

**T.C.**  
**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**  
**MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GALLİK ASİT'İN MEZOTELYOMA HÜCRE SİNYALLERİNE**  
**ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**GÜLŞİFE CANDEMİR**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE**

**2014**

**T.C.**  
**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**  
**MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GALLİK ASİT'İN MEZOTELYOMA HÜCRE**  
**SİNYALLERİNE ETKİSİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**GÜLŞİFE CANDEMİR**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI**  
**YRD. DOÇ. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU**

**GEBZE**  
**2014**



**GEBZE YÜKSEK  
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

## YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/01/2014 tarih ve 2014/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 22/01/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Gülşife Candemir'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd.Doç.Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Prof.Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Doç.Dr. Ali TÜRKAN

### ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Malignant Mezotelioma (MM), mezodermal kökenli dokuların serosal boşluklarından kaynaklanan agresif ve öldürücü bir tümördür. MM vakaları endüstrinin gelişimiyle bağlantılı olarak ve asbestle yaygın muamele sonucunda son yirmi yılda yükselmiştir. Ülkemizde, Anadolu'nun kırsal alanlarında, özellikle İç ve Güneydoğu bölgelerinde oldukça ciddi bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. MM hastalığı'nın tedavisinde kullanılan geleneksel kemoterapötiklerin yetersiz kalması yeni uygulama ve ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Bu tez çalışmasında, bitkilerde doğal olarak bulunan polifenollerden Gallik Asit (GA)'in mezotelyoma hücre proliferasyonu ile Epidermal Büyüme faktörü reseptörü (EGFR), ekstrasellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase (ERK/MAPK), stresle active olan protein kinase/c-jun terminal kinase (SAPK/JNK), p38 ve PI3K/AKT sinyal yollarına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle GA'in hücre proliferasyonuna etkisi doz ve zamana bağımlı olarak incelenmiştir. Daha sonra GA'in EGFR, ERK, JNK, p38 MAPK ve AKT proteinlerinin fosforilasyon ve ekspresyon seviyelerine etkisi değerlendirilmiştir. İlaveten, EGFR sinyali alt yolağında aktive olduğu bilinen transkripsiyon faktörleri ELK-1, JUN, STAT1, STAT3 ve STAT5A değişimleri mRNA seviyesinde incelenmiştir.

Sonuçlarımız doğrultusunda, GA kontrol (Met5A) ve MM (SPC212) hücre proliferasyonunu baskımlarken kontrol hücrelerinde daha az sitotoksiste göstermiştir. Protein analizleri, GA'in EGFR, ERK1/2 ve AKT fosforilasyonlarının konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak baskıladığını göstermiştir. p38 MAPK fosforilasyonu GA uygulamasıyla artış gösterirken JNK fosforilasyonlarında değişim belirlenmemiştir. mRNA analizleri GA'in kısa zamanlı olarak STAT1, STAT3, STAT5 ve Elk-1 seviyelerini anlamlı şekilde azalttığını işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler: Mezotelyoma, GA, EGFR, Polifenol, Sinyal İletimi.**

## SUMMARY

Malignant mesothelioma (MM), is an aggressive and lethal tumor, originates from mesodermal-derived tissues of serosal cavities. The worldwide incidence of MM has risen dramatically during the past two decades as a result of widespread exposure to asbestos together with industrialization. In our country, this disease continues to be a serious public health problem in rural areas of Anatolia and particularly Central and South-Eastern parts. The failures of conventional chemotherapeutic regimens have made the search for and the development of new drugs and novel approaches critically important. In our project the impacts of Gallic Acid (GA) were investigated on MM cell proliferation and signal transduction molecules including Epidermal Growth Factor (EGFR) extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase (ERK/MAPK), stress activated protein kinase/c-jun terminal kinase (SAPK/JNK), p38 MAPK.

Our results indicated that GA suppressed both control (Met5A) ve MM (SPC212) cell proliferation. However it was less cytotoxic to control than tumor cells. In addition GA suppressed EGFR, ERK1/2 ve AKT phosphorylation at concentration and time dependent manner. Moreover although p38 MAPK phosphorylations were induced, JNK phosphorylations were unchanged after GA treatments. mRNA analysis showed that STAT1, STAT3 and Elk-1 levels were down regulated shortly.

**Key Words: Mesothelioma, GA, EGFR, Polyphenol, Signal Transduction.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanım olarak her konuda desteklerini gördüğüm, bu çalışmayı yapabilmem için gerekli olanakları sağlayan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Asuman D. Zergeroğlu'na;

Laboratuardaki yoğun deneysel çalışma sürecinde, yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Fatma Sağır, Ebru Turhanlar, Nurettin Ayvalı, Zeynep Yılmaz, Ekin Kestevur, Onur Çalışkaner, Mehmet Sarıhan ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma;

Ve çalışmalarım süresince maddi, manevi desteklerini gördüğüm her zaman motivasyonumu artıran anneme, yardımını benden hiçbir zaman esirgemeyen fedakâr kardeşim Ali İhsan Candemir'e, bu süreçte hep yanımda olan canım dostum Meryem Aygün'e gösterdikleri sabır ve anlayış için en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. KANSER	3
2.1. Kanserde Sinyal İletimi	4
2.2. Mezotelyoma	13
2.2.1. Mezotelyomada Sinyal İletimi	17
2.3. Mezotelyoma Tedavisi	19
2.4. Polifenoller ve Kanser	20
2.4.1. Gallik Asit	22
3. MATERYAL ve METOD	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Cihazlar	27
3.1.2. Kimyasal Maddeler	27
3.1.3. Kullanılan Ajan ve Solüsyonlar	28
3.2. Metod	30
3.2.1. Hücre Kültürü ve Hücre Pasajlama	30
3.2.2. Hücre Saklama	30
3.2.3. MTS Hücre Proliferasyon Testi	30
3.2.4. Protein İzolasyonu	31
3.2.4.1. Hücre Lizizi	31
3.2.4.2. Protein Miktar Tayini	32
3.2.5. SDS-PAGE ve Western Blotlama	32

3.2.6. Real Time Analizleri	34
3.2.6.1. RNA İzolasyonu	34
3.2.6.2. cDNA Sentezi	34
3.2.7. RT-PCR	35
4. BULGULAR	36
4.1. Gallik Asit'in Met5A ve SPC212 Hücre Proliferasyonuna Etkisi	36
4.2. GA'in EGFR ve MAPK Sinyal Yolaklarına Etkisi	37
4.3. GA'in PI3K/Akt Yolağına Etkisi	39
4.4. GA'in mRNA Seviyesine Etkisi	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	52

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
NF-κB	: Nükleer faktör-κB
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α
AP-1	: Aktive Edici protein 1
BCA	: Bicinchoninic Acid
DEPC	: Dietilpirokarbonat
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
GA	: Gallik Asit
HB-EGF	: Heparin-Bağlayıcı EGF
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
JAK	: Janus Kinase
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
MAPK	: Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz
MM	: Malignant Mezotelyoma
MPM	: Malign Plevral Mezotelyoma
MTS	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium Salt
NSCL	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
38 MAPK	: p38 Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGFR	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
PI3K	: Phosphoinositol 3 kinase
PVDF	: Polivinilidin diflorür
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPM	: Rat Plevral Mezoyelyal
SAPK/JNK	: Stres Aktifleyici Protein Kinaz/ c-Jun N-terminal Kinaz
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	: SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

**STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription**

# ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1: İyi huylu ve kötü huylu tümör karşılaştırması.	4
2.2: EGFR ailesi üyeleri.	5
2.3: EGFR'ın yapısı.	5
2.4: İki alt ünite arasında bağlantı oluşumu.	6
2.5: EGFR sinyal yolağı.	7
2.6: Extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade.	7
2.7: EGFR sinyali. Ligandın bağlanması reseptör dimerizasyonuna, otofosforilasyona ve alt sinyal yolakların aktivasyonuna neden olur. Sadece seçili yolaklar ve transkripsiyon faktörleri gösterilmiştir.	8
2.8: Mitojenle aktive olan protein kinaz sinyal yolaklarının aktivasyonu.	9
2.9: Aktive olan EGFR'ın alt sinyal yolakları.	10
2.10: EGFR onkogenik sinyaline neden olan mekanizmalar.	11
2.11: EGFR yolağında Cetuximab'ın etkisi.	12
2.12: EGFR sinyalini hedefleyen terapiler.	12
2.13: MAPK yolaklarının ROS aracılı aktivasyonu.	14
2.14: Asbestos fiberlerinin patogenezi.	15
2.15: Mezotelyal hücrelerde asbestos fiberleri yada SV40 enfeksiyonuyla harekete geçen sinyal yolakları.	16
2.16: Mezotelyoma patogenezindeki yolaklar.	17
2.17: EGFR proteinin yapısı.	18
2.18: Besin polifenollerinin sınıflandırılması.	20
2.19: Karsinogenezin basamakları.	21
2.20: GA'in kimyasal yapısı.	23
2.21: Çeşitli kanser hücre hatlarında GA'in etkisi.	24
2.22: GA'in inhibitör etkisi.	25

2.23:	GA'in etkisi.	25
4.1:	a) Met5A ve b) SPC212 hücrelerine GA'in Kontrol, 50, 75 ,100 ve 200 $\mu$ M'lık dozların etkisi. Çiftli yapılan 3 bağımsız deney sonuçlarının ortalamaları alınarak Excel programında hesaplanmıştır. İstatitkisel analizler SPSS programı yardımıyla ANOVA'da Benferoni ve Dunnett's testi ile hesaplanmıştır. p değeri *P<0,005 ve #p<0,001 olarak belirlenmiştir.	37
4.2:	a) EGFR ve b) ERK proteinleirinin GA'in etkisine bağımlı olarak doz ve zaman-bağımlı değişimi. 1-4 (6sa), 5-8 (12sa), 9-12 (24sa) göstermektedir.	38
4.3:	a) JNK, a) c-jun ve b) p38 protein miktarının GA uygulamasıyla etkisinin incelenmesi. 1-4 (6 sa), 5-8 (12 sa), 9-12 (24 sa) göstermektedir.	39
4.4:	Akt protein miktarının GA etkisinde doz ve zaman bağımlı değişimi. 1-4 (6sa), 5-8 (12sa), 9-12 (24sa)'i göstermektedir.	40
4.5:	a) GA (100 $\mu$ M)'in zamana bağılı olarak jun ve Elk1 transkripsiyon faktörlerinin b) Stat1, Stat3, Stat5 mRNA seviyelerine olan etkisi. Oneway ANOVA kullanılarak Benferoni ve Dunnet's testleriyle SPSS programında analiz edilmiştir. P<0.05 olarak belirlenmiştir.	41

# TABLÖLAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1: SDS poliakrilamid jelin içerdđđi kimyasal maddeler ve jelin yoğunluğuna göre değişen madde miktarları aşığıdaki tabloda gösterilmiştir.	33

# 1. GİRİŞ

Günümüzde yaygın olarak görülen kanser tedavisinde çeşitli ajanlar uygulanılmaktadır. Bununla birlikte bazı kanserler hariç etkin ve yan etkisi az bir ajan bulunmamaktadır. Meyve, sebze, tohum ve içeceklerde bulunan polifenollerinin hücre çoğalması ve hücre ölümünde görev yapan proteinleri düzenlemeleri nedeniyle farklı tipteki kanserlere karşı koruyucu etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [Kang et al., 2011]. İlaveten anti-proliferatif özellikleri nedeniyle bu moleküller kanser tedavisinde oldukça ilgi görmektedir.

Gallik Asit (GA yada 3,4,5-trihydroxyl-benzoic acid) bitkilerde, meyvelerde ve çeşitli besinlerde bulunan fenolik bileşiklerden birisidir. Anti-bakterial, anti-viral ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olmasının yanı sıra çeşitli kanser tiplerinde de anti-kanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmemiştir. Bazı kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, GA'in hücre proliferasyonunu ve hayatta kalımı etkileyen sinyal yollarını baskıladığı, hücre büyümesini etkileyerek apoptoza yol açtığı gösterilmiştir [You and Park, 2010].

Malign mezotelyoma (MM) akciğerleri, karın içi ve kalbi saran zar boşluklarının seröz yüzeylerinden köken alan bir tümördür [Ngo et al., 2011]. MM'da bilinen risk faktörleri; asbestos fiberleri, simian virus 40 (SV40), radyasyon ve erionite'dir [Zucali et al., 2011]. MM'da hücre proliferasyonu ve hayatta kalımda önem teşkil eden epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir [Agarwal et al., 2010]. EGFR hücre dışı ligand bağlama, transmembran ve hücre içi tirozin kinaz aktivitesine sahip 3 ana domainden oluşan bir tirozin kinaz reseptörüdür. Ligand bağlanmasına bağlı olarak tirozin kinaz aktivasyonunun yükselmesiyle tirozin rezidüleri transfosforilasyona uğrayarak sinyal kaskadını başlatır [Favoni et al., 2011]. Yeşil çay, elma, kırmızı şarap flavonoidlerin, EGFR fosforilasyonunu engelleyerek aşağı akımlı olayları baskıladığı ve hücre büyümesini de engellediği belirlenmiştir. Bunlara ilaveten bu flavonoidlerin, ERK1/2 inhibisyonu p38 ile JNK1/2 proteinlerin aktivasyonuna neden olduğu böylelikle çoğalmayı engellediği; Kaspaz 3 aktivasyonu ile Akt ve ERK inhibisyonuna neden olarak apoptoza yol açtığı vurgulanmıştır [Kang et al., 2011]. Epigallocatechin ve GA esteri olan epigallocatechin gallate'in bazı insan kanser hücrelerinde, EGFR'ün fosforilasyonunu ve alt sinyal yollarını baskıladığı ilaveten, Erb-2'yi de içeren

diğer reseptör tirozin kinaz'ların (RTK) aktivasyonunu da inhibe ettiği belirtilmiştir [Hou et al., 2005].

## **1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği**

Bu tezde mezotelyoma (Met5A) ve MM (SPC212) hücrelerinde GA'in konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonu ile EGFR'ın bağlantılı alt yollarda yer alan moleküllere etkisinin araştırılması planlanmıştır. Bu çalışma sonucunda GA'nın MM hücreleri üzerindeki antiproliferatif mekanizmasına moleküler seviyede açıklık getirerek GA'in MM tedavisinde kullanılmaya aday olabilecek bir ajan olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda GA'in *in vitro* olarak mezotelyoma ve MM hücre proliferasyonuna etkisi konsantrasyon MTS analizleriyle değerlendirilmiştir. EGFR, MAPK yolları (ERK, JNK, p38) ile PI3K/AKT yolağında yer alan anahtar moleküller fosforilasyon ve toplam protein seviyesinde araştırılmıştır. İlâveten EGFR aktivasyonu ile indüklendiği bilinen transkripsiyon faktörleri (STAT1, STAT3, STAT5A, c-jun, c-fos) mRNA seviyesinde zamana bağlı olarak belirlenmiştir.

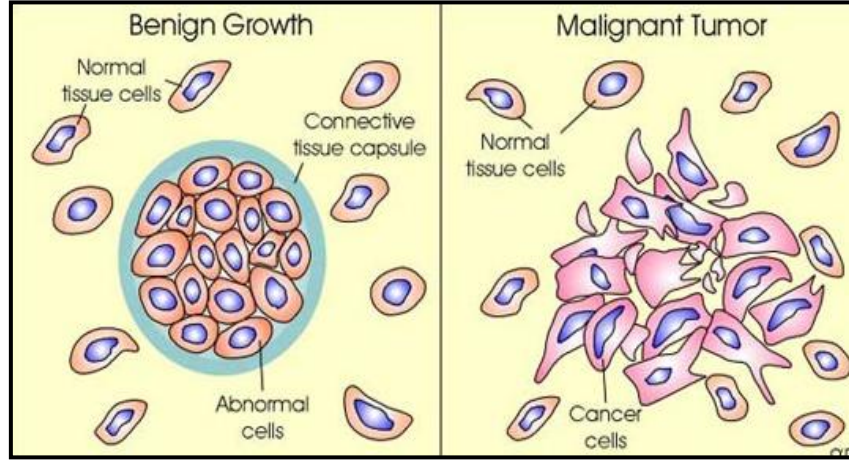
## 2. KANSER

Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen, pozitif ve negatif mekanizmaların dengesindeki bozulmalar sonucu oluşmaktadır. Normal hücrelerde görülen hücre büyümesi ve ölümü arasındaki denge kanser hücresinde bozulmuştur. Karsinogenez, farklı moleküler ve hücrenel değişikliklerin meydana geldiği kompleks ve çok basamaklı bir süreçtir. Hücre çeşitliliğine bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösteren yüzden fazla değişik kanser türü bulunmaktadır. Bir kanser tipi farklı bireylerde dahi değişiklik gösterebilmektedir [Ramos, 2008]. Hücresel düzeyde kanser mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç olarak çoğalma, canlı kalma, invazyon ve metastaz yetenekleri artan hücrelerin seçilmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle çoğu kanser ileri yaşlarda ortaya çıkar [Levitzki and Klein, 2010].

Hücre kültürlerinde normal hücreler kültür ortamında yoğunluk inhibisyonunun etkisiyle proliferasyonu durdururken, kanser hücreleri bu sinyallerden etkilenmezler. Buna ilaveten, kanser hücrelerinin büyüme faktörlerine olan gereksinimleri de azalarak çoğalmak için gerekli olanları da kendileri salgılayabilmektedirler. Kanser hücrelerinin normal hücrelerden diğer bir farkı, hücre çoğalmasını sağlayan sinyal yollarında görev yapan büyüme faktörü reseptörlerindeki ve onlara bağlı yollarda rol alan anahtar proteinlerin kontrolsüz aktiviteye sahip olmalarıdır. Kanser hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi de normal hücrelere göre daha düzensizdir. Yüzey adezyon moleküllerinin anlatımındaki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin tutunma yeteneği normal hücrelere kıyasla daha düşüktür.

Kanserler köken aldıkları doku ve hücre tipine göre sınıflandırılmaktadırlar. Epitel hücrelerinden köken alan kanserler karsinoma, bağ dokusu ya da kas hücrelerinden köken alanlar sarkoma olarak adlandırılmaktadırlar. Kan yapıcı hücrelerden türeyen çeşitli lösemiler ve sinir sistemi hücrelerinden türeyen kanserler ise diğer kategorideki kanser türleridir [Alberts et al., 2006].

İyi huylu (benign) olarak tanımlanan tümörlerde hücreler tek bir kütle içinde küme halinde durdukları için kütle, cerrahi yolla çıkartılarak tam tedavi genellikle sağlanabilir. Bir tümör ancak kötü huylu (malin) ise, yani hücreler etrafındaki dokuyu istila yeteneği kazanmışsa kanser olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.1) [Alberts et al., 2006].



Şekil 2.1: İyi huylu ve kötü huylu tümör karşılaştırması.

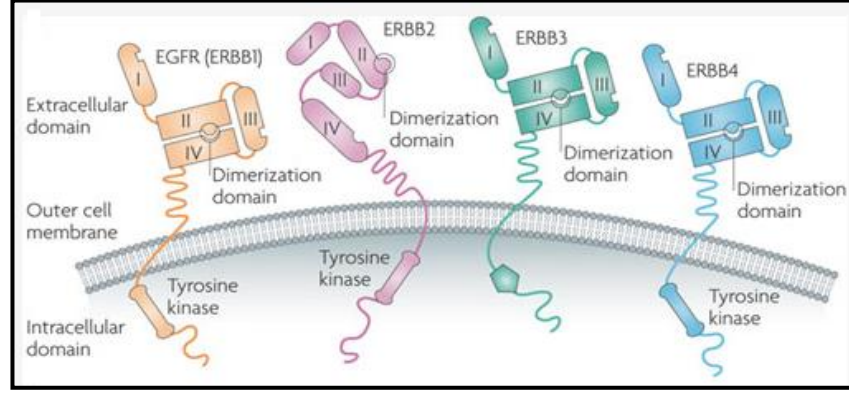
Metastaz, hücrelerin birincil tümörden ayrılarak, yerel dokular ve damarlar vasıtasıyla yayılarak uzak dokularda yeni hücre kolonileri kurmalarıyla oluşan bir durum olarak tanımlanmaktadır.

Kanserde uygun tedavi için, kanser hücrelerinin gelişme, üreme ve yayılmaları esnasında kazandıkları özel yeteneklerin detaylı olarak anlaşılması gerekmektedir. Bu özel yetenekler, hücre sinyal iletim yollarındaki değişiklikleri, tümör içindeki hücrelerin kendi çevrelerinden gelen ve normalde hücre gelişimini sıkı denetim altında tutan sinyalleri göz ardı etmelerini sağlamayı içermektedir. [Alberts et al., 2006].

## 2.1. Kanserde Sinyal İletimi

Normal hücre büyümesi sinyal iletim yollarının aktivasyonu boyunca düzenlenmektedir. Sinyal iletimindeki anormallikler değişen farklılaşma, artan çoğalma ve canlılık, apoptotik hücre ölümüne dayanıklılık, angiogenez, doku invazyonu ve metastaz gibi durumların oluşmasına neden olur.

Karsinogenez çok sayıda faktör arasında EGFR gibi onkogenlerin aktivasyonunu gerektirmektedir. EGF çok araştırılan RTK'lerden biri olarak reseptör ligandla aktive olan RTK'ların ErbB/HER ailesine aittir. Bu aile ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 ve ErbB4/HER4 reseptörlerini de içermektedir (Şekil 2.2) [Baselga and Swain, 2009].

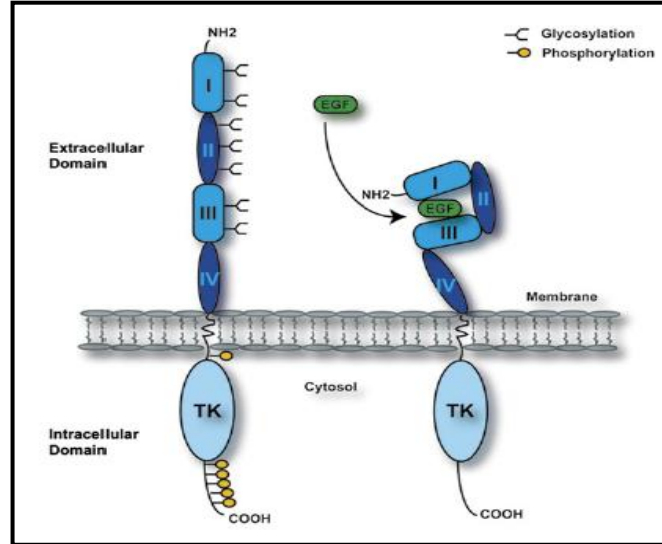


Şekil 2.2: EGFR ailesi üyeleri.

EGFR ve aile üyeleri hücre çoğalması, canlılık ve göçünü içeren hücrel işlemlerin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir [Takeuchi and Ito, 2009]. EGFR geni kromozomda 7p12-13'de bulunan 1186 aminoasitli tek polipeptid zincirinden oluşan 170 kDa'luk bir glikoprotein kodlar [Zandi et al., 2007].

EGFR üç ana domainle karakterize edilmektedir: hücre dışı ligand bağlama domaini, transmembran domanı ve tirozin kinaz içeren sitoplazmik domain.

Hücre dışı domaini ise dört altdomaine ayrılır: I, II, III ve IV. Bunlardan domain I, II ve III ligand bağlanma bölgesi oluşturmaktadır (Şekil 2.3) [Zandi et al., 2007].

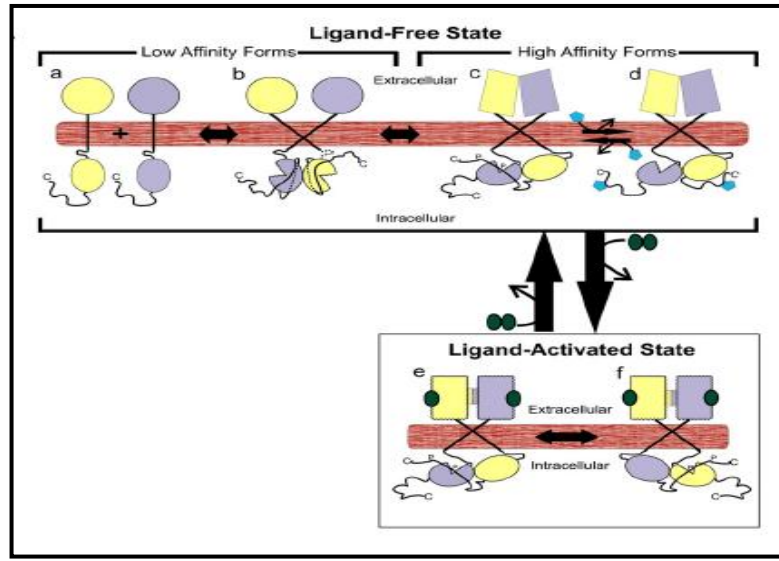


Şekil 2.3: EGFR'ın yapısı.

ErbB reseptörlerine bağlanıp aktive eden büyüme faktörleri, EGF ailesi büyüme faktörlerine aittir. EGF ile ilişkili büyüme faktörleri genellikle üç gruba

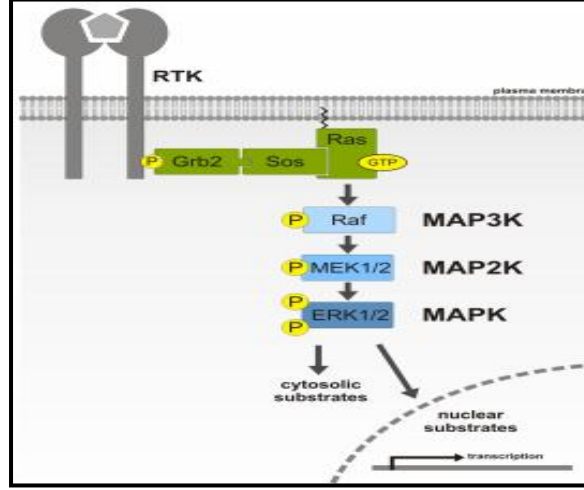
ayrılmaktadır. İlk grup EGFR'a bağlanan EGF, TGF- $\alpha$  ve amphiregulinden oluşmaktadır. İkinci grup, EGFR ve ErbB4'e çift bağlanma özgülüğüne sahip betacellulin, HB-EGF, epiregulin ve heregulin gibi büyüme faktörlerinden oluşmaktadır. Üçüncü grupta ErbB3 ve ErbB4'e bağlanan tomoregulin ve neuregulin yer almaktadır. Spesifik ligandan yoksun ErbB-2'nin dışında, EGF ilişkili büyüme faktörleri HER ailesinin üyeleri için farklı afiniteye sahiptir [Bianco et al., 2007].

Ligandın bağlanması EGFR'ın homo ve heterodimerler oluşturmasına neden olmaktadır. Çeşitli çalışmalar EGFR'ın ligand-bağımsız dimerler yada 'pre-dimer'ler oluşturabildiğini de göstermiştir (Şekil 2.4).



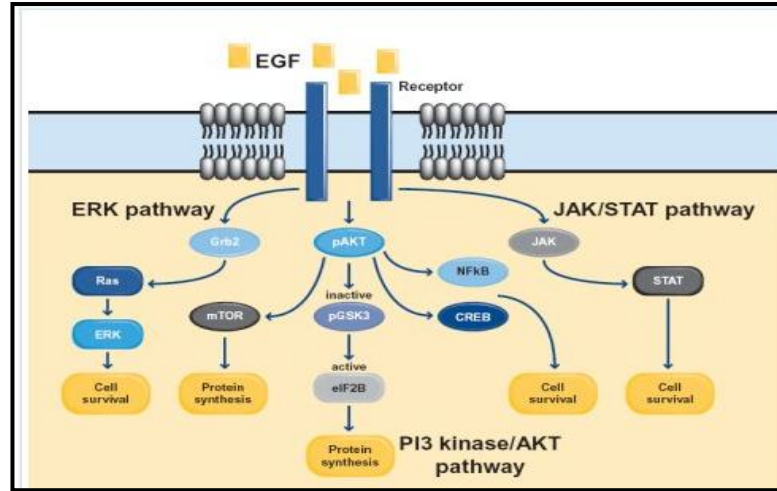
Şekil 2.4: İki alt ünite arasında bağlantı oluşumu.

EGF reseptörün aktivasyonu anahtar tirozin rezidülerin otoposforilasyonu ile sonuçlanmaktadır. Fosforile olan reseptörler Grb2 yada Shc adaptörün bağlanmasıyla ERK yolağını aktive ederek reseptör dimerine son of sevenless (SOS) bağlanmasıyla neticelenmektedir. Belirtilen bu adaptör moleküller ligand tipine, reseptör ekspresyon seviyesine ve EGFR dimerizasyon çiftine bağlı olarak farklı sinyal iletim yollarının aktivasyonuna aracılık etmektedir [Bianco et al., 2007]. Fosforlanan bölgeler proteinlerin Src homology 2 (SH2) domainlere bağlanmasını sağlayarak Ras/extracellular signal regulated kinase (ERK) yolağı, PI3K yolağı ve Janus Kinase/Signal transducer ile activator of transcription (JAK/STAT) yolağını içeren alt sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır (Şekil 2.5) [Web 1, 2013].



Şekil 2.5: EGFR sinyal yolağı.

Raf-1, MEK1 ve MEK2'yi fosforile ederek ERK1 ve ERK2'yi aktive etmektedir (Şekil 2.6) [Meister et al., 2013]. Bu yolak hücre çoğalmasına, Bcl-2 ailesi ve inhibitor of apoptosis (IAPs) proteinlerinin transkripsiyonunun yükselmesine böylece hücre canlılığının ilerlemesine neden olmaktadır [Hensen and Gibson, 2006].

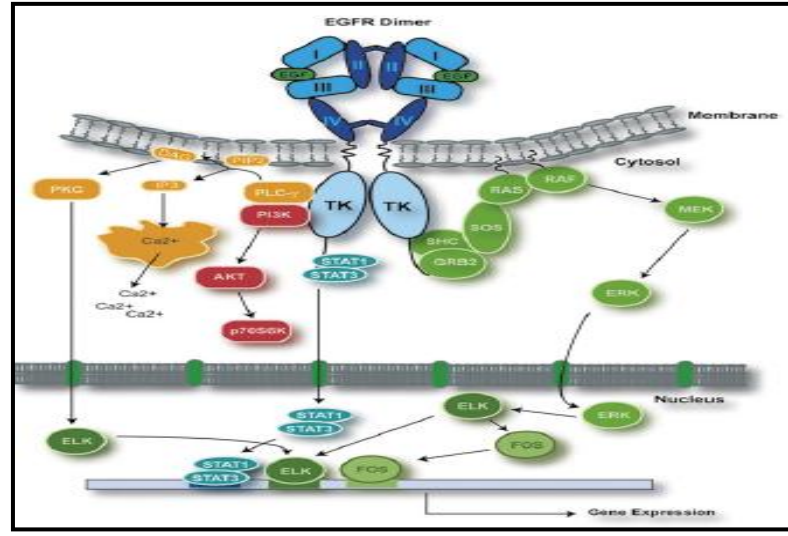


Şekil 2.6: Extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade.

MAPK'lar hücre dışı uyarıyı hücreye dönüştüren sinyal bileşenleridir. ERK, JNK ve p38'i de içeren protein serin/treonin kinaz ailesi üyesidir (Şekil 2.6). Aktivasyondan sonra MAPK'lar birçok transkripsiyon faktörü ve diğer protein kinazları içeren hedef substratların spesifik serin-treonin rezidülerini fosforile etmektedir. ERK1 ve ERK2 MAPK'lar çoğunlukla mitojenler tarafından

aktive edilmektedir [Cappuzzo et al., 2004]. İnsan tümörlerinde bu regülasyonunun arttığı tespit edilmiştir. ERK hücre çoğalmasıyla ilişkili transkripsiyon faktörlerini de aktive ederek normal hücre çoğalmasını pozitif yönde düzenlemektedir.

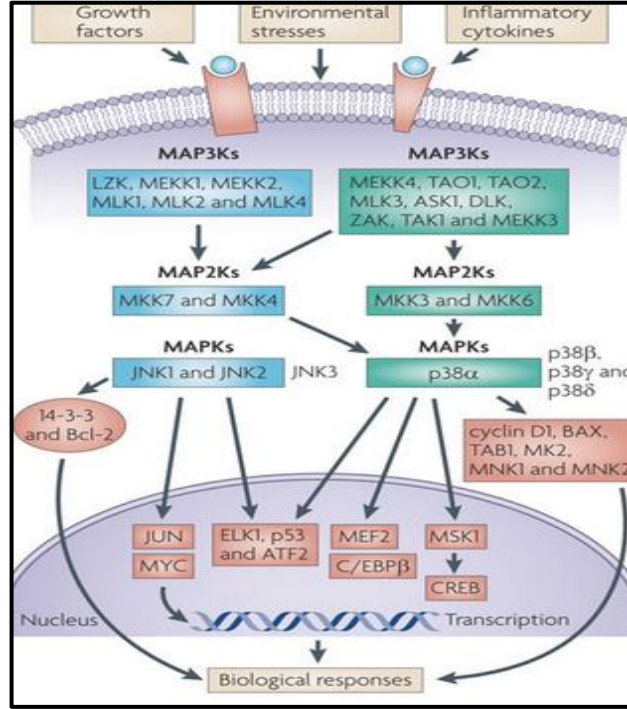
Elk1 transkripsiyon faktörü ERK1/2 tarafından fosforlanarak Elk1, c-Fos gibi erken-yanıt genlerin transkripsiyonunu başlatmaktadır (Şekil 2.7) [Takeuchi and Ito, 2009]. Proto-onkogen olan c-Fos, transformasyon, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi önemli hücre fonksiyonlarıyla ilişkili activating protein 1 (AP-1) transkripsiyon faktörünün önemli bir üyesidir.



Şekil 2.7: EGFR sinyali. Ligandın bağlanması reseptör dimerizasyonuna, otofosforilasyona ve alt sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur. Sadece seçili yollar ve transkripsiyon faktörleri gösterilmiştir.

MAPK yolları SAPK/JNK ve p38'dir. Bu yollar stresle aktive olan protein kinaz yolları olarak da adlandırılır [Takeuchi and Ito, 2009]. JNK proteinleri; JNK1, JNK2 ve JNK3 genleri tarafından kodlanmaktadır. JNK1 ve JNK2 çoğu hücrede ancak JNK3 esas olarak beyinde eksprese edilmektedir. JNK proteinleri MKK4 ve MKK7 kinazlarıyla aktive edilmektedir (Şekil 2.8) [Wagner and Nebreda, 2009]. Önemli bir JNK hedefi, fos ve jun aile üyelerinden oluşan transkripsiyon faktör AP1'dir ve JNK/JUN yolağı AP-1-bağlanma bölgeleri içeren hedef genleri düzenlenmektedir. Bu genler canlılık ve apoptozla birlikte hücre döngüsü, metaloproteinaz, retinoid gibi nükleer hormon reseptörlerini kontrol etmektedir. p38 MAPK'ları ise kodlayan dört gen bulunmaktadır. Bunlar izoformları p38- $\alpha$ , p38- $\beta$ , p38- $\gamma$  ve p38- $\delta$  izoformlarıdır. MKK3 ve MKK6 kinazlarla aktive edilmektedir. p38

MAPK aracılığıyla gerçekleşen fosforilasyonlarda iki grup protein bulunmaktadır. Bunlar: transkripsiyon faktörler (p53, ATF2, ELK1, MEF2 ve C/EBP $\beta$ ) ve protein kinazlardır (MAPK2, MSK1, MNK1 ve MNK2) (Şekil 2.8) [Wagner and Nebreda, 2009].

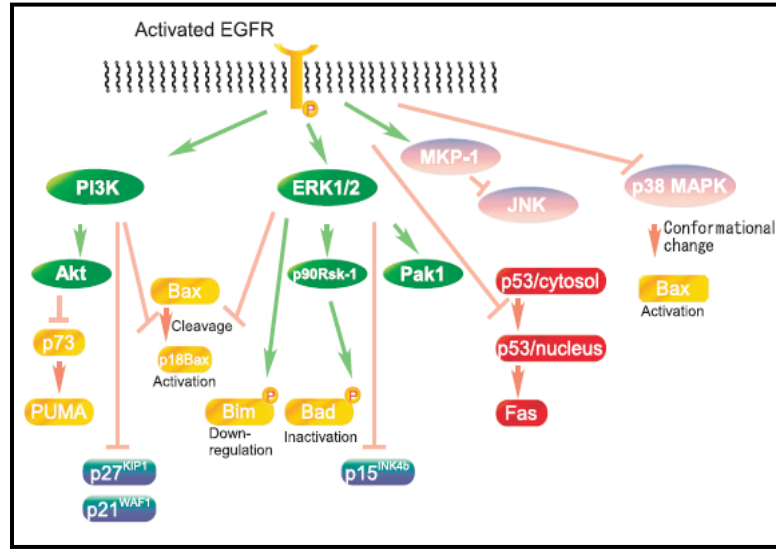


Şekil 2.8: Mitojenle aktive olan protein kinaz sinyal yollarının aktivasyonu.

p38 $\alpha$ 'nın tümör baskılayıcı rolünün olduğu ve bu fonksiyonunu hem hücre döngüsünü negatif olarak düzenleyerek hemde apoptozun indüksiyonuyla gerçekleştirdiği belirtilmiştir [Wagner and Nebreda, 2009]. p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$  fonksiyonel olarak yakından ilişkili proteinlerdir. p38 $\alpha$  çoğu hücre tipinde yüksek miktarda bulunurken p38 $\beta$ 'nin oldukça düşük seviyede eksprese edildiği, p38- $\gamma$  ve p38- $\delta$ 'nin daha sınırlı ekspresyonu olduğu bilinmektedir. Çevresel ve genotoksik stresle aktive olan ve inflamasyonda önemli rol oynayan JNK ve p38 yolları ayrıca hücre çoğalması, farklılaşması, canlılığı ve göçünü kontrol etmektedir [Wagner and Nebreda, 2009], [Bianco et al., 2007].

EGF ayrıca PI3 kinase/AKT siyalinin aktivasyonu ile hücre canlılığını ve hayatta kalımını sağlamaktadır. ErbB reseptörlerinin aktivasyonu, PI3 kinazın aktive edilmesi ve sırada anahtar downstream efektörü AKT/PKB aktivasyonu ile devam etmektedir. AKT antiapoptotik proteinlerin transkripsiyonu ile hücre canlılığını

sağlamaktadır [Lizcono and Alessi, 2001]. Bu yolağın aktivasyonu hücre canlılığı ve apoptoz arasındaki denge kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Bcl-2 aile üyesi Bad ve caspase-9'u içeren pro-apoptotik proteinleri ve hücre döngüsü düzenleyici molekülleri bu yolakları inaktive etmektedir. Ayrıca AKT'nin fonksiyonu hücreler ultraviyole radyasyon, büyüme faktörün yokluğu ve DNA hasarı gibi farklı apoptotik uyarılara maruz kaldığında, hücre canlılığı için önemlidir. AKT'nin ifadesinin artışı akciğer, pankreas, tiroid ve yumurtalık kanserlerinde gözlenmiştir. Son yıllarda Akt fosforilasyonunun artışı NSCLC hastalarının %60' ından fazlasında belirlenmiştir. MAPK ve PI3K/Akt sinyal yolaklarının hedefleri apoptoz ilişkili moleküller (Bcl-2 aile üyeleri ve Fas) ve hücre döngüsü düzenleyici moleküllerdir (p27<sup>KIP1</sup>) (Şekil 2.9) [Cappuzzo et al., 2004].

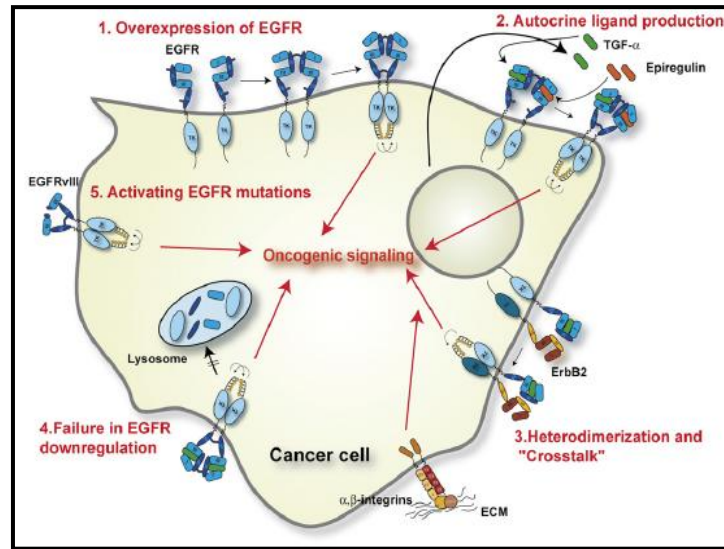


Şekil 2.9: Aktive olan EGFR'nin alt sinyal yolakları.

EGF ile aktive olan diğer bir sinyal yolağı JAK/STAT kaskatıdır. Bunların inaktivasyonu doğal yada sonradan kazanılan immün yanıt, hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesi, homeostazın korunması, organogenez yada embriyonik gelişim sırasında gerçekleşmektedir. JAK hücre membranında lokalize olan STAT proteinlerini fosforile ederek, STAT proteinlerinin nukleusa geçmesine neden olmaktadır. STAT transkripsiyon faktörleri, çoğalma, canlılık ve kendini yenileme gibi önemli hücrel olayların düzenleyicisidir. Birçok insan kanserlerinde aktive edilmekte ve düzensiz STAT aktivasyonu, malignan fenotipe neden olabilen genlerin artan transkripsiyonuna yol açmaktadır [Walker and Frank, 2012].

Yukarıda bahsedildiği gibi, EGFR hücre döngüsünün ilerlemesinde, apoptozda, anjiyogenez ve metastazdaki rolüne bağlı olarak kanser oluşumunda anahtar bir role sahiptir. Hücre çoğalması, hareketi ve canlılığında rol oynaması nedeniyle EGFR ligand sistemindeki bozukluk EGFR sinyalinde anormalliklere neden olmaktadır. Birçok insan kanserlerinde EGFR sinyali düzenlenmesi bozulmuştur [Wykosky et al., 2011]. Akciğer, baş ve boyun, kolon, pankreas, göğüs, yumurtalık, mesane ve böbrek kanserinde fazlaca ekprese edilir [Mitsudomi and Yatabe, 2010].

EGFR'nin onkogenik olduğu birkaç mekanizmalar içerisinde EGFR'nin overekspresyonunu, artan ligand üretimini, heterodimerizasyon ve cross-talk'u ve EGFR baskılanmasında bozukluk ile EGFR mutasyonlarını kapsamaktadır (Şekil 2.10) [Zandi et al., 2007].

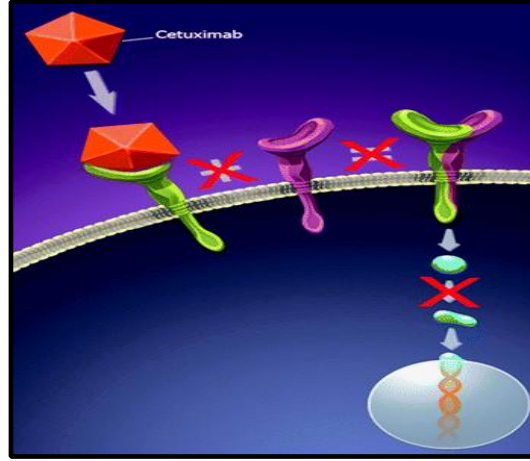


Şekil 2.10: EGFR onkogenik sinyaline neden olan mekanizmalar.

TGF- $\alpha$  ve EGF'nin sıklıkla çoğu kanser türünde EGFR ile birlikte ekprese olduğu bulunmuştur. Bu moleküllerin otkrin-parakrin olarak hareket ederek EGFR aktivasyonunun bozulmasına ve kontrolsüz tümör büyümesine neden olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle bu birleşimi engelleyen monoklonal antikolar üretilmiştir.

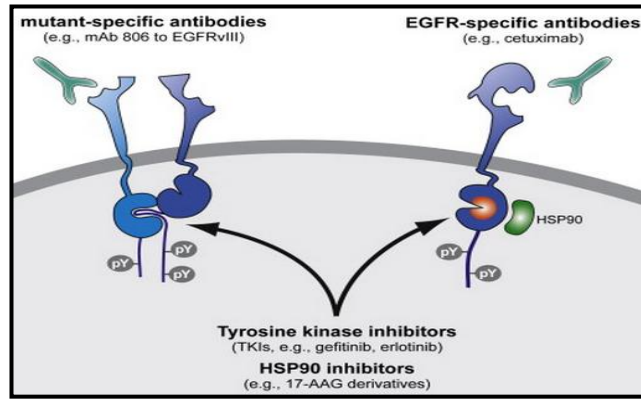
Bu antikolar EGFR'a bağlanarak ligandın reseptöre bağlanmasını ve aktive etmesini önler, böylelikle kanser hücre çoğalmasını inhibisyonuna neden olmaktadır.

Örneğin; Cetuximab EGFR'nin ekstraselüler domainine bağlanır aktivasyonu önlemektedir (Şekil 2.11) [Bou-Assaly and Mukherji, 2010].



Şekil 2.11: EGFR yolağında Cetuximab'ın etkisi.

Hücre yüzeyinde EGFR'nin fazla olması kendiliğinden reseptör dimerizasyonuna ve aktivasyonuna böylelikle aşağı akışlı sinyal yollarının sürekli aktivasyonuna ve sonuçta habis fenotipin oluşumuna yol açmaktadır [Zandi et al., 2007]. EGFR sinyalini engellemek için tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden tirozin kinaz inhibitörleri de kullanılmaktadır (Şekil 2.12) [Pines et al., 2010].



Şekil 2.12: EGFR sinyalini hedefleyen terapiler.

İnsan kanserlerinde sıklıkla EGFR geninde mutasyonlar olduğu belirtilmiştir. Bu mutasyonlar ekstraselüler domaininde, intraselüler domainde ve intraselüler tirozin kinaz domaininde meydana gelmektedir.

EGFR'nin ekstraselüler domaininde meydana gelen mutasyonlar sıklıkla Glioblastoma multiforme (GBM)'de görülmektedir. Bu genellikle spesifik ekzonların duplikasyonları ve büyük delesyonlardır ve bu mutasyonlar reseptör dimerizasyonu ve aktivasyonunu arttırmaktadır.

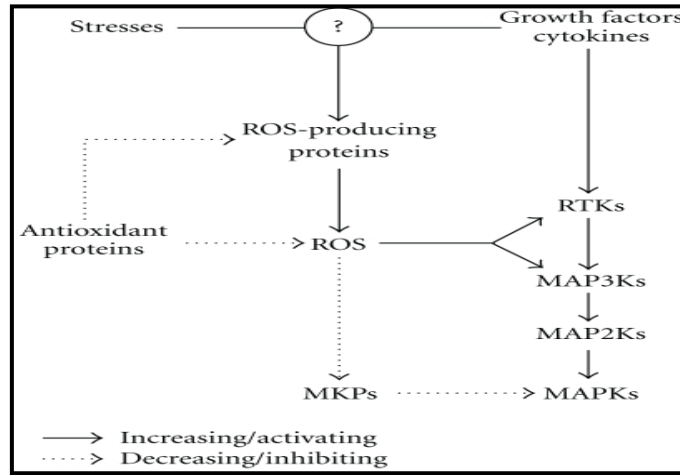
EGFR geninin intraselüler domaininde oluşan mutasyonlar küçük delesyonlar, anlamsız mutasyonlar, küçük duplikasyonlar ya da insersiyonlardır. Son çalışmalar bu mutasyonların ligandla aktive olan reseptörlerin aktivitesini uzattığını göstermiştir. Çünkü mutasyonlar kinaz aktivitesine sahip ATP bağlanma bölgesinde oluşmaktadır. NSCLC (Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri)'de kinaz domaininde mutasyonlar olduğu gösterilmiştir [Pines et al., 2010]. Bu hastalıkta sıklıkla kinaz domaininde delesyon ve nokta mutasyonları belirlenmiştir [Mitsudomi and Yatabe, 2009].

## 2.2. Mezotelyoma

Malignant mezotelyoma (MM), dünya üzerinde yaygınlığı artan, teşhisi zor bir kanser türüdür. Akciğerleri, karın içini ve kalbi saran zar boşluklarının seröz yüzeylerinden köken alan, tedaviye dirençli bir tümördür [Robinson et al.,2005], [Agarwal et al.,2010]. Erkeklerde kadınlara göre daha yaygın olan MM ileri yaşlarda daha sıklıkla görülmektedir. En yaygın semptomları arasında nefes darlığı ve ağrı (%90), yorgunluk (%36), kaygı (%29), öksürük (%22), terleme (%22), kabızlıktır (%22) [Porpodis et al., 2013].

MM'nın ortalama %80'i asbestos fiberlerinden kaynaklanmaktadır. Diğer potansiyel karsinojenik faktörler simian virus 40 (SV40), radyasyon ve erionite olarak bilinmektedir [Zucali et al.,2011]. İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan moleküler çalışmalar asbest kaynaklı tümör oluşumuna karşı genetik yatkınlık göstermiştir. [Robinson et al., 2005]. Asbest doğal bir fibröz silikat olduğundan yeryüzünün birçok yerinde toprak örtüsünde birikimler halinde bulunur. Uzun yıllar boyu insanlığın sosyo-kültürel ilişkileri asbest karışımlı toprağın yoğun bulunduğu yerlerdeki kırsal alan yaşayanlarının bu toprağın ısı ve su yalıtımı özelliklerini öğrenmelerine ve kullanmalarına fırsat vermiştir. Böylece, "ak toprak" veya ülkemizin bazı yerlerinde kullanılan adıyla "çorak toprak" olarak adlandırılan bu toprak, ısı ve su yalıtımı amacıyla evlerin çatısında örtü, duvarlarında sıva-badana amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır. Asbest ile kırsal alanda yaşanan bu temas şekli 1980'li yılların sonuna dek bazı bölgelerimizde yoğun biçimde devam etmiştir. Türkiye'de temasın en yoğun olduğu bilinen kırsal alanları kapsayan Eskişehir, Kütahya, Bilecik, Yozgat, Sivas, Diyarbakır illeridir. Asbestos fiberleri akciğer

zarına nüfuz ederek ve makrofajlar tarafından reaktif oksijen türleri (ROS) ve reactive nitrojen türleri (RNS)'nin salınmasına neden olur. Bu durumda mezotelyal hücre DNA'sına zarar verebilmektedir [Pasello and Favaretto, 2009]. Bazı değişimleri, delesyon, yeniden düzenlemeler, insersiyon, kardeş kromatid değişimleri ve kromozomal anormalilere yol açarak indirek olarak genotoksisiteye neden olmaktadır [Zucali et al., 2011]. ROS büyüme faktörleri, sitokinler, stresle aktive edilir ve hücre içi antioksidan proteinler tarafından uzaklaştırılır. MAPK sinyal proteinlerinin (RTK ve MAP3K'ler) oksidatif modifikasyonuna neden olur (Şekil 2.12) [Son et al., 2011]. ROS, MAPK'ların yanı sıra diğer sinyal molekülleri protein tirozin fosfataz, protein tirozin kinaz ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda rol alarak hücre içi sinyal kaskadında hücre büyümesini, çoğalma, göç ve apoptozu kontrol eden ikinci mesajcı olarak fonksiyon göstermektedir. Proteinlerin önemli aminoasit rezidülerini modifiye ederek protein yapı ve fonksiyonunu değiştirebilmektedir (Şekil 2.13) [Son et al., 2011].

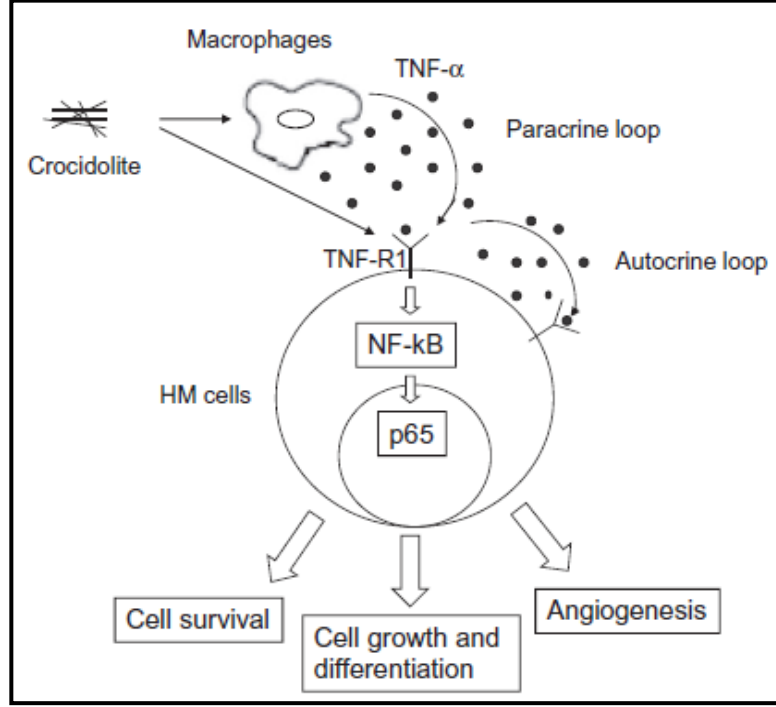


Şekil 2.13: MAPK yollarının ROS aracılı aktivasyonu.

Asbestos hem büyüme faktör reseptörleriyle direk etkileşime girerek hem de proteinlerin oksidasyonu ile çoklu sinyal yollarının uyarılmasına neden olmaktadır. Bu yollar akciğer epitelyum hücreleri, mezotelyal hücreler, endotelyal hücreler ve fibroblastlarda anormal büyüme kontrolüyle bağlantılıdır. Asbestos ayrıca NF- $\kappa$ B gibi redox-duyarlı transkripsiyon faktörlerini ve hücre canlılığı, inflamasyona neden olan AP-1'i aktive etmektedir [Ramos-Nino et al., 2006].

Crocidolite (mavi asbestos) denilen asbest insan mezotelyoma hücrelerinde fiberlerle etkileşime giren makrofajların TNF- $\alpha$  salınmasına ve TNF- $\alpha$  reseptörlerini

ekspresyonuna neden olmaktadır. TNF- $\alpha$ , NF-kB yolağını aktive ederek. Ve kanser hücrelerinin ölüme dirençli hale gelmesine neden olmaktadır (Şekil 2.14) [Zucali et al., 2011].

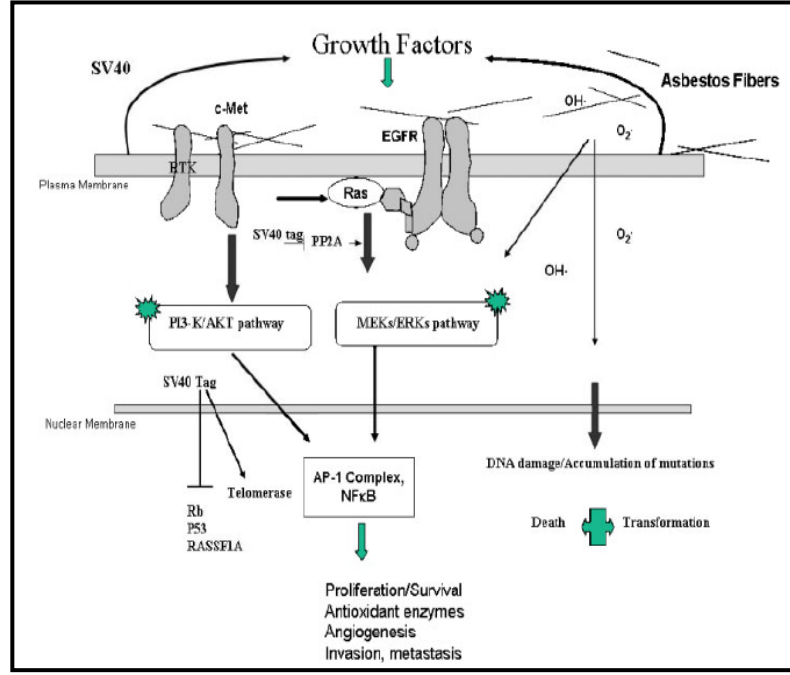


Şekil 2.14: Asbestos fiberlerinin patogenezi.

Crocidolite fiberleri ayrıca activator protein (AP-1) aktivitesini ve mezotelyal hücre mitozunu artıran epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) otofosforilasyonu ile ERK1/2 sinyal yolağını aktive etmektedir [Zucali et al., 2011]. EGFR, hücre membranında asbestos fiberlerinin önemli hedefidir. Bu büyüme faktörleri insan mezotelyoma hücrelerinin çoğalması için gereklidir ve MM'da otokrin olarak üretilmektedir. Mezotelyal hücreler asbestos maruz kaldıktan sonra EGFR'nin artan ekspresyonu ve otofosforilasyonu meydana gelir. Ayrıca, uzun fiberlerle EGFR'nin fosforilasyonu ve agregasyonu, ERK1/2 hücre sinyal kaskadın aktivasyonu ile ve mezotelyal hücrelerde artan proto-onkogen c-fos ve c-jun'nun artan ekspresyonla bağlantılıdır. Fos ve Jun aile üyeleri G1 faz geçişi ve S fazına giriş için gereklidir [Ramos-Nino et al., 2006].

SV40 onkogenik potansiyele sahip iki proteini (large T antigen ve small t antigen) kodlayan DNA tümör virüsüdür [Cristaudo and Foddis, 2005]. Tümör süpresör genleri baskılayan SV40 insan için kuvvetli bir onkogenik virüstdür.

Malignant mesotheliomanın meydana gelmesinde bir kofaktör olarak sorumlu tutulmuştur [Bruse W S Robinson et al., 2005]. SV40 small t antigen (tag), MM'da ERK aktivasyonunu uyarmakta PI3K/AKT yolağı da hem SV40 hem de asbestos tarafından aktive edilmektedir (Şekil 2.15) [Ramos-Nino et al., 2006].



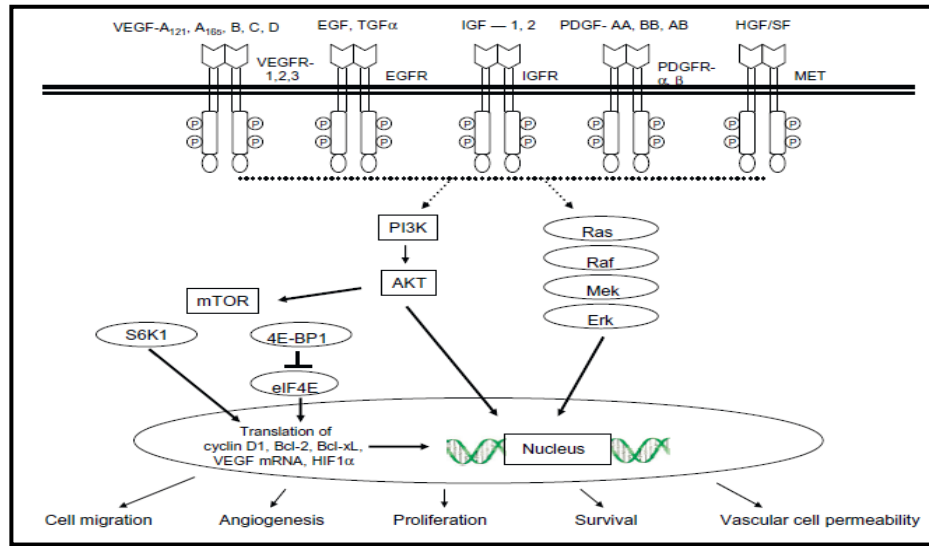
Şekil 2.15: Mezotelyal hücrelerde asbestos fiberleri yada SV40 enfeksiyonuyla harekete geçen sinyal yolları.

MM'e sebep olan diğer kanserojenlerden erionitenin MM oluşturmada etkili mineral fiberi olduğu gözlemlenmiştir. Asbest gibi bir fibröz silikattır; volkanik üründür, Ürgüp civarında bazı köylerin yakınında taşkaya tabakalarında doğal olarak bulunur. Taşlar sahip oldukları gözenekli yapı sayesinde hem yalıtım, hem ısı kontrolü özelliğine sahipken, kolay kesilir ve hafiftirler. Bu nedenlerle bölgede yaşayan köylüler, yıllar önce bu kaya tabakalarından kestikleri taşları evlerinin duvarlarında kullanmıştır. Türkiye'nin Kapadokya bölgesinde erionit mineraline maruz kalan insanların mezotelyomaya genetik eğilimlilik gösterdiği ve bu eğilimin yapılan mineralojik ve pedigre çalışmaları ile otozomal dominant özellik taşıdığı gözlemlenmiştir [Carbone et al., 2007].

## 2.2.1. Mezotelyomada Sinyal İletimi

MM'da EGFR sinyali önemli role sahiptir. Amphiregulin, betacellulin, EGF, transforming growth factor (TGF) ligandları EGFR'a bağlanarak reseptörün aktivasyonuna böylelikle reseptör dimerizasyonuna ve reseptör tirozin kinaz domainlerinin otofosforilasyonunda rol alan proteinlerin ve aşağı akımlı moleküllerin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır.

MM'da büyüme faktörleri ve birkaç sitokinlerin etkili olduğu gösterilmiştir. Bunlar; epidermal growth factor (EGF), yeni damar oluşumunda ve tümör büyümesinde etkili olan IL-6 ve IL-8 gibi interlökinler, tümör anjiogenezini ilerleten vascular endothelial growth factor (VEGF), mezotelyoma hücre göçünü stimüle eden hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), MPM hücre çoğalmasını düzenleyen platelet-derived growth factor (PDGF) ve insulin-like growth factor (IGF) (Şekil 2.16) [Zucali et al., 2011].



Şekil 2.16: Mezotelyoma patogenezindeki yollar.

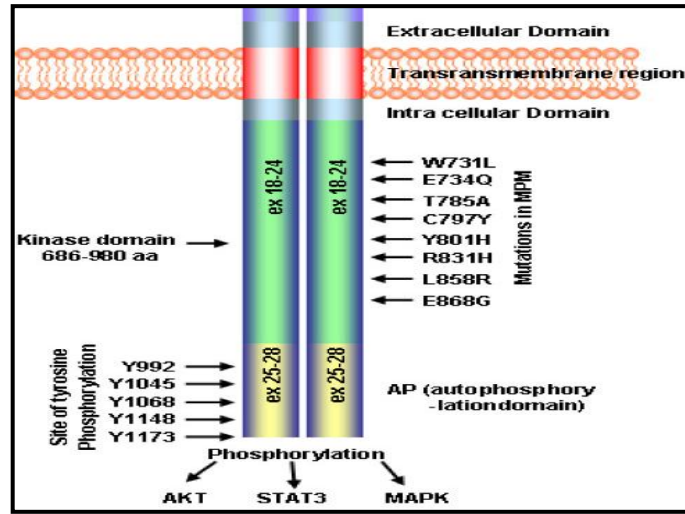
Ras yolağı kanserde sıklıkla deregüle edilmektedir. Ras, RAF/MEK/ERK ve PI3K/Akt sinyal kaskadını içeren çoklu efektör yollar boyunca sinyali iletmektedir. MM'da bu yollarının sıklıkla aktivasyonu tümör gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır [Miyoshi et al., 2012].

Daha öncede bahsedildiği gibi phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt sinyal yolağı çeşitli tümör gelişiminde önemlidir. AKT çoğu insan tümöründe aktive edilen

bir serine/threonine kinazdır. PI3K hücre membranına alınarak büyüme faktör reseptör tirozin kinaz (RTK)'ın ligand bağımlı aktivasyonu ile aktive edilir [Miyoshi et al., 2012]. AKT'nin aktivasyonu antiapoptotik mekanizmaları harekete geçirir, NF-κB transkripsiyonunu pozitif olarak etkiler, telomeraz aktivitesini, tümör invazyonunu artırır. Bu yolağın inhibisyonu hücre büyümesini inhibe eder ve kemoterapötik ajanlara duyarlılığı artırır [Ramos-Nino et al., 2006].

Çeşitli immunohistokimya çalışmalarıyla malignant plural mezotelyoma örneklerinin %44-97'sinde EGFR'nin fazla ifade olduğu gösterilmiştir [Agarwal et al., 2010]. Malign mezotelyomada EGFR'nin aşırı ifade olması hastalığın gelişimini hızlandırmakta, EGFR'a yönelik tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır [Kindler, 2008].

MM'nin %31'inde EGFR mutasyonlarının varlığı belirtilmiştir. EGFR tirozin kinaz domaininde nokta mutasyonları tirozin kinaz domainin ATP bağlanma bölgesine yakındır. Epidermal büyüme faktörüne yanıtta tirozin kinaz aktivitesini artırır (Şekil 2.17) [Foster et al., 2010].



Şekil 2.17: EGFR proteinin yapısı.

Mezotelyomada EGFR geninde amplifikasyonlar da meydana gelir. Bunlar; dizomi, düşük polizomi ve yüksek polizomi şeklinde görülmektedir [Okuda et al., 2008].

Tümör baskılayıcı proteini p53 hipoksi, DNA hasarı ve onkogen aktivasyonu gibi hücre stresine yanıtta aktive edilir. Bu aktivasyon hücre döngüsünün duraklaması ve apoptoza neden olan genlerin transkripsiyonunu başlatmaktadır.

Çoğu insan kanserinde p53 ve pRB tümör süpresör genlerinde mutasyon ve delesyonlar meydana gelmesine rağmen. Bu durum MM'da nadir olarak görülür [Zucali et al., 2011]. Ayrıca MM'da kromozom 9p21'de p16<sup>INK4a</sup>/p14<sup>ARF</sup> ve kromozom 22q12 neurofibromatosis type 2 (NF2) tümör baskılayıcı genlerin inaktive olduğu belirtilmiştir [Sekido, 2008].

### 2.3. Mezotelyoma tedavisi

MM 'da cerrahi operasyon birçok hasta için uygun olmamaktadır. Radyasyon terapisi hastaların çoğunda ağrıyı azaltıcı etki yapmasına rağmen, semptomlarının kontrol süresi uzun olmadığından kemoterapi sıklıkla kullanılan tedavi seçeneği olmaktadır. Yapılan çalışmalar MM sinyal yollarında bulunan anahtar moleküllerin tespit edilerek bunlara yönelik tedaviler üretilmesinin büyük önem taşımakta olduğunu göstermektedir [Ou et al., 2011]. Güncel MM tedavisinde yöntemlerden biriside etkin rol alan sinyal proteinlerinin tespitiyle bu proteinlerin sinyal iletiminde tedavi için hedef molekül olarak kullanılmasıdır [Levitzki and Klein, 2010].

Bitkilerde bulunan bazı polifenollerin bu yollar üzerinde inhibe edici etkisi belirlenmiştir. Besin olarak aldığımız bu doğal bileşikler çok çeşitli yiyecek ve içeceklerde bulunmaktadır [Gibellini et al., 2010].

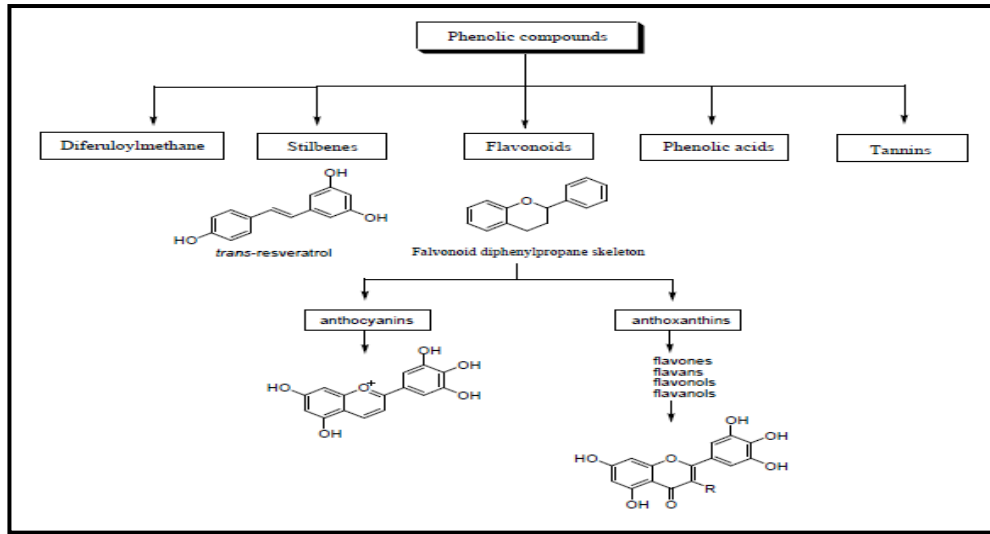
Belirtildiği gibi mezotelyomada da EGFR'nin %60-70 aşırı ekspresyon olmaktadır [Zucali et al., 2011]. EGFR'da mutasyon sonucu artan intrinsik kinaz aktivitesinin baskılanması için iki tipte molekül kullanılmaktadır. Bunlar monoklonal antikorlar ve küçük molekül tirozin kinaz inhibitörleridir. Gefitinib ilk geliştirilen tirozin kinaz inhibitörüdür. EGFR'nin aktivasyonunu spesifik olarak ATP bağlama bölgesine bağlanıp inhibe ederek gerçekleştirir. Gefitinib'in *in vitro* MPM hücrelerinin çoğalmasını azalttığı belirtilmiştir [Wykosky et al., 2011]. Icotinib EGFR tirozin kinaz küçük molekül inhibitör olup NSCLC hücrelerinde antitümör aktivite göstermiştir. EKB-569, seçici ve geri dönüşümsüz EGFR inhibitörüdür. Antikanser ajan olarak geliştirilmiştir [Yoshimura et al., 2005]. Cetuximab (Erbix) EGFR'nin ekstraselüler domainine karşı yönlendirilen bir kimerik fare-insan antikorudur. Reseptöre aktive edici ligandın bağlanmasını inhibe etmektedir. Diğer bir deyişle cetuximab EGFR'nin ligand bağlı aktivasyonunu ve hücre döngüsünün ilerlemesini,

hücre büyümesini ve anjiogeneze sebep olan downstream yollarını inhibe etmektedir. İlâveten cetuximabın bağlanması sinyal sonlanmasına neden olan EGFR internalizasyonunu ve degradasyonunu başlatmaktadır [Bou-Assaly and Mukherji, 2010].

## 2.4. Polifenoller ve Kanser

Polifenoller, bitkilerde bulunan kimyasal maddelerin bir grubu olarak birçok sebze ve meyvede bulunmaktadır [Zucali et al., 2011]. Fenolik bileşikler bitkilerde ikincil metabolitlerin ana sınıflarının birinden orjinlenir. Çoğunlukla fenilalanin ve daha az sıklıkla tirozinden türetilen doğal fitokimyasallardır [Kang et al., 2011]. İçerdikleri fenol halka sayısı ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elementlere göre farklı sınıflara ayrılmaktadır.

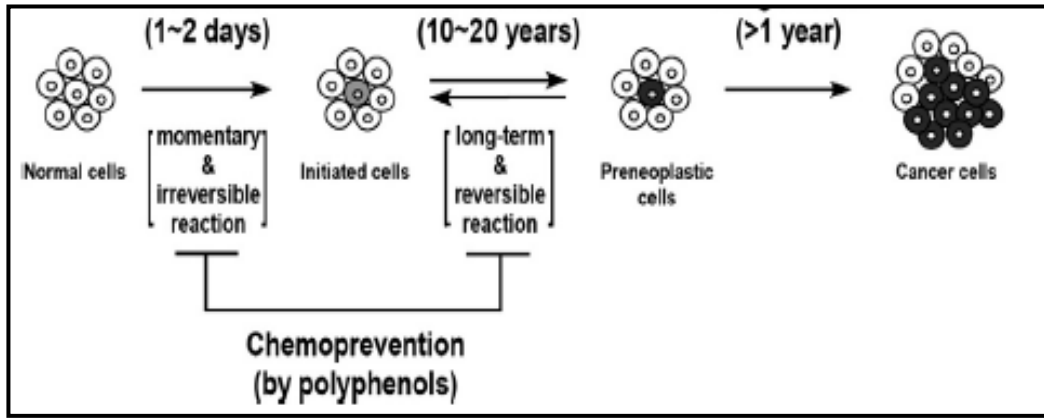
Flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler ve lignanlar polifenollerin ana gruplarıdır (Şekil 2.18) [Han et al., 2007].



Şekil 2.18: Besin polifenollerinin sınıflandırılması.

Besin polifenollerinin iç ve dış mekanizmalarla antioksidant aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stresle indüklenen inflamasyon NF- $\kappa$ B ve AP-1'in aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bunlar, interlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-8, tümör nekrotik faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi pro-inflamatuvar genlerin ekspresyonuna izin verir [Han et al., 2007]. Bazı polifenoller bu pro-inflamatuvar genleri inhibe etmektedir.

Polifenollerin bir kısmı pro-oksidatif enzimlerin aktivitesini azaltırken bir kısmı antioksidatif enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini yükseltmektedir. Böylece anti-inflamatuvar etki gösterir. Anti-inflamatuvar aktiviteye sahip besin maddelerinin karsinogenezde özellikle gelişme ve ilerleme evresinde kemopreventif etkiye sahip olması beklenir çünkü bu durum inflamasyon ve tümörün ilerlemesiyle ilişkili olmaktadır. [Zucali et al.,2011]. Karsinogenez çok basamaklı bir oluşumdur. Diyet polifenollerini birkaç mekanizmayla tüm karsinogenez sürecini etkileyebilir, etkileri doku yada hücre tipine bağlı olabilir ve düşük yada yüksek dozda farklılık gösterebilmektedir (Şekil 2.19) [ Zucali et al.,2011], [Kang et al.,2011].



Şekil 2.19: Karsinogenezin basamakları.

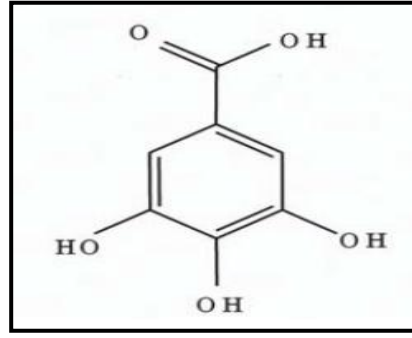
Polifenolik bileşikler kanser kemopreventif ajan olarak göz önünde bulundurulur [Zucali et al., 2011]. Besin polifenollerini karsinogenezde içerilen çeşitli biyokimyasal işlemleri düzenler. Örneğin curcumin'in *in vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda programlı hücre ölümünü indüklerken ve tümör hücre döngüsü ilerlemesini engellemiş, hücresel çoğalma ve anjiyogenezi inhibe ederek antitümör aktivite gösterdiği belirtilmiştir [Han et al., 2007]. Polifenollerin kemopreventif etkileri sadece radikallerin temizlenmesi değil aynı zamanda oksidatif stres aracılı enzim aktivitesini de düzenlemesidir. Polifenollerce zengin kırmızı meyvelerin ve özellikle çileğin tüketimi birçok mekanizmayla kanserin azalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Bunu insan sitokrom P450-bağımlı monooksijenaz 1A1 (CYP 1A1) aktivitesini inhibe ederek, EGFR tirozin kinaz aktivitesini baskılayarak ve protein kinaz CKII aktivitesini azaltarak gerçekleştirir. Çeşitli polifenollerin *in vitro* signal transducer ve activator of transcription-3 (STAT-3) fosforilasyonunu azalttığını göstermiştir. Ayrıca PI3-kinase/Akt yolağı, MAPK proteinleri (ERK, JNK ve p38)

aktivasyonu ve Nrf2'nin nukleusa translokasyonu süresince koruma sağlamaktadır [Han et al., 2007].

Yapılan birçok çalışmayla polifenollerin etkinliği değerlendirilmiştir Elma, soğan, elma suyu, kırmızı şarapta bulunan kersetin kolon kanserinde farklı kanserojenlerin tümorojenik aktivitesini baskılamaktadır. Yeşil çay polifenolleri, gastrik lezyonların indüksiyonu ve bağırsak kanserinin ilerleme fazı süresince antikarsinojenik özellikler göstermektedir. Çaydaki en önemli fenolik bileşiklerden biri olan epigallocatechin-3-gallate (EGCG)'ın deri kanserli transgenik farelerde koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir [Zucali et al., 2011]. Ayrıca EGCG'ın akciğer kanserinde birincil tümörlerin büyümesini ve metastazı azaltarak faydalı etkiler gösterdiği bildirilmiştir [Hou et al., 2005]. Çayın diğer önemli bileşeni Theaflavin-3, 3'-Digallate'in tümör hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olduğu belirtilmiştir [Mizuno and Cho, 2006]. Zerdeçal tozunda bulunan curcumin'in farklı sinyal yollarıyla etkileşimiyle hepatokarsinogeneze karşı koruyucu bir etki gösterdiği [Zucali et al., 2011]; resveratrol'ün fare derisinde MAPKs ve AP-1'in aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [Han et al., 2007]. Gefitinib'in sitotoksik etkiye neden olduğu maksimum konsantrasyonda hem EGFR hemde ERK1/2 aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Benzer yapıdaki GA'in de benzer etki yaptığı belirlenmiştir [Favoni et al., 2010].

### **2.4.1. Gallik Asit**

Polifenollerin bir grubu olan gallik asit (GA), polihidroksifenolik bileşik olarak, serbest form ya da daha yaygın olarak gallotanin denilen tanin içeriğinde çeşitli bitki, meyve ve yiyeceklerde bulunan bir moleküldür. Chinese gall adlı bitkinin bileşenidir. Şekil 2.20'de GA'in kimyasal yapısı gösterilmektedir [Locatelli et al., 2013].



Şekil 2.20: Gallik Asit'in kimyasal yapısı.

GA yeşil çay, üzüm, çilek, muz gibi çeşitli doğal ürünlerde bulunur [Babich et al., 2011]. GA'in anti-bakteriyel , antiviral , anti-inflamatuvar gibi çeşitli biyolojik etkileri gösterilmiştir [Sharma et al., 2011]. En önemlisi antitümöral ve sitotoksik aktivitesidir. Yapılan çalışmalarda GA'in insan lösemi (HK-63) hücre hattına karşı sitotoksik etkisi olduğu, HSC-2 ve HL-60 hücrelerinde tümöral olmayanlara karşı daha yüksek sitotoksositeye sahip olduğu gösterilmiştir [Locatelli et al., 2013]. Lösemi, prostat kanseri, akciğer kanseri, mide, kolon, göğüs, boyun ve özofagus gibi çeşitli kanser hücrelerinde anti-kanser etkisi belirtilmiştir [García-Rivera et al.,2011]. GA'in tümör gelişiminin farklı evrelerini engelleyerek, tümör anjiogenezini baskıladığı belirtilmiştir [Lu et al.,2010]. GA ile muamele edilen hücrelerde apoptozun ROS (reaktif oksijen türleri)'dan kaynaklanan oksidatif stresle ilişkili olduğu bilinmektedir. Hayvan modellerinde GA'in oksidatif stresi azalttığı ve karaciğer hücresinde glutathione (GSH), GSH peroxidase, GSH reductase, and GSH S-transferase seviyesini artırdığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar GA'le muamele edilen mide kanseri KATO III hücreleri ve kolon kanser COLO 205 hücreleride hem büyümenin inhibisyonu hemde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Bunlara ilaveten GA'in meme kanseri, lösemi, akciğer kanseri ve kolon kanserinde apoptoza ve farklılaşmaya sebep olduğu [García-Rivera et al., 2011] ayrıca malignan melonoma [Locatelli et al., 2009], promiyolösitik lösemi, prostat kanseri ve rahim ağzı kanserinde apoptoza neden olduğu da bildirilmiştir [You B.R., 2010].

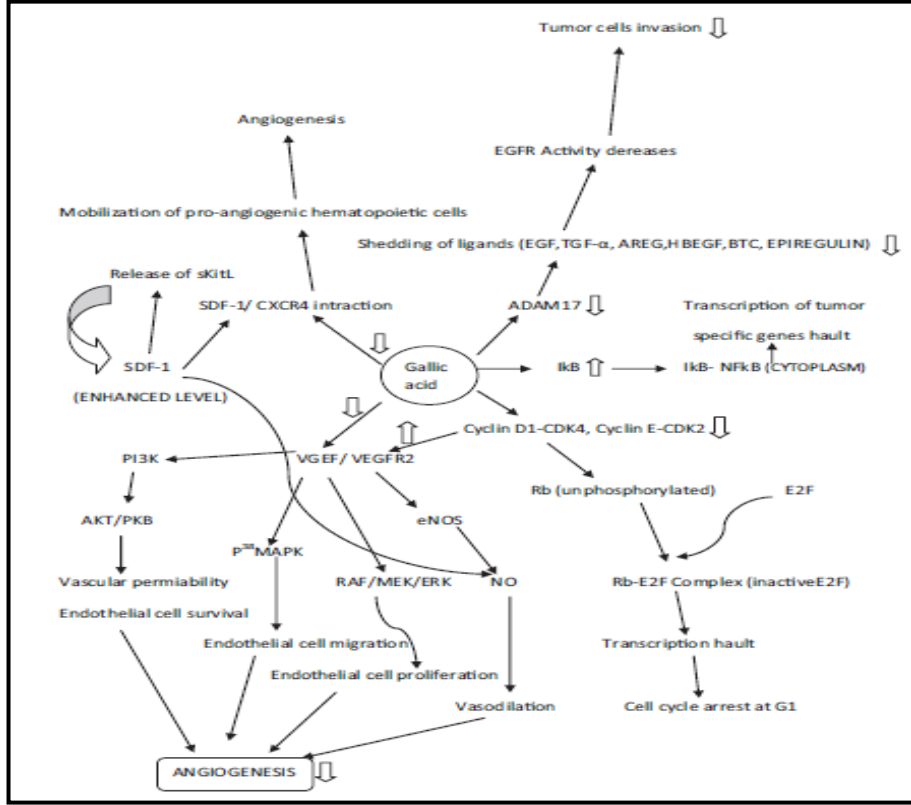
Çeşitli kanser hücrelerinde GA'in etkisi Şekil 2.21'de gösterilmektedir [Verma et al., 2013].

Cancerous cell lines	Cell types	Effect of gallic acid	References
KATO III	Stomach cancer	Apoptosis	Yoshioka et al. (2000)
COLO 205	Colon adenocarcinoma	Apoptosis	Yoshioka et al. (2000)
3T3L1	Adipocytes	Apoptosis	Hsu et al. (2007)
DU145	Prostate carcinoma	Apoptosis	Kaur et al. (2009)
22Rv1	Prostate carcinoma	Apoptosis	Kaur et al. (2009)
Calu-6	Lung cancer	Apoptosis	You and Park (2010)
A459	Lung cancer	Apoptosis	You and Park (2010)
HeLa	Cervical cancer	Apoptosis	You et al. (2010)
U87	Glioma cells	Anti-angiogenic	Lu et al. (2010)
U251n	Glioma cells	Anti-angiogenic	Lu et al. (2010)
HL-60	Leukemia	Antiproliferative	Madlener et al. (2007)
HT-29	Colon cancer cells	Apoptosis	Bernhaus et al. (2009)

Şekil 2.21: Çeşitli kanser hücre hatlarında Gallik Asit'in etkisi.

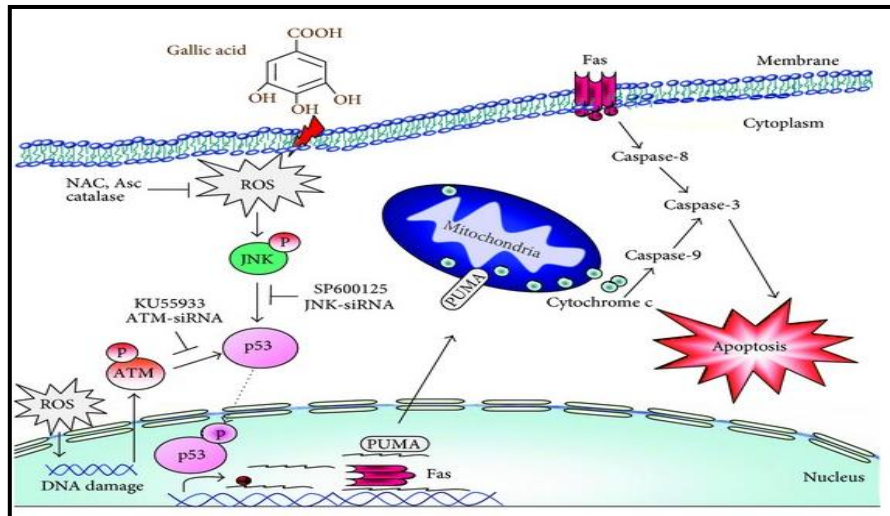
Diğer yapılan çalışmalarda GA'in glioma hücrelerinde p-AKT ve p-ERK'i baskıladığı, Calu-6 ve A549 akciğer kanser hücrelerinde hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptoza neden olduğu ayrıca U87 insan beyin tümöründe PI3K/Akt ve ERK/MAPK sinyal yolağının aktivasyonunu azalttığı belirtilmiştir [You and Park, 2010].

Endotelial hücrelerin çoğalması anjiyogenezde önemli bir basamaktır. GA, EA.hy926 ve HUVEC hücrelerinin çoğalması etkili bir şekilde inhibe ederken bunu indüklenen hücre döngüsü ilerlemesini baskılayarak gerçekleştirmektedir. GA cyclin D1, cyclin E ve CDK4 ekspresyonlarının düzenlenmesini azaltarak hücre çoğalmasını inhibe eder. VEGFR-2'de azalmaya ve endotelial hücre anjiyogenezinin inhibisyonuna neden olur. ADAM17 EGFR prolifandlarının işlenmesi için up-stream bileşenidir. Kolajen IV ECM'in proteolizisi ve hücre yüzeyinden integrinlerin salınmasına sebep olur. GA'ın U87 ve U251 hücrelerinde ADAM 17, p-AKT ve p-ERK ekspresyonunu baskıladığı belirtilmiştir. GA; hücre çoğalması, invazyon ve canlılığında içerilen PI3K/AKT ve Ras/MAPK sinyal iletim yollarının fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Şekil 2.22) [Verma et al., 2013].



Şekil 2.22: GA'in inhibitör etkisi.

Ayrıca preadiposit hücrelerde GA'in Fas ve mitokondrial aracılı yolak 3T3-L1 preadipositlerde apoptoza neden olduğu Fas, FasL ve p53 proteinlerini aktive ettiği ve DNA hasarını, ATM aktivasyonunu indüklediği de bildirilmiştir (Şekil 2.23) [Agarwal et al., 2006].



Şekil 2.23: Gallik Asit'in etkisi.

ROS-bağımlı ataxiatelangiectasia- mutated-(ATM-) p53 aktivasyon yolağıyla fare akciğer fibroblastlarının apoptozuna neden olduğı gösterilmiştir. Bununla birlikte GA tarafından üretilen ROS DNA, protein ve yağı oksitleyerek hücelere direk zarar verdiğı, p38MAPK ve JNK gibi strese duyarlı hücre içi sinyal yolaklarını aktive ederek hücelere indirek olarak da zarar verdiğı belirtilmiştir [Chen et al., 2013].

## **3. MATERİYAL ve METOD**

### **3.1. Materyal**

#### **3.1.1. Cihazlar**

CO<sub>2</sub> inkübatörü (ThermoForma), Laminar Akım Kabini (Hera Safe), Su banyosu (Mettler), Plate Reader (Varioskan Flash), Işık Mikroskobu (Nikon TMS), Dikey Elektroferez ve Transfer Sistemi (BioRad Mini Protean), Soğutmalı Mikrosantrifüj (Beckman Coulter 22R)

Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22, Eppendorf Centrifuge 5810R), Sıcaklık İnkübatörlü Çalkalayıcı (BioSan, ES-20), Gerçek Zamanlı Termal Döngü Cihazı (Roche, LC480II), Hassas terazi (Precisa XB320M), -80°C Dondurucu (Symphony), pH Metre (Mettler Toledo), Jel Görüntüleme Sistemi (BioRad, ChemiDoc XRS+), Vortex (Yellowline TTS2), Sıvı Azot Tankı (Arpege 140), Otoklav (Hirayama, HVE-50), Pipet tabancası (Gilson), Mikro Pipetörler (Gilson), Manyetik karıştırıcı (Heidolph), Nonodrop (Bio-Spech).

#### **3.1.2. Kimyasal Maddeler**

Gallik Asit (Sigma), RPMI 1640 (Sigma Aldrich R6504; Lonza 15-7020; HyClone SH3001103), Medium 199 (Sigma Aldrich M5017), Fetal Bovine Serum (Lonza, DE14-802F; HyClone, SV30180.03), Penicillin-Streptomycin (HyClone, SV30010), 10X Tyrpsin (Lonza, BE17-160E), Page Ruler Prestained (Thermo Scientific 26616), Akrilamit/bisakrilamit (MP BIAC3752, %40; AppliChem UN3426, %40), BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227), Yağsız süt tozu (Applichem non fat derived milk powder A0830), ECL (Thermo Scientific 32106; Thermo Scientific Plus, 32132), DMSO (Sigma D5879), DEPC (AppliChem A0881,0100), RNaseZAP (Sigma R2020), Agarose (Sigma, A9539), Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (Intron, 21141), RT-PCR (Qiagen RNeasy Mini Kit, 74104).

### 3.1.3. Kullanılan Ajan ve Solüsyonlar

GA (Gallik Asit): Etanol içerisinde çözülerek 100 mM stok hazırlandı. Deneylede kullanılan stoklarda konsantrasyonu serumsuz besiyeri ile 1/10 ve 1/100'e düşürülerek kullanılmıştır.

EGF: EGF (Sigma, E 9644) asetik asit ile çözüldü. 0,2 mg (toz) stok EGF'e 0,2 ml (10mM) asetik asit karıştırılarak 1 mg/ml EGF stok hazırlandı. Deneylede kullanılan EGF serumsuz besiyeriyle 100 ng/ml olacak şekilde dilüsyonları yapılmıştır.

RPMI: 500 ml besiyeri için R6504 Sigma besiyerinden 5.2 g tartılır 50 ml suda çözülür, 1g NaHCO<sub>3</sub> 50 ml suda çözülür, 100 ml'lik karışım 0,22 uM'lık filtreden geçirilir. Karışım otoklavlanmış 345 ml distile suya eklenir, 5 ml pen/strep ve 50 ml FBS eklenerek besi yerinin pH'ı 7.2-7.4 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır.

M199: 500ml besiyeri için M5017 Sigma besiyerinden 4.75 gr tartılır 50 ml suda çözülür, 0.62 gr NaHCO<sub>3</sub> 50 ml suda çözünür, 100 ml'lik karışım 0,22 uM'lık filtreden geçirilir. Karışım otoklavlanmış 333 ml distile suya eklenir ve 2 ml L-glutamin (final konsantrasyon 0,75 mM), 10 µM EGF (3.3 nM final konsantrasyon), 1445 µM hidrokortizon (400 nM final konsantrasyon), 250 µM insülin (870 nM final konsantrasyon) eklenerek besi yerinin pH'ı 7.2-7.4 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır.

Puck's Saline A: 6 g NaCl, 0.4 g KCl, 10 g Glukoz (D- Glukoz), 0.0005 g Fenol Red, 0.35 g NaHCO<sub>2</sub> ya da NaHCO<sub>3</sub> 100 ml suyun içinde çözülüp 0,22 uM'lık filtreden geçirilip, pH 7.2'ye ayarlanır. Sonrasında 1 lt'ye steril su ile tamamlanmıştır.

1X Tripsin: Ticari olarak elde edilen 10X Tripsin, steril 1X Pack Saline ile 1:10 oranında seyreltilerek hücre pasajlamada kullanılmıştır.

10X PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> son hacim 1 L olacak şekilde distile su içerisinde çözüldükten sonra (pH değerinin 7.4 civarında olduğu kontrol edilerek), 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak steril edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek 1X PBS olarak kullanılmıştır.

Hücre Dondurma/Stok Medyumu: SPC-212 ve Met5A hücrelerini sıvı nitrojende saklamak için; FBS'e %5 (v/v) olacak şekilde DMSO eklenerek alüminyum folyo ile sarılmış tüpte steril olarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

10X TBS: 0,5 M Tris-HCl (250 ml %100 Tris-HCl'den, pH 7.4), 1,5 M NaCl (187,5 ml ,4 M NaCl'den ) yaklaşık 800-900 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmüş ve HCl ile pH aralığı 7.4-7.6'ya ayarlanarak final hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

1X TBS-T: 10X TBS tamponu distile su ile 1:10 oranında sulandırılarak 1X TBS hazırlanmıştır. Elde edilen 1X TBS içerisine ise %0.1 (v/v) olacak şekilde Tween20 eklenmiştir.

Tris-HCl Çözeltileri: SDS-Poliakrilamid jel için iki ayrı Tris-HCl çözeltisi (1.5 M pH 8.8 ve 1 M pH 6.8) kullanılmaktadır. İstenilen hacim için 1.5 M olacak şekilde Tris tartılmış ve bir miktar dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmüştür. Derişik (12.2 M) HCl ile pH'sı 8.8'e ayarlanarak dH<sub>2</sub>O ile son hacime tamamlanır. 1 M'lık çözelti için de hesaplanan miktarda Tris, dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülmür. Bu çözeltinin pH'sı 6.8'e ayarlandıktan sonra dH<sub>2</sub>O ile son hacime tamamlanmıştır.

10X SDS-Yürütme Tamponu: 30.3 g Tris Base, 144.1 g Glisin ve 10 g SDS tartılarak toplam hacim 1 L olacak şekilde distile su (dH<sub>2</sub>O) içerisinde çözülmüştür. SDS-PAGE için kullanılacağı zaman ise distile su ile 1:10 seyreltilerek (1X) kullanılmıştır.

10X Transfer Tamponu: 30.3 g Tris Base, 144.1 g Glisin tartılarak distile su ile 1 L total hacim içerisinde çözülmüştür.

1X Transfer Tamponu: Hazırlanacak toplam hacmin %10'u 10X Transfer tamponu, %20'si metanol içerecek şekilde solüsyonlar mezür ile ölçülmüş ve hacmin geri kalanı dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır. (1 L 1X Transfer Tamponu için; 100 ml 10X Transfer Tamponu + 200 ml metanol + 700 ml dH<sub>2</sub>O).

4X SDS Yükleme (Laemmlı) Boyası: 0,134 ml Tris-HCl (0,2 M pH 6.8), 0,8 g SDS(%40 SDS'ten 0,4 ml), %40 Gliserol (0,8 ml %100), %0.4 (w/v) Bromophenol Blue (%3 'lükten 0,267 ml), %20 β-Mercaptoethanol(%100'lükten 0,4 ml), toplam hacim 2 ml olacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklenerek falkon tüpte birbirlerine iyice karışması sağlanmıştır. Karışım homojen hale getirildikten sonra alüminyum folyo ile sarılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Membran Bloklama Solüsyonu: %5 (w/v) olacak şekilde yağsız süt tozu tartılarak 1X TBS-T içerisinde çözülmüştür.

Liziz Tamponu: 150 mM NaCl (15 ml, 1 M NaCl'den), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (0,1 ml, 1 M MgCl<sub>2</sub> 'den), %10 gliserol (10 ml), 20 mM Tris (2 ml, 1 M Tris-HCl, pH 7,5-8), %1 Triton X-100 (1 ml), 71,9 ml dH<sub>2</sub>O

RNase'sız Su: Ticari olarak alınan 1ml DEPC, koyu şişe içerisinde 1 litre çift distile suya (ddH<sub>2</sub>O) eklenerek gece boyu karıştırılmış ve 121°C'de 20 dk otoklav edilmiştir.

## **3.2. Metod**

### **3.2.1. Hücre Kültürü ve Hücre Pasajlama**

Met5A ve SPC212 hücreleri; 25-150cm<sup>2</sup>'lik flasklarda %10 (v/v) FBS ve %1 Pen/Strep içeren sırasıyla M199 ve RPMI besiyerlerinde 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübatörde büyütülmüştür. Hücrelerin yoğunluğu, büyütüldükleri flaskta yaklaşık %90-100 oranına ulaştığında alt kültürlenme yapılmıştır. Flasktaki besiyeri vakum yardımıyla çekildikten sonra yaklaşık 1-2 ml (25 cm<sup>2</sup>'lik petri için) 1X PBS ile yıkanan hücelere, hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantılarını ayırmak için 1-1.5 ml 1X Tripsin eklenerek hücreler kaldırılmıştır. Oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk santrifüjün ardından üst sıvı çekildikten sonra taze besiyeri eklenmiştir. Hücre çökeltisi homojen olarak dağıtıldıktan sonra taze besiyeri bulunan flaslara ilave edilir ve 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe büyütülmüştür.

### **3.2.2. Hücre saklama**

Dondurularak saklanacak hücelerden besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 37°C'deki stok mediumu karıştırılarak kriyotüpe aktarıldıktan sonra buza yerleştirilerek önce -80°C'ye daha sonra -196 °C sıvı nitrojene aktarılmıştır.

### **3.2.3. MTS Hücre Proliferasyon Testi**

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla kullanılan MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium salt), canlı hücre sayısını belirlemek için mitokondrial solunumda, NADPH'ın biyokimyasal

sentezi sırasında meydana gelen formazanın oluşturduğu renk oluşumunu ölçen, mitokondriyal aktiviteleri sonucu, tetrazolium tuzunun, renkli bir ürüne dönüştürülmesi temeline dayanmaktadır. Dehidrogenaz enzimlerinin ürettiği formazan miktarı, kültürdeki canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır ve spektral yöntemler kullanılarak 490 nm’de formazan miktarı ölçülebilir.

Met5A ve SPC212 hücre hatları, her kuyuda  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 96-kuyulu platelere ekilerek, besiyerinde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra 25, 50, 75, 100 ve 200  $\mu\text{M}$ ’lik GA ile muamele edilen hücreler farklı sürelerde (0-96 saat) inkübasyona bırakılmıştır. MTS deneyi hücre canlılıklarının belirlenmesinde CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferasyon Assay kiti (Promega) kullanılmıştır. 20  $\mu\text{l}$  MTS bileşiği, 200  $\mu\text{l}$  besiyeri içeren her bir kuyuya eklendikten sonra, 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakılmış, bu sürenin sonunda plate 25°C’de 5 dakika bekletilerek reaksiyon içeriğinin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Mikroplate Reader (Thermo, Varioskan Flash) kullanılarak 490 nm dalga boyunda kolorometrik hesaplanmıştır. Ortalamalar ve standart sapmalar Mikrosoft Excel programı kullanılarak Anova ve Bonferroni testleriyle istatistikleri yapılmıştır.

### **3.2.4. Protein İzolasyonu**

#### **3.2.4.1. Hücre lizisi**

Flaskta büyütülen hücreler pasajlanarak 100  $\mu\text{l}$ ’lik petrielerde, her petride  $2 \times 10^6$  olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonra besiyeri çekilip PBS ile yıkandıktan sonra serumsuz besiyeri bekletildikten sonra 50, 100, 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında GA uygulanmıştır. Hücre lizizinden 15 dk önce EGF (100 ng/ml) ile indüklenmiştir. Hücrelerin bulunduğu petrielerdeki besiyeri çekilip 2 ml soğuk PBS konularak kaldırılan hücreler 1000 rpmde 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı eklenmiş soğuk lizis tamponundan (200  $\mu\text{l}$ ) eklenerek hücre süspansiyonu insülin enjektörüyle 13-15 defa çekilip bırakılarak hücre pelletinin lizisi sağlanmıştır. Proteinleri, hücre artıkları içeren çökeltiden ayırmak için 14000xg de 7 dak 4°C’de santrifüj edilip süpernatant

alınmıştır. Protein lizatından 20 µl BCA assay için ayrılan proteinler daha sonra kullanım için – 20 °C’de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.4.2. Protein Miktar Tayini**

Protein miktarlarının belirlenmesi için BCA yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen protein konsantrasyonları Thermo BCA Protein Assay ile belirlenmiştir. BCA (bicinchoninic acid) içeriğinde bulunan  $Cu^{+2}$  iyonlarının, alkali ortamda protein ile tepkimeye girmesiyle  $Cu^{+}$ ya indirgenmesi (Biuret tepkimesi) sonucu oluşan mor-menekşe renkli ürünün kolorimetrik olarak ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Önce BSA standartlarının hazırlanması için stok BSA solüsyonu, 2 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bu stok solüsyondan dilüsyonlar hazırlanıp (2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,125 mg/ml) eppendorf tüplere konulmuştur. BCA’nın iki solüsyonu (Reagent A ve B) 50:1 oranında karıştırılarak working reagent (WR) hazırlanmıştır. 96-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 200 µl eklenmiştir. BSA standartlarından 10’ar µl alıp microplate’in ikişer kuyusuna her birinden konulmuştur. Kuyulardan birine su ya da lysis buffer ile blank yapılmıştır. Alüminyum folyo ile kapatılarak 37°C’lik inkübatörde yarım saat, sonra oda ısısında 5 dakika bekletildi. Varioskan cihazı ile 562 nm de örnekler okutulmuştur. Çıkan BSA değerleri ile Excel programında grafik hazırlanmıştır. Grafik üzerinde  $R^2$  denklemi görüntülenip, standart eğime göre protein miktarları hesap edilerek protein lizatlarının konsantrasyonları µg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

### **3.2.5. SDS-PAGE ve Western Blotlama**

Protein seviyelerinde meydana gelen değişimleri karşılaştırabilmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western blotting uygulamaları yapılmıştır. Farklı moleküler ağırlıktaki proteinleri jel üzerinde yürütmek için yapılan yöntemdir. SDS-PAGE jel, 1,5 mm kalınlığında %4,5 ve %10 yoğunluğunda hazırlanmıştır. Tablo 3.1’de jelin hazırlanan miktarları göstermektedir.

Tablo 3.1: SDS poliakrilamid jelin içerdiği kimyasal maddeler ve jelin yoğunluğuna göre değişen madde miktarları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

	40% Acr-Bis	TrisHcl 8.8/1.5M, 6.8/0.5M	10% SDS	Su	APS	TEMED
%10 Resolving	4ml	4 ml (pH8.8) 1.5 M	159.6 ul	7.75 ml	79.8 ul	11.4ul
%4,5 Stacking	562 ul	1.25 ml (pH 6.8) 0,5 M	50 ul	3.1 ml	25 ul	5ul

15 µg total protein lizati 4X sample yükleme tamponu ile karıştırılarak, proteinler denatüre edilmiştir (100 °C'de 5 dk). %10 SDS-PAGE ile ayrıştırılan proteinlerin jelden PVDF membrana aktarılması 1,5 saat 110 V elektrik akımı ile gerçekleştirilmiştir. Membran %5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T içerisinde, 80-100 rpm'de oda sıcaklığında 1saat çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Membran 1X TBS-T ile üç kez (5, 10 ve 5 dk) 240 rpm'de çalkalanarak yıkanmıştır. Membran, %5'lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilere hazırlanan primer (birincil) antikor ile +4 °C'de gece boyu 80-100 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Birincil antikor ile inkübasyonun ardından membran 1X TBS-T ile 3 kez yıkanmıştır. Membran, %5'lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerek hazırlanan HRP-konjuge sekonder (ikincil) antikor ile +4 °C'de 1,5 saat 80-100 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İkincil antikor ile inkübasyonun ardından 1X TBS-T ile 3 kez yıkanan membran, ECL (enhanced chemiluminescence) plus kit (Pierce) içeriğindeki solüsyonlar oda sıcaklığında 5 dk muamele edilmiştir. Membran alüminyum folyo ile sarılarak ChemiDoc XRS+ (BioRad) cihazı ile görüntülenmiştir. Elde edilen protein bantlarının yoğunluğu ve protein miktarları BioRad ImageLab programı ile analiz edilerek protein seviyelerindeki göreceli değişimler karşılaştırılmıştır. Referans olarak β-aktin kullanılmıştır. Protein tespitlerinde p-EGFR, p-JNK, p-38, p-AKT, p-EGFR, JNK ve p38 (Cell Signalling), p-ERK, ERK ve aktin (Santa Cruz) antikorları kullanılmıştır.

### 3.2.6. Real Time Analizleri

#### 3.2.6.1. RNA İzolasyonu

GA'in hücrelere uygulaması sonucu c-jun, Elk-1, STAT1, STAT3 ve STAT5A gen ifadelerindeki değişimlerin qRT-PCR ile analiz edilebilmesi için total RNA izolasyonu yapılmıştır.  $2 \times 10^6$  SPC212 hücresi besiyerinde büyütüldükten sonra 24 saatin sonunda serum starvation yapılan hücrelere 100  $\mu$ M GA 3, 6, 12, 24h saatlik sürelerde uygulanmıştır. Lizizden 15 dakika önce 100 ng/ul EGF ile indüklenmiştir. Öncelikle RNA izolasyonu yapılacak yüzey ve kullanılacak malzemeler (pipetörler, pens vb.) RNaz'sız su ile hazırlanmış %70'lik (v/v) etanol ve RNAZap ile silinmiştir. Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 1X PBS ile kaldırılmıştır. Tüpe alınan hücre-PBS karışımı oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Üst sıvı çekildikten sonra pelletin 350  $\mu$ l RLT buffer eklenmiş ve RNase/DNase free tüpe alınıp lizis yapılmıştır. 3 dk 14000 rpm'de santrifüj edilip supernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır.

Süpernatant üzerine 350  $\mu$ l %70 Etanol (1:1) eklemiştir. Karışım 2 ml'lik toplama tüpüne 700  $\mu$ l transfer edilip, 15 sn 8000xg yada 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Atık sıvı kısım atılıp. 700  $\mu$ l RW1 buffer spin kolona eklenmiştir. 15 sn 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra 500  $\mu$ l RPE buffer spin kolona eklenmiştir. Yukarıdaki şekilde santrifüj edilerek, atık sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. 500  $\mu$ l RPE buffer spin kolona eklenmiş, 2 dk 8000xg yada 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Spin kolon 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirilmiş, 40  $\mu$ l RNase free su eklenip RNA'yı ayırtırmak için 1 dk 8000 g de santrifüj edilmiştir. Elde edilen total RNA karışımından 3 kez saflık ölçümü yapılması için 6 ul, jelde yürütmek için de 2-4 ul RNA ayrılmıştır.

#### 3.2.6.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için 100 ng RNA kullanılmıştır. 60 uM final konsantrasyon Random Hexamer Primer, RNA ve su karışımı total hacim 11,4 ul olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu karışım 65 °C 'de 10 dakika ısıtılmıştır. Reaksiyon buffer (8 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu), RNase inhibitörü, DNTP mix (final konsantrasyonu 1 mM

her birinden), DTT (5 mM final konsantrasyonu), ve Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (final konsantrasyonu 10 birim) den oluşan karışım tüplere son hacim 20 ul olacak şekilde eklenmiştir. Oda sıcaklığında 29 °C 'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Takiben 48 °C 'de 60 dakika inkübe edilmiştir. 85 °C 'de 5 dakika bekletilerek Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase enzimi ile inaktive edilmiştir. Reaksiyon tüpler buza alınarak sonlandırılmış ve -20 °C 'de saklanmıştır.

### 3.2.7. RT-PCR

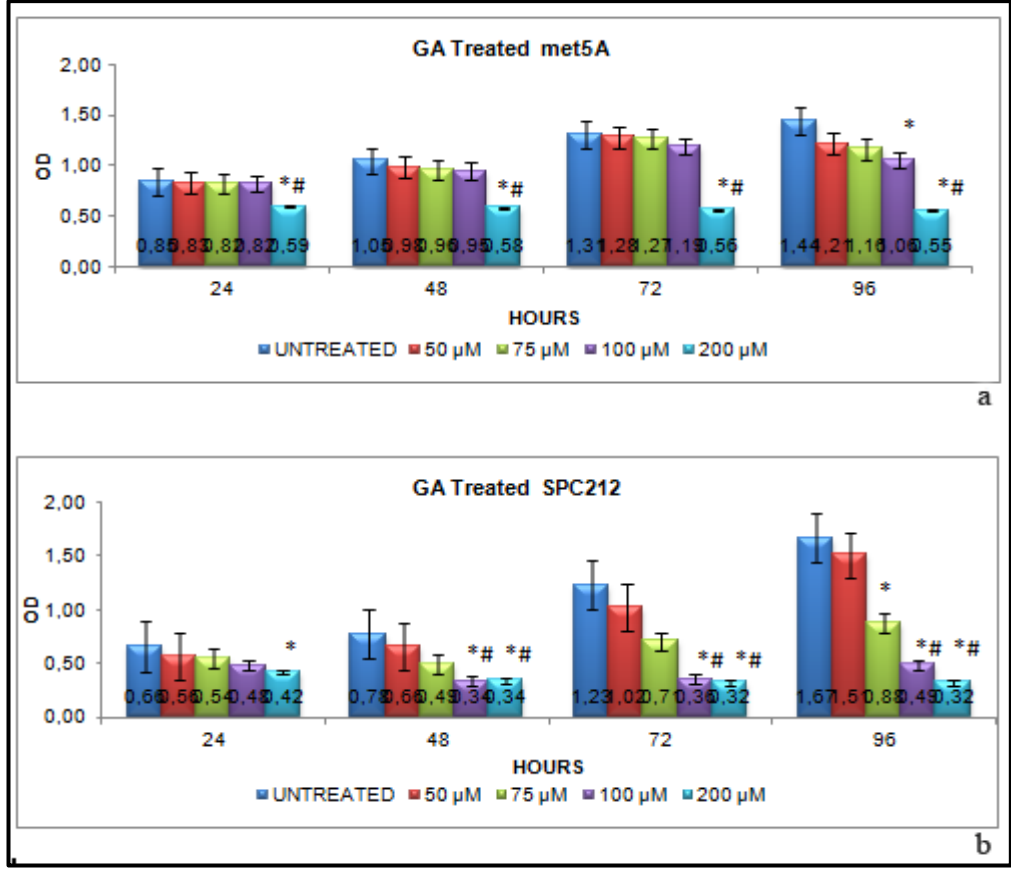
Primer-probe karışımından son hacim 1X olacak şekilde alınır, su ve final konsantrasyonu 1X olacak şekilde LightCycler 480 Probe Master karışımı ile PCR mix oluşturulur. Real-time PCR İşleminde kullanılan reaksiyon karışımının içeriği tablo 3.1'de gösterilmiştir. 1:3 oranında seyreltilerek cDNA' ler toplam hacim 10 ul olacak şekilde 384'lü plağa konulmuştur. qPCR reaksiyonları LightCycler 480 sisteminde (Roche) gerçekleştirilmiştir. Real-time PCR programı tablo 3.2'de gösterilmiştir. İncelenen genler Jun, Stat1A, Stat3A, Stat5A ve Elk-1'dir. Referans gen olarak  $\beta$ -Aktin (ACTB) ve hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) kullanılırken, deney gruplarının normalizasyonu kontrol grubuna göre yapılmıştır. qPCR sonuçları  $\Delta\Delta C_T$  metodu ile analiz edilmiştir.  $\Delta\Delta C_T$  değerleri kullanılarak gen ifadelerindeki göreceli değişim hesaplanarak grafikleri çizilmiştir. Real-time PCR programında denatürasyon 95°C, 10 dakika-amplifikasyon döngüsü (45)-denatürasyon 95°C, 10 dakika-bağlanma 60°C, 30 dakika-uzama 72°C 1 dakika olarak belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Gallik Asit'in Met5A ve SPC212 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Kontrol (Met5A) ve malign mezotelyoma (SPC212) hücrelerine Gallik Asit (GA) uygulanarak maddenin hücre proliferasyonuna etkisi konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak MTS testi ile belirlenmiştir. 0-200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda madde ilave edildikten sonra 0-96 saatlerde hücre canlılığı mitokondriyal aktiviteye göre ölçülmüştür. GA'in Met5a ve SPC212 hücrelerine etkisi öncelikle 0-50  $\mu\text{M}$  dozların da uygulanmıştır. 50  $\mu\text{M}$ <dozlarda indüklenme gözlenirken; 50 $\mu\text{M}$ >dozlarda doza ve zamana bağı baskılanma belirlenmiştir (Şekil 4.1a ve şekil 4.1b) .

GA Met5A hücrelerinde 24 saatte 200  $\mu\text{M}$  ve üzeri dozlarda etkinlik gösterirken SPC212 hücrelerde 100  $\mu\text{M}$  ve üzerinde 48 saatten itibaren hücre proliferasyonunu engellemiştir. Aynı doz Met5A hücrelerini de 96 saatten itibaren hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde etkilemiştir.

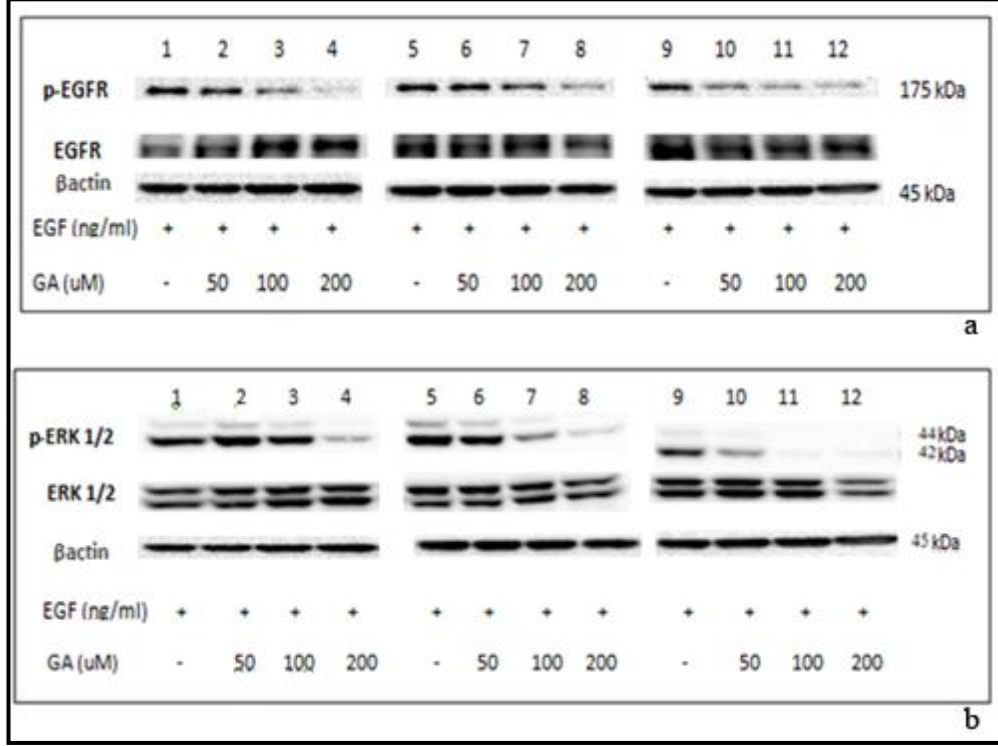


Şekil 4.1: a) Met5A ve b) SPC212 hücrelerine GA'in Kontrol, 50, 75, 100 ve 200µM'lık dozların etkisi. Çiftli yapılan 3 bağımsız deney sonuçlarının ortalamaları alınarak Excel programında hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler SPSS programı yardımıyla ANOVA'da Benferoni ve Dunnett's testi ile hesaplanmıştır. p değeri \*P<0,005 ve #p<0,001 olarak belirlenmiştir.

## 4.2. Gallik Asit'in EGFR ve MAPK Sinyal Yolaklarına Etkisi

SPC212 hücrelerinde, GA'in doz ve zaman-bağımlı olarak tirozin kinaz reseptörü olan EGFR'a ve klasik MAPK (MAPK/ERK) ile stresle aktive olan JNK ve p38 yolağındaki proteinlere etkisi incelenmiştir. Bu deneyler için hücrelere 0-200µM konsantrasyonlarda uygulama yapılarak protein fosforilasyonları ve total protein seviyelerindeki değişimler 6, 12, 24 saatlerde ölçümlenmiştir. Serum starvation yapılan hücreler, GA ile muamele edilip hücre son 15 dk EGF (100 ng/ml) ile indüklendikten sonra liziz edilmiştir. Total protein miktarları BCA assayle belirlendikten sonra, SDS-PAGE, Western Blotlama ve ilgili antikor kullanılarak immün tespitleri yapılmıştır.

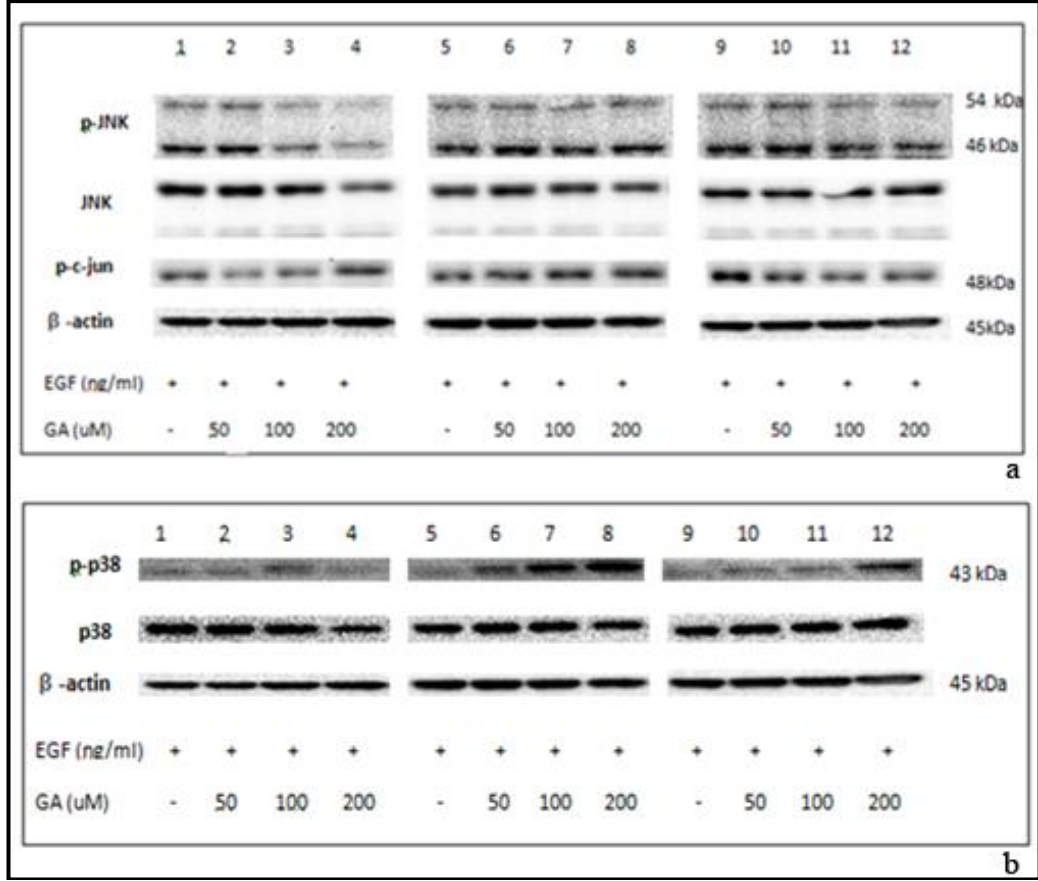
Şekil 4.2a’da görüldüğü üzere GA, 100µM dozda 24 saat içinde EGFR’ın fosforilasyonunda azalmaya neden olurken total EGFR seviyesi üzerine etkin görünmemektedir. 200 µM gibi yüksek dozda ise EGFR fosforilasyonunun 6 saatten itibaren önemli düzeyde inhibe edildiği gözlenmektedir.



Şekil 4.2: a) EGFR ve b) ERK proteinlerinin GA’in etkisine bağımlı olarak doz ve zaman-bağımlı değişimi. 1-4 (6sa), 5-8 (12sa), 9-12 (24sa) göstermektedir.

GA, ERK fosforilasyonunda EGFR’a benzer etki göstermiştir. GA 200 µM konsantrasyonda belirgin olarak 6 saat’ten itibaren ERK fosforilasyonunu azalırken total ERK protein seviyesinde bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 4.2b). Bu deneylerin takibinde GA’in SAPK/JNK fosforilasyonuna ve protein seviyesine etkisi incelenmiş. JNK ve c-jun fosforilasyonlarına 6-24 saatlerde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Total JNK seviyesinde de herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.3a).

Stresle aktive olan diğer MAPK aile üyesi olan p38’in protein fosforilasyonu ve ifadelerine GA’in etkisi incelendiğinde, 6 saatte doza bağımlı artış belirlenmiştir. Fosforilasyon izleyen 12 saat içinde konsantrasyona bağlı azalmıştır. Total protein seviyesinde bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 4.3b).

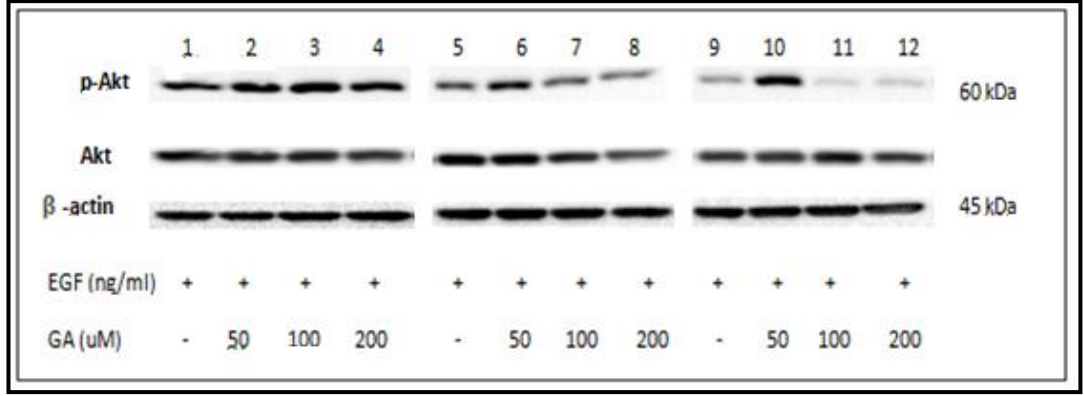


Şekil 4.3: a) JNK, a) c-jun ve b) p38 protein miktarının GA uygulamasıyla etkisinin incelenmesi. 1-4 (6 sa), 5-8 (12 sa), 9-12 (24 sa) göstermektedir.

### 4.3. GA'in PI3K/Akt Yolağına Etkisi

SPC212 hücrelerinde GA'in doz ve zaman bağımlı olarak PI3K/Akt yolağına etkisi AKT fosforilasyonu ve total protein seviyesinde incelenmiştir. Hücrelere 50, 100, 200  $\mu$ M konsantrasyonlarda GA uygulanmıştır.

Şekil 4.3' de görüldüğü gibi GA Akt fosforilasyonunu 100  $\mu$ M ve üzeri dozlarda 12. saatten itibaren baskılayarak 24 saatte tamamiyle inhibe edilmiştir. AKT protein seviyesinde bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 4.4).



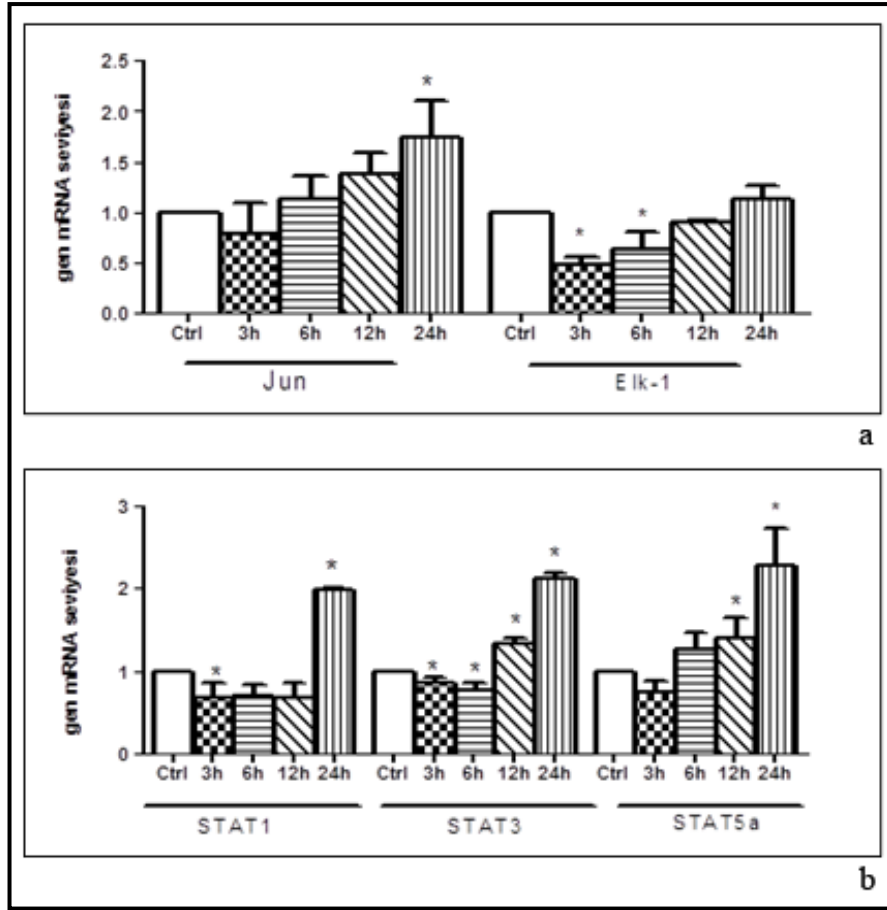
Şekil 4.4: Akt protein miktarının GA etkisinde doz ve zaman bağımlı değişimi. 1-4 (6sa), 5-8 (12sa), 9-12 (24sa)'i göstermektedir.

#### 4.4. GA'in mRNA Seviyesine Etkisi

GA'in 100  $\mu$ M dozu SPC212 hücrelerinde, zamana bağılı olarak, EGFR alt yolağından aşağı akımında yer alan transkripsiyon faktörlere etkisi incelenmiştir. 100 $\mu$ M konsantrasyonda, GA ile muamele edilen hücreler 3, 6, 12 ve 24. saatlerde RNA izolasyonları yapılarak; RT-PCR ile değerlendirilmiştir. İncelenen genler Jun, Elk-1 (Şekil 4.4a) ve Stat1, Stat3, Stat5a (Şekil 4.4b)'dir. Referans gen olarak HPRT1 ve Aktin genleri kullanılarak ve  $\Delta\Delta$ Ct yöntemi ile göreceli miktar değişimi hesaplanmıştır.

Jun mRNA seviyesi 3. saatte az bir azalış gösterirken istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmemiştir, 24. Saatte ise bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.4a). ERK1/2'nin efektörü olarak tanımlanan Elk-1 mRNA seviyesi 3-6 saatte yaklaşık %50 oranında azalırken izleyen 12 saatte artarak tekrar kontrol seviyesine gelmiştir (Şekil 4.5a).

Stat1 mRNA seviyesi 12 saate içinde azalma gösterirken 24 saatte anlamlı olarak artış belirlenmiştir. Stat 3 mRNA, ve Stat5 mRNA seviyelerinde sırasıyla 6 saat 3 saat süresince azalma ardından anlamlı artma göstermiştir (Şekil 4.5b).



Şekil 4.5: a) GA (100 $\mu$ M)'in zamana bağlı olarak jun ve Elk1 transkripsiyon faktörlerinin b) Stat1, Stat3, Stat5 mRNA seviyelerine olan etkisi. Oneway ANOVA kullanılarak Benferoni ve Dunnet's testleriyle SPSS programında analiz edilmiştir. P<0.05 olarak belirlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

MM hastalığıyla ilgili vakalar son yıllarda artmıştır fakat hastalığın henüz çözümlü bir tedavisi bulunmamakla birlikte geliştirilen ilaçların bazıları hastaların genel sağkalımını uzatabilmektedir. Son yıllarda büyüme faktör reseptörleri ve aktive olan hücre içi sinyal iletim yollarının aktivitesinin engellenmesine spesifik antitümör ilaçların geliştirilmesi konusu gündeme gelmiştir. Çeşitli fitokimyasallar kanserin çeşitli *in vivo* ve *in vitro* modellerinde antikanser etki göstermiştir. Bunların arasında bitkilerde aktif bir bileşen olan GA'nın birçok kanser hücre hatlarında büyümeyi baskılayıcı role sahip olduğu bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada GA'nın etkisi mezotelyoma hücrelerinde ilk kez incelenmiştir. Öncelikle GA'nın hücre proliferasyona etkisi değerlendirilmiştir. GA, SPC212 hücreleri üzerinde 48 saatte 100 µM ve üzeri dozlarda etkinlik gösterirken kontrol hücre proliferasyonunu 100 µM dozda 96. saatte baskılamaktadır. 200 µM yüksek dozda ise GA'nın hem kontrol hem de kanser hücrelerini 24 saatte etkilediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda GA uygulanmasının normal hücrelerden ziyade kanser hücrelerini daha düşük konsantrasyon (75 µM 96 saat) ile erken zamanda etkilemesi onun seçiciliğini işaret edebilir. Benzer sonuçlar diğer araştırmalarda da bildirilmiştir. GA'nın normal fibroblast ve endotelial hücrelere karşı sitotoksik olmadığı, normal hücrelerden çok tümör hücrelerinde sitotoksikite gösterdiğini tespit edilmiştir [Jakubowicz-Gil et al., 2005], [Chuang et al., 2010]. Aynı şekilde beyin tümör hücrelerinde [Lu et al., 2010], özofagus kanseri, mide kanseri, kolon kanseri, meme kanseri, akciğer kanser hücrelerinde de bu etki gözlenmiştir [You et al., 2010], [Lu et al., 2010], [Faried et al., 2006]. Bizim sonuçlarımızda olduğu gibi GA'nın 200 µM'dan yüksek konsantrasyonda melanoma hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [Su et al., 2013].

Mezotelyomada EGFR'nin %60-70 oranında aşırı ifade edildiği belirtilmiştir. Bu nedenle kanserlerde EGFR'nin bloke edilmesi yeni biyofarmakolojik yaklaşımların gelişimi için sıklıkla göz önünde bulundurulmuş hedeflerden biridir. EGFR'nin insinirik kinaz aktivitesini hedefleyen küçük molekül TKI'ların kullanımı etkili yaklaşımlardan biridir. Gefitinib ve erlotinib tip I, ATP-kompetitif geri dönüşümlü kinaz inhibitörleridir [Zucali et al., 2011]. Küçük molekül tirozin kinaz inhibitörüyle EGFR sinyalinin inhibisyonu hücre canlılığı ve invazyonunu MM'da

baskılamıştır [Lee et al., 2007]. EGFR'ı hedefleyen Cetuximab ve Panitumumab kolorektal kanserin tedavisi için; Nimotuzumab klinik olarak baş ve boyun kanserinde uygulanmıştır. Bir diğer kimerik antikor, ch806 spesifik olarak wild-type EGFR'in aktif olan formuna bağlanır. Böylece seçici olarak tümöre etki gösterirken normal dokuda etki göstermemiştir [Wykosky et al., 2011]. Diğer bir çalışmada EGFR eksprese eden mezotelyoma hücre hatlarında EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) gefitinib ve PD153035'in büyüme inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir. Araştırmamızda, GA uygulanarak yapılan protein analiz deneylerinde doz ve zamana bağımlı olarak EGFR'in fosforilasyonunun baskılandığını gözlemledik. GA SPC212 hücrelerinde 100  $\mu$ M ve üzeri konsantrasyonda 24 saat içinde EGFR fosforilasyonunu inhibe ederken EGFR protein seviyeleri üzerine etkisi belirlenmemiştir. GA MAPK fosforilasyonlarını da EGFR'a benzer motifte baskılamıştır. GA'in ERK fosforilasyonuna etkisi hücelere göre farklılık göstermektedir. B16F10 melanom hücrelerinde GA ERK fosforilasyonunu inhibe ederken HT-35 rahim ağzı kanserinde ve akciğer kanserinde böyle bir etki görülmemiştir [Su et al., 2013]. Bu bulgular GA'in ERK fosforilasyonunu inhibe edebilme özelliğinin hücre tipine özgü olduğunu işaret edebilir.

Stresle aktive olan SAPK/JNK yolağının elemanı olan JNK protein fosforilasyonu GA muamelesi takibinde 24 saat içinde değişmemiştir. İlâveten transkripsiyon faktör c-jun fosforilasyonunda da bir değişim belirlenmemiştir. Bu sonuç GA uygulanan MM hücrelerde bu yolağın aktive olmadığını işaret etmektedir. Ancak, yapılan diğer bir çalışmada GA uygulanmasının kemik tümöründe JNK fosforilasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu durumda GA tarafından düzenlenen yolakların hücre tipine bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini düşünülebilmektedir. Diğer stres yolağı olan p38'in aktive olması bu yolağın GA tarafından indüklendiğini göstermektedir. Benzer sonuç kemik tümöründe de görülmüştür [Liang et al., 2012]. Bilindiği üzere p38 yolağı stres karşısında aktive olan bir sistemdir. İlâveten p38 yolağının aktivasyonu p53 üzerinden apoptotik yolağın aktivasyonuna da neden olabilir [Wagner and Nebreda, 2009]. Tümör baskılayıcı protein p53 önemli p38 hedefidir. P53 düzenlenmesinde p38 $\alpha$ 'nın rolünü destekleyen veriler bulunmaktadır. Örneğin cisplatin gibi farklı kemoterapötik ilaçlara yanıtta p38 $\alpha$ , apoptozun başlamasına neden olan p53'ü fosforile ya da aktive eder. P38 $\alpha$ 'in ayrıca diğer uyarılara yanıtta p53 aracılığıyla apoptoza neden olduğu belirtilmiştir [Porras and Guerrero, 2010].

Bilindiği gibi AKT sinyal yolağı büyüme faktörleri aracılığıyla hücre canlılığını iletir. Hücre döngüsü düzenlenmesi ve anti-apoptotik içerilen proteinleri fosforile eder. Mezotelyoma modellerinde PI3K/AKT/mTOR yolağında aktivasyon artışı görülmektedir [Fennell et al., 2011]. Hücrelerimize GA uygulanması AKT fosforilasyonunu 100  $\mu$ M üzeri dozlarda 12 saatten itibaren baskılamaktadır. Bu sonuç AKT yolağının GA bağlantılı olarak baskılandığını işaret etmektedir. Diğer çalışmalarda GA uygulanması rahim ağzı kanserinde ve beyin tümöründe AKT'nin fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [Zhao and Hu, 2013]. Ancak melanomada ise GA'in uygulanmasının AKT fosforilasyonunu artırdığı gösterilmiştir [Su et al., 2013].

AKT'nin down-regülasyonu ölüm sinyallerini güçlendirirken, up-regülasyonu apoptotik programı inhibe eder. Bu özelliği düşünüldüğünde AKT'nin baskılanması tümör hücre büyümesi için önem teşkil etmektedir. NSCLC hücre hatlarında yapılan bir çalışmada gefitinibe yanıtta AKT down-regüle edilmiştir [Takeuchi and Ito, 2009]. Gefitinib, (EGFR-TKI); MM hücre hatlarında AKT fosforilasyonu ve extracellular signal-regulated kinase 1/2'i içeren EGFR bağımlı hücre sinyalini inhibe ettiği gösterilmiştir [Lee et al., 2007].

ERK1/2'nin efektörü olan Elk-1 bağımlı transkripsiyon çoğalma, büyüme ve farklılaşmayla ilişkilidir. Elk1, erken yanıt genlerinin önemli bir düzenleyicisi olarak tanımlanır. Bu genler, MAPK yolağını aktive eden ekstraselüler liganda maruz kalmanın ardından geçici ve hızlı bir şekilde indüklenirler [Boros et al., 2009]. Bu çalışmada GA uygulanması 6 saat içinde Elk1 mRNA seviyesini azaltmıştır. ERK fosforilasyonunda 100 $\mu$ M'da aynı zaman diliminde azalmanın olması ERK inhibisyonunun Elk1 mRNA seviyesini azalttığını düşündürebilir. Elk1 seviyesi 12 saat içinde yukarı düzenlenmiştir. Erken yanıt geni olan Jun hücrelerin uyarılmasının ardından ekspresyonunun indüksiyonu hızlı ve kısa sürelidir. jun ekspresyonu GA uygulanan hücrelerde 3 saatlik zaman diliminde düşüş göstereceği bu anlamlı bulunmamıştır. İlginç olarak 24 saat içinde jun gen ekspresyonunda az da olsa artış gözlenmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi JNK proteinlerinde bir değişim tespit edilmemiştir ve JNK, jun'un yukarı düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu durum jun mRNA ifadesinin başka bir yoldan etkilendiğini işaret edebilir. Yapılan bir çalışmada hücrelere 2 saat MEK/ERK inhibitörü uygulanmasının c-Jun transkripsiyon seviyesini azalttığı gösterilmiştir [Lopez-Bergami et al., 2007]. Bu da ERK'in c-Jun mRNA seviyelerini düzenlediğini düşündürür. Diğer bir çalışmada da

c-Jun geninin transkripsiyonel düzenlenmesinin JNK ve ERK1/2 tarafından sağlandığı belirtilmiştir [Kayahara et al., 2005]. GA uygulaması hücrelerimizde ERK fosforilasyonunu baskılamaktadır. Bu nedenle, c-Jun mRNA seviyesindeki değişim belki de bu yolakla ilgilidir. Kesin bir sonuç için bu konu daha detaylı araştırılmalıdır.

STAT'lar büyüme faktör uyarımı ve sitokine yanıtta nukleusa geçen ve gen ekspresyonunu düzenleyen sitoplazmik transkripsiyon faktörleridir [Bramberg and Darnell, 2000]. Gen ekspresyonu üzerinden hücre proliferasyonuna ve ölüme yol açar. STAT'lar bazen hücre içinde birbirine zıt olaylara aracılık ederler. Apoptozu uyarabildikleri gibi hücre proliferasyonunu da indükleyebilirler [Yılmaz ve Turgay, 2009]. STAT1'in fizyolojik rolü hücre tipine bağlı olsa da onun aşırı ekspresyonu kanser hücre hayatta kalmasında rol oynar [Forester et al., 2012]. Çalışmamızda GA STAT1 mRNA ekspresyonunu 12 saat içinde down regüle etmiş ve daha sonra 24 saatte yukarı düzenlendiği tespit edilmiştir. STAT1 down regülasyonu GA uygulanmış Coco-2 hücrelerinde belirlenmiştir. Bu hücrelerde STAT1'in down regülasyonundan dolayı DNA bağlanma kapasitesinde %30 düşüş belirlenmiştir [Forester et al., 2012]. Bununla birlikte down regülasyon Coco-2 hücrelerinde daha uzun süreli gözlenmiştir. STAT1 büyüme baskılanmasında önemli bir rol oynar, aktivasyonu sıklıkla antiproliferatif etki gösterir. Tümör baskılayıcı özelliğine rağmen STAT1 ekspresyonundaki azalma GA'in' farklı bir yolak üzerinden proliferasyonu baskıladığını düşündürebilir. Bununla birlikte STAT1 mRNA seviyesinin 24.saaate yükselmesi hücreleri apoptoza yönlendirme amaçlı olabileceğide akla getirebilir. Bilindiği gibi STAT3 ve STAT5 çoğu insan tümörünün kontrolsüz büyümesinde önemlidir. STAT3 ve 5 benzer fonksiyonlara sahiptir. Önemli hedef genlerin ekspresyonlarını düzenleyerek onkojenik olabilirler. Aktivasyonları apoptozu önleyen ve hücre çoğalmasını uyarın hedef genleri uyarır [Bromberg and Darnell, 2000]. Çalışmamızda STAT3'ün mRNA ekspresyonun 6 saat süresince aşağı düzenlendiğini gözlemledik, sonrasında zamana bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. NSCLC ile yapılan bir araştırmada STAT3'ün mRNA ekspresyonunun cisplatine duyarlı hücrede düştüğü ve STAT3'ün artan transkripsiyonel seviyesinin apoptotik yolağın baskılanmasıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir [Ikuta et al., 2005]. Lösemide curcuminin STAT5 mRNA'nın ekspresyonunu inhibe ettiği ve STAT5'in aktivasyonunu azalttığı yapılan başka bir çalışmada gösterilmiştir [Chen et al., 2004]. Bizim hücrelerimizde STAT3 ve STAT5'in GA'in etkisiyle aşağı regüle edildikten

sonra transkripsiyonel aktivitenin artması belki de apoptotik yolağı baskılamak ya da hayatta kalmak amaçlı olarak hücrelerin verdiği tepki kaynaklı olabilir. Bununla birlikte tez kapsamında olmayan verilerimiz göstermektedir ki 24 saat içinde GA (100µM) apoptoza neden olmaktadır.

Sonuç olarak bu tez kapsamında artan doz ve zamanla GA'in MM hücrelerinde antiproliferatif etkisi olduğunu, EGFR fosforilasyonunu konsantrasyon ve zamana bağlı olarak inhibe ettiğini ve aşağı yolakta yer alan ERK, AKT moleküllerin fosforilasyonlarında inhibisyonuna, p38 yolağının aktivasyonuna yol açarken JNK yolağı üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. GA uygulanması STAT1, 3, 5 mRNA seviyelerini de zamana bağımlı olarak azalttıgıda gözlemlenmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmada, GA'e yanıtta p38'in p53 aracılığıyla apoptoza olan etkisine; MAPK yolağının hedef genlerinin CyclinD, p21 ve anti-apoptotik gen bcl-2 ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenebilmesi düşünülmektedir. Çalışma GA'in MM hücrelerinin pathway düzeyindeki moleküler mekanizmasına ışık tutmuş, ileride yapılacak çalışmalar doğrultusunda belkide MM tedavisinde kullanılabilirliği sağlanacaktır.

## KAYNAKLAR

Agarwal C., Tyagi A., Agarwa R., (2006), "Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells", *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (12), 3294-3302

Agarwal V., Lind J., Cawkwell L., (2010), "Targeted epidermal growth factor receptor therapy in malignant pleural mesothelioma: Where do we stand?", *Cancer Treatment Reviews*, 37 (7), 533-542

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (2006) "Molecular Biology of the Cell", 4th edition, Garland Science

Babich H., Schuck A. G., Weisburg J. H., Zuckerbraun H. L., (2011), "Research Strategies in the Study of the Pro-Oxidant Nature of Polyphenol Nutraceuticals", *Journal of Toxicology*, 1-12

Baselga J., Swain S. M., (2009), "Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3", *Nature Reviews Cancer*, 9 (7), 463-475

Bianco R., Gelardi T., Damiano V., Ciardiello F., (2007), "Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (7-8), 1416-1431

Boros J., Donaldson I., Sharrocks A., (2009), "Elucidation of the ELK1 target gene network reveals a role in the coordinate regulation of core components of the gene regulation machinery", *Genome Research*, 19 (11), 1963-1973

Bou-Assaly W., Mukherji S., (2010), "Cetuximab (Erbix)", *American Journal of Neuroradiology*, 31 (4), 626-627

Bromberg J., Darnell J., (2000), "The role of STATs control and their impact on cellular function", *Oncogene* 19 (21), 2468-2473

Cappuzzo F., Magrini E., Ceresoli G., (2004), "Akt Phosphorilation and Gefitinib Efficacy in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer", *Journal of the National Cancer Institute*, 96 (15), 1133-1141

Carbone M., Strianese O., Theos K., Yang H., (2007), "Mesothelioma", *Hawaii Medical Journal*, 66 (2), 48-50

Chen C. Y, Chen K. C., Yang T. Y., (2013), "Gallic Acid Induces a Reactive Oxygen Species-Provoked c-Jun NH2-Terminal Kinase-Dependent Apoptosis in Lung Fibroblasts", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-12

Chen H., Wu Y., Chia Y., Chang F., Hsu H., Hsieh Y., Chen C., Yuan S., (2004) "Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells", *Cancer Letters*, 286 (2), 161–171

Chuang C. Y., Liu H. C., Wu L. C., Chen C. Y., Chang J. T., Hsu S. L., (2010), "Gallic Acid Induces Apoptosis of Lung Fibroblasts via a Reactive Oxygen Species-Dependent Ataxia Telangiectasia Mutated-p53 Activation Pathway", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (5), 2943-2951

Cristaudo A., Foddìs R., (2005), "SV40 Enhances the Risk of Malignant Mesothelioma among People Exposed to Asbestos: A Molecular Epidemiologic Case-Control Study", *Cancer Research*, 65 (8), 3049-3052

Favoni R. E., Pattorozzi A., Lo Casto M., (2010), "Gefitinib targets EGFR dimerization and ERK1/2 phosphorylation to inhibit pleural mesothelioma cell proliferation", *Current Cancer Drug Targets*, 10 (16), 176-191

Forester S. C., Choy Y. Y., Waterhouse A. L., Oteiza P. I., (2012), "The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-*O*-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals", *Molecular Carcinogenesis*, 53 (3), 169-252

Foster J., Radhakrishna U., Govindarajan V., Carreau J. H., Gatalica Z., Sharma P., Nath S. K., Loggie B. W., (2010), "Clinical implications of novel activating EGFR mutations in malignant peritoneal mesothelioma", *World Journal of Surgical Oncology*, 8 (88), 1-10

García-Rivera D., Delgado R., Bougarne N., Haegeman G., Berghe W., (2011), "Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of *Mangifera indica* L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells", *Cancer Letters*, 305 (1), 21–31

Gibellini L., Pinti M., Nasi M., Biasi S., Roat E., Bertocelli L., Cossarizza A., (2010), "Interfering with ROS Metabolism in Cancer Cells: The Potential Role of Quercetin", *Cancers*, 2 (2), 1288-311

Han X., Shen T., Lou H., (2007), "Dietary Polyphenols and Their Biological Significance", *International Journal of Molecular Sciences*, 8 (9), 950-988

Hou Z., Sang S., You H., Lee M., Hong J., Chin K., Yang C., (2005), "Mechanism of Action of -Epigallocatechin-3-Gallate: Auto-oxidation-Dependent Inactivation of Epidermal Growth Factor Receptor and Direct Effects on Growth Inhibition in Human Esophageal Cancer KYSE 150 Cells", *Cancer Research*, 65 (17), 8049-8056

Ikuta K., Takemura K., Kihara M., Nishimura M., Ueda N., Naito S., Lee E., Shimizu E., Yamauchi A., (2005), "Overexpression of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 mRNA in cisplatin-resistant human non-small cell lung cancer cells", *Oncology Report*, 13 (2), 217-222

Jakubowicz-Gil J., Paduch R., Piersiak T., Glowniak K., Gawron A., Kandeferszerzen M., (2005), "The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells", *Biochemical Pharmacology*, 69 (9), 1343-1350

Kang N., Shin S., Lee H., Lee K., (2011), "Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis", *Pharmacology & Therapeutics*, 130 (3), 310–324

Kayahara M., Wang X., Tournier C., (2005), "Responsive Element and Myocyte - Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Kinases via the 12-O-Expression by Mitogen-Activated Protein Selective Regulation of *c-jun* Gene Enhancer Factor 2 Binding Sites", *Molecular Cell Biology*, 25 (9), 3784-3792

Kindler H. L., (2008), "Systemic treatments for mesothelioma: standard and novel", *Current Treatment Options Oncology*, 9 (2-3), 171-179

Lee D. H., Lee G. K., Kong S. Y., Kook M. C., Yang S. Y., Park S. Y., Park S. H., Keam B., Park D. J., Cho B. Y., Kim S. W., Chung K. W., Lee E. S., (2007), "Epidermal growth factor receptor status in anaplastic thyroid carcinoma", *Journal Clinical Pathology*, 60 (8), 881-884

Levitzki A., Klein S., (2010), "Signal transduction therapy of cancer", *Molecular Aspects of Medicine*, 31 (4), 287–329

Liang C. Z., Zhang X., Li H., Tao Y. Q., Tao L. J., Yang Z. R., Zhou X. P., Shi Z. L., Tao H. M., (2012), "Gallic Acid Induces the Apoptosis of Human Osteosarcoma Cells In Vitro and In Vivo via the Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways", *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 27 (10), 701–710.

Lopez-Bergami P., Huang C., Goydos J., Yip D., Bar-Eli M., Herlyn M., Keiran S. M., Mahale A., Eroshkin A., Aaronson S., and Ronai Z., (2007), "Rewired ERK-JNK Signaling Pathways in Melanoma", *Cancer Cell*, 11 (5), 447–460

Lu Y., Jiang F., Jiang H., Wu K., Zheng X., Cai Y., Chopp M., To T.S., (2010), "Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells", *Molecular and Cellular Pharmacology*, 641 (2-3), 102-107

Meister M., Tomasovic A., Banning A., Tikkanen R., (2013), "Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins :A Recount", *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (3), 4854-4884

Mitsudomi T., Yatabe Y., (2009), "Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer", *The FEBS Journal*, 277 (2), 301–308

Miyoshi S., Hamada H., Hamaguchi N., Kato A., Katayama H., Irifune K., Ito R., Okura T., Higak J., (2012), "Antitumor activity of MEK and PI3K inhibitors against malignant pleural mesothelioma cells in vitro and in vivo", *International Journal of Molecular Sciences*, 41 (2), 449-456

Mizuno H., Cho Y., (2006), "Theaflavin-3, 3'-Digallate Induces Epidermal Growth Factor Receptor Down-Regulation", *Molecular Carcinogenesis*, 45 (3), 204–212.

Ngo D., Qian D. H., Ngo Z. J., Vo D. N., (2011), "Gallyl chitoooligosaccharides inhibit intracellular free radical-mediated oxidation", *Food Chemistry*, 128 (4), 974-981

Okuda K., Sasaki H., Kawano O., Yukiue H., Yokoyama H., Yano M., Fujii Y., (2008), "Epidermal growth factor receptor gene mutation, amplification and protein expression in malignant pleural mesothelioma", *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 134 (10), 1105–1111

Ou W., Hubert C., Corson J., Bueno R., Flynn D., Sugarbaker D., Fletcher J., (2011), "Targeted Inhibition of Multiple Receptor Tyrosine Kinases in Mesothelioma", *Neoplasia*, 13 (1), 12–22

Pines G., Köstler W. J., Yarden Y., (2010), "Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy" *FEBS Letters*, 584 (12), 2699-2706

Porpodis K., Zarogoulidis P., Boutsikou E., Papaioannou E., Machairiotis N., Tsakiridis K., Katsikogiannis N., Zaric B., Perin B., Huang H., Kougioumtzi I., Spyrtatos D., Zarogoulidis K., (2013), "Malignant pleural mesothelioma: current and future perspectives", *Journal of Thoracic Disease*, 5 (4), 397-406

Porrás A., Guerrero C., (2010), "Role of p38 $\alpha$  in apoptosis: implication in cancer development and therapy", *Atlas Genetic and Cytogenetic in Oncology and Haematology*, 15 (3), 316-326

Ramos S., (2008), "Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways", *Molecular Nutrition & Food Research*, 52 (5), 507 – 526

Ramos-Nino M. E., Testa J. R., Altomare D. A., Pass H. I., Carbone M., Bocchetta M., Mossman B. T., (2006), "Cellular and Molecular Parameters of Mesothelioma", *Journal of Cellular Biochemistry*, 98 (4), 723-734

Robinson B. W., Musk A. W., Lake R. A., (2005), "Malignant mesothelioma", *The Lancet*, 366 (9483), 397-408

Sekido Y., (2008), "Molecular biology of malignant mesothelioma", *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13 (2), 65–70

Sharma A., Gautam S. P., Gupta A. K., (2011), "Surface modified dendrimers: synthesis and characterization for cancer targeted drug delivery", *GuptaBioorganic & Medicinal Chemistry*, 19 (11), 3341-3346

Son Y., Cheong Y. K., Kim N. H., Chung H. T., Kang D. G., Pae H. O., (2011), "Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?", *Journal of Signal Transduction*, 1-6

Su T. R., Lin J. J., Tsai C. C., Huang T. K., Yang Z. Y., Wu M. O., Zheng Y. Q., Su C. C., Wu Y. C., (2013), "Inhibition of Melanogenesis by Gallic Acid: Possible Involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathways in B16F10 Cells", *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10), 20443–20458

Takeuchi K., Ito F., (2009), "EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors", *FEBS Journal*, 277 (2), 316-326

Verma S., Singh A., Mishra A., (2013), "Gallic acid: molecular rival of cancer", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35 (3), 473-485

Walker S. R., Frank D. A., (2012), "Screening approaches to generating STAT inhibitors", *Department of Medical Oncology*, 1 (4), 292-299

Wagner E. and Nebreda Á., (2009), "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development", *Nature Reviews*, 9, 537-549

Web 1, (2013), <http://www.abcam.com> (Erişim Tarihi: 10/12/2013).

Wykosky J., Fenton T., Furnari F., Cavenee W., (2011), "Therapeutic targeting of epidermal growth factor receptor in human cancer: successes and limitations", *Chinese Journal of Cancer*, 30 (1), 5-12

Yılmaz Ö., Turgay N., (2009), "Sitokin İlişkili Hücre İçi Sinyal İletimi ve Paraziter Enfeksiyonlardaki Önemi", *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33 (4), 301 – 306

You B. R., Moon H., Han Y., Park W., (2010), "Gallic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via apoptosis and/or necrosis", *Food and Chemical Toxicology*, 48 (5), 1334-1340

You B., Park W., (2010), "Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase", *Toxicology in Vitro*, 24 (5), 1356–1362

Yoshimura N., Kudoh S., Kimura T., Mitsuoka S., Matsuura K., Hirata K., Matsui K., Negoro S., Nakagawa K., Fukuoka M., (2005), "EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib", *Lung Cancer*, 51 (3), 363-368

Zandi R., Larsen A., Andersen P., Stockhausen M., Poulsen H., (2007), "Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor", *Cellular Signalling*, 19 (10), 2013–2023

Zucali P., Ceresoli G. L., Vincenzo D., Simonelli M., Lorenzi E., (2011), "Advances in the biology of malignant pleural mesothelioma", *Cancer Treatment Reviews*, 37 (7), 543-558

## **ÖZGEÇMİŞ**

Gülşife Candemir 2010 yılında Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (GYTE), Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitimine 2010 yılında başlayıp, 2014 yılında mezun oldu.