, Shapiro G, Usari T, Wang SC, Wilner KD, Clark JW, Ou SI. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol*. 2019; 30(7): 1121-6.

- Shen M, Xu Z, Xu W, Jiang K, Zhang F, Ding Q, Xu Z, Chen Y. Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; 38(1): 149.
- Shi R, Peng H, Yuan X, Zhang X, Zhang Y, Fan D, Liu X, Xiong D. Down-regulation of c-fos by shRNA sensitizes adriamycin-resistant MCF-7/ADR cells to chemotherapeutic agents via P-glycoprotein inhibition and apoptosis augmentation. *J Cell Biochem.* 2013; 114(8): 1890-900.
- Sholl LM. Large-cell carcinoma of the lung: a diagnostic category redefined by immunohistochemistry and genomics. *Curr Opin Pulm Med.* 2014; 20(4): 324-31.
- Shu Y, Zhu L, Yuan F, Kong X, Huang T, Cai YD. Analysis of the relationship between PM2.5 and lung cancer based on protein-protein interactions. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2016; 19(2): 100-8.
- Shue YT, Lim JS, Sage J. Tumor heterogeneity in small cell lung cancer defined and investigated in pre-clinical mouse models. *Transl Lung Cancer Res.* 2018; 7(1): 21-31.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020; 70(1): 7-30.
- Sigel K, Makinson A, Thaler J. Lung cancer in persons with HIV. *Curr Opin HIV AIDS.* 2017; 12(1): 31-8.
- Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, Cappuzzo F, Paolini J, Usari T, Iyer S, Reisman A, Wilner KD, Tursi J, Blackhall F; PROFILE 1014 Investigators. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2014; 371(23): 2167-77.
- Srinivasan M, Taioli E, Ragin CC. Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers-a meta-analysis. *Carcinogenesis.* 2009; 30(10): 1722-8.
- Sun K, Deng W, Zhang S, Cai N, Jiao S, Song J, Wei L. Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells. *Cell Biosci.* 2013; 3(1): 35.
- Sun Q, Fan W, Zhong Q. Regulation of Beclin 1 in autophagy. *Autophagy.* 2009; 5(5): 713-6.
- Sun WL, Lan D, Gan TQ, Cai ZW. Autophagy facilitates multidrug resistance development through inhibition of apoptosis in breast cancer cells. *Neoplasma.* 2015; 62(2): 199-208.
- Sun Y, Hu B, Wang Q, Ye M, Qiu Q, Zhou Y, Zeng F, Zhang X, Guo Y, Guo L. Long non-coding RNA HOTTIP promotes BCL-2 expression and induces chemoresistance in small cell lung cancer by sponging miR-216a. *Cell Death Dis.* 2018; 9(2): 85.
- Suraya A, Nowak D, Sulistomo AW, Ghanie Ieksan A, Syahrudin E, Berger U, Bose-O'Reilly S. Asbestos-related lung cancer: a hospital-based case-control study in Indonesia. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(2).
- Tan Q, Wang M, Yu M, Zhang J, Bristow RG, Hill RP, Tannock IF. Role of autophagy as a survival mechanism for hypoxic cells in tumors. *Neoplasia.* 2016; 18(6): 347-55.
- Taymaz-Nikerel H, Karabekmez ME, Eraslan S, Kırdar B. Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 13672.
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011; 21(7): 440-6.
- Thrash-Bingham CA, Tartof KD. aHIF: a natural antisense transcript overexpressed in human renal cancer and during hypoxia. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(2): 143-51.
- Timofeeva MN, Hung RJ, Rafnar T, Christiani DC, Field JK, Bickeböller H, Risch A, McKay JD, Wang Y, Dai J, Gaborieau V, McLaughlin J, Brenner D, Narod SA, Caporaso NE, Albanes D, Thun M, Eisen T, Wichmann HE, Rosenberger A, Han Y, Chen W, Zhu D, Spitz M, Wu X, Pande M, Zhao Y, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Krokan HE, Gabrielsen ME, Skorpen F, Vatten L, Njølstad I, Chen C, Goodman G, Lathrop M, Benhamou S, Vooder T, Välk K, Nelis M, Metspalu A, Raji O, Chen Y, Gosney J, Liloglou T, Muley T, Dienemann H, Thorleifsson G, Shen H, Stefansson K, Brennan P, Amos CI, Houlston R, Landi MT; Transdisciplinary Research in Cancer of the Lung

- (TRICL) Research Team. Influence of common genetic variation on lung cancer risk: meta-analysis of 14 900 cases and 29 485 controls. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(22): 4980-95.
- Tiseo M, Boni L, Ambrosio F, Camerini A, Baldini E, Cinieri S, Brighenti M, Zanelli F, Defraia E, Chiari R, Dazzi C, Tibaldi C, Turolla GM, D'Alessandro V, Zilembo N, Trolese AR, Grossi F, Riccardi F, Ardizzoni A. Italian, multicenter, phase III, randomized study of cisplatin plus etoposide with or without bevacizumab as first-line treatment in extensive-disease small-cell lung cancer: The GOIRC-AIFA FARM6PMFJM Trial. *J Clin Oncol.* 2017; 35(12): 1281-7.
- Towers CG, Thorburn A. Therapeutic targeting of autophagy. *EBioMedicine.* 2016; 14: 15-23.
- Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 2003; 22(47): 7369-75.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I; WHO Panel. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol.* 2015; 10(9): 1243-60.
- Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol.* 2013; 31: 992-1001.
- Tsay JJ, Tchou-Wong KM, Greenberg AK, Pass H, Rom WN. Aryl hydrocarbon receptor and lung cancer. *Anticancer Res.* 2013; 33(4): 1247-56.
- Tsiouprou I, Zaharias A, Spyrtos D. The role of immunotherapy in extensive stage small-cell lung cancer: A review of the literature. *Can Respir J.* 2019; 2019: 6860432.
- Turner MC1, Krewski D, Pope CA 3rd, Chen Y, Gapstur SM, Thun MJ. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184(12): 1374-81.
- Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem.* 2004; 279(15): 14871-8.
- Ughachukwu P, Unekwe P. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. *Ann Med Health Sci Res.* 2012; 2(2): 191-8.
- Ulvestad B, Kjaerheim K, Martinsen JI, Damberg G, Wannag A, Mowe G, Andersen A. Cancer incidence among workers in the asbestos-cement producing industry in Norway. *Scand J Work Environ Health.* 2002; 28(6): 411-7.
- Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Viñals F, Capellá G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(1): 3-10.
- Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics.* 2009; 3(3): 281-90.
- Videtic GM. The role of radiotherapy in small cell lung cancer: a revisit. *Curr Oncol Rep.* 2015; 17(8): 37.
- Walser T, Cui X, Yanagawa J, Lee JM, Heinrich E, Lee G, Sharma S, Dubinett SM. Smoking and lung cancer: the role of inflammation. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5(8): 811-5.
- Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, Chen N, Sun F, Fan Q. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 5366-83.
- Wang L, Giannoudis A, Lane S, Williamson P, Pirmohamed M, Clark RE. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 83(2): 258-64.
- Wang S, Tsui ST, Liu C, Song Y, Liu D. EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2016; 9(1): 59.

- Wang X, Peng L, Gong X, Zhang X, Sun R. LncRNA HIF1A-AS2 promotes osteosarcoma progression by acting as a sponge of miR-129-5p. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(24): 11803-13.
- Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist*. 2019; 2: 141-60.
- Wang Y, Zhang D, Wu K, Zhao Q, Nie Y, Fan D. Long noncoding RNA MRUL promotes ABCB1 expression in multidrug-resistant gastric cancer cell sublines. *Mol Cell Biol*. 2014; 34(17): 3182-93.
- Wang Y, Zhang G, Han J. HIF1A-AS2 predicts poor prognosis and regulates cell migration and invasion in triple-negative breast cancer. *J Cell Biochem*. 2019; 120(6): 10513-8.
- Wang YT, Pan SH, Tsai CF, Kuo TC, Hsu YL, Yen HY, Choong WK, Wu HY, Liao YC, Hong TM, Sung TY, Yang PC, Chen YJ. Phosphoproteomics reveals HMGA1, a CK2 substrate, as a drug-resistant target in non-small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2017; 7: 44021.
- Warde P, Payne D. Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage small-cell carcinoma of the lung? A meta-analysis. *J Clin Oncol*. 1992; 10(6): 890-5.
- Wegner MS, Gruber L, Mattjus P, Geisslinger G, Grösch S. The UDP-glucose ceramide glycosyltransferase (UGCG) and the link to multidrug resistance protein 1 (MDR1). *BMC Cancer*. 2018; 18(1): 153.
- Wegner MS, Schömel N, Gruber L, Örtel SB, Kjellberg MA, Mattjus P, Kurz J, Trautmann S, Peng B, Wegner M, Kaulich M, Ahrends R, Geisslinger G, Grösch S. UDP-glucose ceramide glucosyltransferase activates AKT, promoted proliferation, and doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Cell Mol Life Sci*. 2018; 75(18): 3393-410.
- Wei JW, Tafe LJ, Linnik YA, Vaickus LJ, Tomita N, Hassanpour S. Pathologist-level classification of histologic patterns on resected lung adenocarcinoma slides with deep neural networks. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 3358.
- Werner MS, Ruthenburg AJ. Nuclear fractionation reveals thousands of chromatin-tethered noncoding RNAs adjacent to active genes. *Cell Rep*. 2015; 12: 1089-98
- Westover D, Li F. New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015; 34: 159.
- White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, Zannettino A, Lynch K, Manley PW, Hughes T. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood*. 2007; 110(12): 4064-72.
- Wigerup C, Pählman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther*. 2016; 164: 152-69.
- Williams MD, Zhang X, Belton AS, Xian L, Huso T, Park JJ, Siems WF, Gang DR, Resar LM, Reeves R, Hill HH Jr. HMGA1 drives metabolic reprogramming of intestinal epithelium during hyperproliferation, polyposis, and colorectal carcinogenesis. *J Proteome Res*. 2015; 14(3): 1420-31.
- Wohlkoenig C, Leithner K, Olschewski A, Olschewski H, Hrzjenjak A. TR3 is involved in hypoxia-induced apoptosis resistance in lung cancer cells downstream of HIF-1 $\alpha$ . *Lung Cancer*. 2017; 111: 15-22.
- Wolfer A, Ramaswamy S. MYC and metastasis. *Cancer Res*. 2011; 71(6): 2034-7.
- Wu D, Yang N, Xu Y, Wang S, Zhang Y, Sagnelli M, Hui B, Huang Z, Sun L. lncRNA HIF1A antisense RNA 2 modulates trophoblast cell invasion and proliferation through upregulating PHLDA1 expression. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019; 16: 605-15.
- Wu R, Ruan J, Sun Y, Liu M, Sha Z, Fan C, Wu Q. Long non-coding RNA HIF1A-AS2 facilitates adipose-derived stem cells (ASCs) osteogenic differentiation through miR-665/IL6 axis via PI3K/Akt signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 9(1): 348.
- Xiao YS, Zeng D, Liang YK, Wu Y, Li MF, Qi YZ, Wei XL, Huang WH, Chen M, Zhang GJ. Major vault protein is a direct target of Notch1 signaling and contributes to chemoresistance in triple-negative breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2019; 440-441: 156-67.

- Xie SM, Fang M, Guo H, Zhong XY. Silencing of MGMT with small interference RNA reversed resistance in human BCUN-resistant glioma cell lines. *Chin Med J (Engl)*. 2011; 124(17): 2605-10.
- Xu Z, Yan Y, Qian L, Gong Z. Long non-coding RNAs act as regulators of cell autophagy in diseases (Review). *Oncol Rep*. 2017; 37(3): 1359-66.
- Xue X, Yang YA, Zhang A, Fong KW, Kim J, Song B, Li S, Zhao JC, Yu J. LncRNA HOTAIR enhances ER signaling and confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Oncogene*. 2016; 35(21): 2746-55.
- Yang X, Bai F, Xu Y, Chen Y, Chen L. Intensified Beclin-1 Mediated by Low Expression of Mir-30a-5p Promotes Chemoresistance in Human Small Cell Lung Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 43(3): 1126-39.
- Yang Z, Hackshaw A, Feng Q, Fu X, Zhang Y, Mao C, Tang J. Comparison of gefitinib, erlotinib and afatinib in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer*. 2017; 140(12): 2805-19.
- Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*. 2016; 3(12): 588-96.
- Ying L, Chen Q, Wang Y, Zhou Z, Huang Y, Qiu F. Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Biosyst*. 2012; 8(9): 2289-94.
- Yu Y, Yang A, Hu S, Yan H. Correlation of HPV-16/18 infection of human papillomavirus with lung squamous cell carcinomas in Western China. *Oncol Rep*. 2009; 21(6): 1627-32.
- Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem*. 2017; 61(6): 585-96.
- Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol*. 2013; 4: 28.
- Zhang P, Wu W, Chen Q, Chen M. Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinform*. 2019; 16(3): 20190027.
- Zhang W, Yuan W, Song J, Wang S, Gu X. LncRNA CPS1-IT1 suppresses EMT and metastasis of colorectal cancer by inhibiting hypoxia-induced autophagy through inactivation of HIF-1 $\alpha$ . *Biochimie*. 2018; 144:21-7.
- Zhang XW, Bu P, Liu L, Zhang XZ, Li J. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 462(3): 227-32.
- Zhang Y, Zhang L, Wang Y, Ding H, Xue S, Yu H, Hu L, Qi H, Wang Y, Zhu W, Liu D, Li P. KCNQ1OT1, HIF1A-AS2 and APOA1-AS are promising novel biomarkers for diagnosis of coronary artery disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019; 46(7): 635-42.
- Zheng HC. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*. 2017; 8(35): 59950-64.
- Zheng M. Classification and pathology of lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016; 25(3): 447-68.
- Zhou J, Li Z, Li J, Gao B, Song W. Chemotherapy resistance molecular mechanism in small cell lung cancer. *Curr Mol Med*. 2019; 19(3): 157-63.
- Zhou M, Xie Y, Xu S, Xin J, Wang J, Han T, Ting R, Zhang J, An F. Hypoxia-activated nanomedicines for effective cancer therapy. *Eur J Med Chem*. 2020; 195: 112274.
- Zhu J, Fu H, Wu Y, Zheng X. Function of lncRNAs and approaches to lncRNA-protein interactions. *Sci China Life Sci*. 2013; 56: 876-85.
- Zugazagoitia J, Molina-Pinelo S, Lopez-Rios F, Paz-Ares L. Biological therapies in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*. 2017; 49(3).

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                   |                      |                     |                     |
|-------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Adı</b>        | Ebru                 | <b>Soyadı</b>       | GÜÇLÜ               |
| <b>Doğum Yeri</b> | Sarıkamış            | <b>Doğum Tarihi</b> | 30.06.1987          |
| <b>E-mail</b>     | ebruavc.87@gmail.com | <b>Uyruğu</b>       | Türkiye Cumhuriyeti |

### Eğitim Düzeyi

|                      | <b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>   | <b>Mezuniyet Yılı</b> |
|----------------------|---|-----------------------|
| <b>Lisans</b>        | Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü                               | 2009                  |
| <b>Yüksek Lisans</b> | Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü                     | 2012                  |
| <b>Yüksek Lisans</b> | Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji A.D.            | 2015                  |
| <b>Doktora</b>       | Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji A.D. | 2020                  |

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

| <b>Görevi</b>          | <b>Kurum</b>                   | <b>Süre (Yıl - Yıl)</b> |
|------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| 1. Araştırma Görevlisi | Necmettin Erbakan Üniversitesi | 2015-                   |
| 2. Araştırma Görevlisi | Selçuk Üniversitesi            | 2013-2015               |

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>Yabancı Dil</b> | İngilizce |
|--------------------|-----------|

## 9. EKLER

### EK A. Etik Kural Kararı

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ  
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

|                           |                                    |
|---------------------------|------------------------------------|
| <b>Toplantı Sayısı:57</b> | <b>Toplantı Tarihi: 17.11.2017</b> |
|---------------------------|------------------------------------|

**Karar Sayısı:2017/1075;**Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hasibe VURAL' ın "Uzun kodlamayan RNA HIF1A-AS2'nin küçük hücreli akciğer kanserinde otofaji ile ilişkili kemoterapötik dirençteki etkinliğinin araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 14.11.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Arş. Gör. Ebru AVCI' nın doktora tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hasibe VURAL' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.  
Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Hasibe VURAL  
Yardımcı Araştırmacı: Arş. Gör. Ebru AVCI

**ASLI GİBİDİR**  
17.11.2017

**Prof. Dr. Ayşe S. SAHİN**  
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkan Yardımcısı