

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IGF-1R SİNYAL YOLAĞININ GENİSTEİNLE REGÜLASYONUNDA P53'ÜN ROLÜ

EKİN KESTEVUR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2017

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IGF-1R SİNYAL YOLAĞININ GENİSTEİNLE
REGÜLASYONUNDA P53'ÜN ROLÜ

EKİN KESTEVUR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. CAN MURATHAN ERİŞTİ

GEBZE
2017

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**ROLE OF P53 IN THE REGULATION OF IGF-1R
PATHWAY WITH GENISTEIN**

EKİN KESTEVUR

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

ASSIST. PROF. DR.CAN MURATHAN ERİŞTİ

GEBZE

2017



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/06/2017 tarih ve 2017/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/07/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ekin KESTEVUR'un tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. Can Murathan ERİŞTİ

ÜYE

: Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Nagehan ERSOY TUNALI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Akciğer kanseri dünyada en yaygın görülen ve ölüm oranı en yüksek olan kanser türüdür. Erken safhalarda teşhisinin güç olması ve ileri dönemlerde günümüzdeki tedavi yöntemlerinin yeterli olmaması yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini gerektirmektedir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1 (IGF-1R), akciğer kanseri dahil çoğu kanser tipinde aşırı ifadelenen bir reseptör tirozin kinaz molekülüdür. IGF-1R aktivitesi kanser hücre farklılaşması, hücre göçü, invazyon, anjiyogenez ve metastaz süreçlerinin devamlılığı için gereklidir.

Genistein soya özütünden elde edilen östrojen analogu bir izoflavondur. Östrojene benzerliği sayesinde östrojen reseptörü (ER) ve IGF-1R sinyal yollarına bağlanarak inhibisyona neden olmakta ve kanser hücre bölünmesinin durdurulmasını sağlamaktadır. Doğal bir ürün olması, yüksek dozlarda bile düşük toksisiteye sahip olması, radyoterapinin olumsuz etkilerine karşı koruyucu olması ve kemoterapide kullanılan kimyasalların daha düşük dozlarda etkili olmasını sağlaması sebebiyle kanser araştırmalarında tercih edilen bir kimyasaldır.

Bu çalışmada genistein-IGF-1R ilişkisinde tümör baskılayıcı protein olan p53'ün rolü belirlenmek istenmiştir. NSCLC hücre hatlarıyla yapılan deneylerde genisteinin yüksek dozlarda kullanıldığında p53 pozitif hücrelerde hücre bölünmesini durdurduğu, tübin polimerizasyonunu engelleyerek hücre şekillerini bozduğu, p53 negatif hücrelerde ise hücre bölünmesinde yavaşlamaya yol açtığı belirlenmiştir. Genisteinin farklı kanser türleri (prostat, meme) üzerinde daha önce gösterilen IGF-1R yolağını baskılama yetisinin NSCLC'de görülmemesi bu durumun hücre tipine özgü olduğunu göstermektedir. P53 miktarı yüksek dozda genistein kullanımıyla artan p53 pozitif hücrelerde p53 fosforilasyonunun gerçekleşmiyor olması, genistein-IGF-1R ilişkisinde p53 miktarındaki artışın tek başına yeterli olmadığını, p-p53 seviyelerinde de artışın gerekli olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: IGF-1R, Genistein, p53, Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (NSCLC).

SUMMARY

Lung cancer is the most common cancer type in the world with the highest mortality rate. In the future new therapeutic approaches need to be developed because of the difficulty of diagnosing at an early stage and the fact that the current treatment modalities are not effective enough or late stages.

Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) is an overexpressing receptor tyrosine kinase molecule in many cancer types, including lung cancer. IGF-1R activity is required for cancer cell differentiation, cell migration, invasion, angiogenesis and the continuity of metastatic processes.

Genistein is an estrogen analogue which extract from soy as an isoflavone. As a result of estrogen analogy, it binds to the estrogen receptor (ER) and IGF-1R signaling pathways, leading to inhibition and arresting cancer cell division. It is a preferred chemical in cancer research because it is a natural product, it has low toxicity even at high doses, protects against the adverse effects of radiotherapy and provides that chemotherapeutic chemicals are effective at lower doses.

In this study, we aimed to determine the role of p53, a tumor suppressor protein, in relation to genistein-IGF-1R. In experiments with NSCLC cell lines, it has been determined that when genistein is used at high doses, it stops cell division in p53-positive cells, blocks cell formation by inhibiting tubulin polymerization, and slows cell division in p53-negative cells. The fact that genistein does not show the ability to inhibit the IGF-1R pathway, which previously shown on different cancer types (prostate, breast), in NSCLC, suggests that this effect is cell type specific. The fact that p53 phosphorylation does not occur in p53-positive cells, which have increased levels of p53 by the use of high-dose genistein, suggests that an increase in the amount of p53 alone is not sufficient in relation to genistein-IGF-1R and an increase in p-p53 levels is also necessary.

Key Words: IGF-1R, Genistein, p53, Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince yardım ve desteğini esirgemeyen hocam ve danışmanım Sn. Yrd. Doç. Dr. Can Murathan ERİŞTİ'ye,

Yüksek lisans eğitimim süresince yardımını esirgemeyen hocam Sn. Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU'na,

Çalışma arkadaşlarım Zeynep SAYYAR, Fatma DOĞRU, Mehmet SARIHAN'a ve tüm MBG ailesine,

Her zaman destek olan Yasin SAYYAR, Nalan KAYA, Ezgi KARACA, Sena UÇAR, Ayşe TÜRKAN ve Cengiz DOĞRU'ya,

Sevgilerini esirgemeyen babam Ahmet KESTEVUR, annem Neriman KESTEVUR ve kardeşim Ezgi KESTEVUR'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	3
2.2. Akciğer Kanseri Tedavi Yöntemleri	5
2.3. NSCLC ve SCLC	6
2.4. İzoflavonlar	8
2.4.1. Genistein	11
2.4.2. Genisteinin Kanser Hücrelerine Etkisi	14
2.5. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri	17
2.5.1. IGF-I	17
2.5.2. IGF-II	19
2.6. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlanma Proteinleri	20
2.7. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri	21
2.7.1. IGF-1R	21
2.7.1.1. IGF-1R Sinyal Yolağı	24
2.7.1.2. IGF-1R Kanser İlişkisi	27
2.7.1.3. IGF-1R Bağlantılı Tedavi Yöntemleri	31
2.7.2. IGF-2R	35
2.8. p53	36
2.8.1. p53 Bağlantılı Sinyal Yolakları	38
2.9. Konu ile İlgili Çalışmalar	39

2.9.1. IGF-1R p53 İlişkisi	39
2.9.2. NSCLC IGF-1R İlişkisi	41
2.9.3. Genistein p53 İlişkisi	43
2.9.4. NSCLC Genistein Uygulamaları	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Kimyasal Maddeler	49
3.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler	49
3.1.3. Hücre Hatları	50
3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar	50
3.2. Yöntem	51
3.2.1. Hücre Kültürü	51
3.2.1.1. Hücre Ekimi	52
3.2.1.2. Alt Kültürleme	53
3.2.1.3. Hücre Stoklama	53
3.2.2. Hücre Transfeksiyonu	53
3.2.2.1. siRNA Transfeksiyonu	53
3.2.2.2. Plazmid Transfeksiyonu	54
3.2.3. Total RNA İzolasyonu	55
3.2.4. cDNA Sentezi	55
3.2.5. RT-qPCR	55
3.2.6. Protein İzolasyonu	56
3.2.7. SDS-Page ve Western Blotting	56
3.2.8. Dual Lusiferaz Raportör Testi	57
4. BULGULAR	59
4.1. siRNA Transfeksiyonu	59
4.2. Genisteinin IGF-1R Proteinini Doza Bağlı Regülasyonunda p53 Proteininin Etkisinin İncelenmesi	61
4.3. Genisteinin IGF-1R İfadelenmesini Doza Bağlı Regülasyonunda p53 Proteininin Etkisinin İncelenmesi	68
4.4. Genisteinin IGF-1R Promotörünü Doza Bağlı Regülasyonunda p53 Proteininin Etkisinin İncelenmesi	70
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	77

KAYNAKLAR

96

ÖZGEÇMİŞ

122

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve

Kısaltmalar:

Açıklamalar:

AG1024	: IGF-1R otofosforilasyon inhibitörü
AG1478	: EGFR tirozin kinaz inhibitörü
ALS	: Acid-labile subunit
APE1/Ref1	: Apürinik endonükleaz/redoks faktör 1
AR	: Androjen reseptörü
BMS-536924	: IR ve IGF-1R'nin ATP yarışmalı inhibitörü
CAMP	: Siklik adenzin monofosfat
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester, NF-κB inhibitörü
CDKN2A	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
COX-2	: Siklooksijenaz 2
CP-751,871	: Figitumumab, IGF-1R monoklonal antikoru
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	: Östrojen reseptörü
FGFR	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz 3 beta
H7C10/MK-0646	: Dalotuzumab, IGF-1R monoklonal antikoru
HIF-1α	: Hypoxia inducible factor
IGF-1R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1
IGF-2R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 2
IGF-I	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IGF-II	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 2
IGFBP	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlanma proteini
IR	: İnsülin reseptörü
IRS-1	: İnsülin reseptör substratı 1

LH	: Lüteinleştirici hormon
LİNSİTİNİB	: IR ve IGF-1R'nin ATP yarışmalı inhibitörü
LY294002	: PI3K inhibitörü
MAPK	: Mitogen-activated protein kinaz
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NF-κB	: Nükleer faktör kappa b
NNK	: Nicotine-derived nitrosamine ketone
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
PD173074	: FGFR ve VEGFR'in ATP yarışmalı inhibitörü
PR	: Progesteron reseptörü
PSA	: Prostat spesifik antijen
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu
PQIP	: IR ve IGF-1R'nin tirozin kinaz inhibitörü
R1507	: IGF-1R monoklonal antikoru
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
SCLC	: Küçük hücreli akciğer kanseri
SEER	: Surveillance Epidemiology and Results Program
SP1	: Specificity protein 1
TGF	: Tümör büyüme faktörü
TNFR-1	: Tümör nekroz faktör reseptörü 1
TSA	: Tümör spesifik antijen
U-PA	: rokinaz
VEGFR	: Vasküler endoteryal büyüme faktörü reseptörü
WT1	: Wilms tümör

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
<u>No:</u>		
2.1:	Soya izoflavonlarının (genistein, daidzein, glycitein) kimyasal yapısı.	11
2.2:	Genistein ve estradiol kimyasal yapılarının karşılaştırılması.	13
2.3:	Genistein bağlantılı yolların şematik gösterimi.	14
2.4:	IGF-I, IGF-II ve insülin protein yapıları.	17
2.5:	IGF-1R ve IR protein yapılarının gösterimi.	23
2.6:	IR ve IGF-1R protein yapılarının ligandlarıyla birlikte gösterimi.	25
2.7:	IGF sinyal yolağı.	26
2.8:	p53 tetramer yapısının DNA'ya bağlı formda gösterimi.	37
4.1:	Farklı siRNA:transfeksiyon ajanı oranlarının p53 protein ve mRNA seviyeleri üzerine etkisi.	60
4.2:	a) Kontrol A549 hücreleri ve b) p53 siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerin karşılaştırılması.	61
4.3:	a) A549 hücrelerine genistein uygulanması sonucu p53 protein miktarındaki değişiklik, b) A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin farklı genistein dozlarında p53 miktarlarını gösteren poliakrilamid jel görüntüleri.	62
4.4:	A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin farklı genistein dozlarında p-p53 miktarlarını gösteren a) protein miktarlarındaki değişiklik grafiği, b) poliakrilamid jel görüntüleri.	63
4.5:	a) A549 ve H1299 hücrelerine genistein uygulanması sonucu IGF-1R protein miktarlarındaki değişiklik, b) A549 ve H1299 hücrelerinde farklı genistein dozlarında IGF-1R miktarlarını gösteren poliakrilamid jel görüntüleri.	64
4.6:	a) A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde genistein uygulamasına bağlı EGFR protein miktarlarındaki değişiklik, b) A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde EGFR protein	65

	miktarlarını gösteren poliakrilamid jel görüntüleri.	
4.7:	Farklı konsantrasyonlarda genistein uygulanan A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin görsel olarak karşılaştırılması.	66
4.8:	Farklı konsantrasyonlarda genistein uygulanan H1299 hücrelerinin görsel olarak karşılaştırılması.	67
4.9:	Farklı konsantrasyonlarda genistein uygulaması sonucu A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücre sayılarında yüzdesel değişim.	67
4.10:	A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin p53 mRNA seviyeleri.	68
4.11:	A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinin IGF-1R mRNA seviyeleri.	69
4.12:	A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinin EGFR mRNA seviyeleri.	70
4.13:	IGF-1R promotörünün ifadenme seviyelerinin kontrolünde rol alan proteinler.	71
4.14:	A549 ve H1299 hücrelerinde IGF-1R promotör etkinliği.	72
4.15:	A549 hücrelerinde transfeksiyon etkinliğinin karşılaştırılması.	73
4.16:	A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinde farklı IGF-1R promotör bölgeleri içeren plazmitlerin ifadenme miktarlarının genistein uygulamalarına bağlı olarak değişimi.	74
4.17:	H1299 hücrelerinde farklı IGF-1R promotör bölgeleri içeren plazmitlerin ifadenme miktarlarının genistein uygulamalarına bağlı olarak değişimi.	76

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Akciğer kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları.	8
5.1: A549 ve H1299 hücre sayılarının genistein uygulamasına bağlı olarak değişimi.	79
5.2: A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin <i>IGF-1R</i> mRNA ve protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.	81
5.3: H1299 hücrelerinin <i>IGF-1R</i> mRNA ve protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.	82
5.4: A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin p53 mRNA ve protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.	84
5.5: A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinde p-p53 protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.	85
5.6: H1299, A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinde <i>EGFR</i> mRNA seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.	86
5.7: H1299, A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinde <i>EGFR</i> protein seviyelerinin genistein uygulamana bağlı değişimi.	87
5.8: A549 ve H1299 hücrelerinde farklı <i>IGF-1R</i> promotör bölgeleri içeren plazmitlerin ifadenme seviyeleri.	88
5.9: A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde sıçan full-length (RF) <i>IGF-1R</i> promotörünün ifadenme seviyelerinin incelenmesi.	89
5.10: A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde insan full-length (HF) <i>IGF-1R</i> promotörünün ifadenme seviyelerinin incelenmesi.	90
5.11: A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde sıçan 5'flanking (5F) <i>IGF-1R</i> bölgesini içeren promotörün ifadenme seviyelerinin incelenmesi.	92
5.12: A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerin de sıçan 5'UTR (5UTR) <i>IGF-1R</i> bölgesini içeren promotörün ifadenme seviyelerinin incelenmesi.	93

1. GİRİŞ

Kanser anormal hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve yayılması şeklinde karakterize edilen ve ölüme neden olabilen bir grup hastalığın genel adıdır. Hastalığı tedavi etmek, hastanın yaşam süresini uzatmak veya hastanın yaşam kalitesini yükseltmek amacıyla; cerrahi yöntemler, radyasyon terapisi ve kemoterapi tedavileri uygulanmaktadır. Kemoterapi tedavi açısından en çok ümit veren yöntem olmasına rağmen, sonradan da gelişebilen ilaç direnci ve artan toksisite hastaların hayatta kalma oranlarının düşük olmasına neden olmaktadır [Gottesman *et al.*, 2002]. Kanser kaynaklı ölümlerin gerçekleşme zamanı; tümör hücrelerinin çoğalma, invazyon ve metastaz yeteneklerine bağlı olarak değişmektedir. Tümör gelişim sürecinde hücrelerin malignant transformasyonu birden fazla yolda yer alan genlerin ifadenmesindeki değişikliğe bağlı olarak gerçekleştiğinden, tedavi sürecinde kullanılan doğal ajanların çok sayıda hedefle etkileşime girebilme özellikleri önem kazanmaktadır.

Epidemiyolojik çalışmalar akciğer kanserinin öldürücülüğü en yüksek olan kanser türü olduğunu göstermektedir. Yüksek ölüm oranı büyük ölçüde hastalığın erken aşamalarında teşhisin güçlüğüne ve geç safhalarda ilerlemenin çok hızlı olmasına bağlıdır. Akciğer kanseri tanısı konulan çoğu vaka cerrahi müdahale için uygun değildir. Akciğer kanserinin görülme sıklığının ve hayatta kalma başarısının cinsiyete bağlı olarak yüksek farklılık göstermesi, hastalığın gelişiminde hormonal aktivitenin rol aldığını düşündürmektedir.

Akciğer kanseri gelişiminin temel sebebi olarak, reseptör tirozin kinaz (RTK) ve transformasyon büyüme faktörü- β reseptörü (TGFB β) sinyal yollarının düzensiz çalışması gösterilmektedir [Cooper *et al.*, 2013; Rosell *et al.*, 2013]. Akciğer kanserinin erken evrelerinde tip 1 insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGF-1R) yolağının aktivasyonu belirlenmiştir [Kim *et al.*, 2009]. IGF-1R yolağı; insülin reseptörü (IR), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), mezenşimal epitelyal geçiş faktörü (MET), fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) gibi reseptör tirozin kinazların yanı sıra, östrojen reseptörü (ER- α ve ER- β), androjen reseptörü (AR) ve progesteron

reseptörü (PR) gibi steroid hormon yollarıyla bağlantılıdır. *IGF-1R* ifadelenmesinin ortadan kaldırılması, malignant hücrelerin temel özelliklerinden olan transformasyon ve büyümenin engellenmesine neden olmaktadır. *IGF-1R* ve *IGF-2R* ifadelenmesinin sürekli veya normalin üstünde gerçekleşmesi yumurtalık, prostat, endometriyal, gastrik, mesane, sarkoma, kolorektal, glioblastoma, lösemi, myeloma ve meme kanserlerinde agresif fenotiple, tümör gelişimiyle ve özellikle EGFR hedefli terapilere karşı direnç oluşmasıyla ilişkilendirilmiştir [Hewish *et al.*, 2008].

Kanser araştırmalarında sıkça kullanılan genisteinin *in vitro* koşullarda çeşitli kanser hücre hatlarında büyümeyi inhibe ettiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Genistein bu inhibisyon etkisini kanser hücre bölünmesini, invazyonunu ve metastazını engelleme, çeşitli tirozin kinazları ve DNA topoizomeraz II enzimini inhibe etme, hücre döngüsünün durmasını ve apoptozu uyarma gibi farklı yolları düzenleyerek gerçekleştirmektedir [Li *et al.*, 2005; Shon *et al.*, 2006]. Genistein gibi besin yoluyla alınabilen izoflavonların akciğer kanseri de dahil olmak üzere çoğu kansere karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir [Nagata *et al.*, 2007; Gadgeel *et al.*, 2009; Li and Chen, 2011].

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

2012 yılında GLOBOCAN tarafından yayınlanan rapora göre dünya genelinde son beş yılda kanser tanısı konulmuş 32.6 milyon insan yaşamakta ve bu sayının 2025 yılında yaklaşık 40 milyona ulaşması beklenmektedir. 2012 yılında yeni konulan kanser tanılarının büyük çoğunluğunu akciğer kanseri (%13) oluşturmakta, onu meme (%11.9) ve kolorektal kanser (%9.1) izlemektedir. Ölüm oranlarına bakıldığı zaman yine ilk sırada akciğer kanseri (%19.4) bulunmaktadır. Her gün 3000'den fazla kişi akciğer kanserinden ölmekte, bu oran yaklaşık olarak dakikada iki ölüme denk gelmektedir. Karaciğer (%9.1) ve mide (%8.8) kanserleri ölüm oranları sırasında akciğer kanserinden hemen sonra gelmelerine rağmen akciğer kanseri ölüm oranlarının her ikisinin toplamından daha fazla olması bu alanda etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir.

Erkeklerde kanser kaynaklı ölümlerin %29'una akciğer kanseri neden olmakla birlikte, akciğer kanseri görülme sıklığı kadınlarda erkeklere oranla çok daha yüksektir. Kadınlarda akciğer kanseri görülme sıklığı 1950'lerden günümüze %600 artmıştır ve kanser kaynaklı ölümlerin %25'ine neden olmaktadır [Patel *et al.*, 2004]. SEER veritabanı kullanılarak yapılan analizlere göre 55-59 yaş arasında (menopoz sonrası) olan akciğer kanseri kadınlar, 40-49 yaş arasında (menopoz öncesi) olanlarla karşılaştırıldığında belirgin bir şekilde daha yüksek hayatta kalma oranlarına sahiptirler [Oton *et al.*, 2006]. Genel popülasyondan elde edilen verilerle karşılaştırıldığında antiöstrojen tedavisi gören meme kanseri hastalarında akciğer kanserinden ölüm oranları beş kat daha azdır. İleri seviye küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) erkek hastalarıyla yürütülen bir faz III çalışmasında serum örneklerindeki serbest estradiol miktarları ölçülmüştür. Düşük estradiol seviyesinin hayatta kalma oranını arttırdığı belirlenmiştir [Ross *et al.*, 2007]. Farklı NSCLC hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda östrojenin genel olarak hücre bölünmesini *in vivo* ve *in vitro* uyardığı, endojen gen ifadenme oranlarını arttırdığı, VEGF salınımını uyardığı ve MAPK aktivasyonunda artışa sebep olduğu gösterilmiştir

[Hershberger *et al.*,2005; Stabile *et al.*, 2005; Jarzynka *et al.*, 2006].

Tütün kullanımı akciğer kanserinin gelişiminde en yaygın görülen nedendir ve teşhislerin %80'ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Sigara kullananlar arasında akciğer kanseri riski sigara kullanmayanlara oranla 10 kat daha yüksektir. Pasif içicilerde de akciğer kanseri riskinin %20 arttığı belirlenmiştir. Transforme edilmiş akciğer epitel hücreleri tütün bileşenlerine maruz bırakıldığında p-IGF-1R/IR seviyeleri artmış ve hücreler IGF-1R hedefli moleküler tedavilere daha duyarlı hale gelmiştir [Chun *et al.*, 2003]. Tütün bileşenleri, özellikle de NNK (nicotine-derived nitrosamine ketone), Akt aktivasyonunu sağlayarak PTEN inaktivasyonuna ve p53 degradasyonuna neden olmaktadır. Bu yolla *IGF-II* ve *IGF-1R* ifadenmesini de düzenlemektedir [Ohlsson *et al.*, 1998].

Tütün kullanımı akciğer kanserinin en büyük nedenlerinden biri olarak bilinmesine rağmen dünya genelindeki akciğer kanseri vakalarında kadınların %53'ünü hiç sigara kullanmayanlar oluşturmaktadır [Subramanian and Gavindan, 2007]. Bu veriler tütün ürünleri tüketmek dışında bazı etiyolojik faktörlerin de akciğer kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde etkili olduğunu göstermektedir. Çeşitli çalışmalar akciğer kanserinin sigara içmeyen bireylerde görülme sıklığının kadınlarda erkeklere oranla daha fazla olduğunu göstermektedir [Wakalee *et al.*, 2007; Thun *et al.*, 2008].

İyonize radyasyona maruz kalmanın akciğer kanseri gelişim riskini arttırdığı bilinmektedir. Atom bombası saldırısı sonrası hayatta kalanlar ve radyoterapi gören insanlar incelendiğinde, akciğer kanseri gelişme oranlarının normal popülasyona göre yükseldiği görülmektedir.

Belirli endüstriyel alanlarda çalışan ve yüksek risk oluşturan karsinojenlere maruz kalan bireylerde de akciğer kanseri gelişim riski artmaktadır. En belirgin artış asbest ve yanma sonucu ortaya çıkan gazlara maruz kalındığında görülmektedir. Endüstriyel olarak gelişmiş şehirlerde akciğer kanseri gelişim oranları, kırsala göre, %5-10 arasında artış göstermektedir.

Kronik bronşit, pulmoner tüberküloz ve amfizem hastalarında da akciğer kanseri gelişim riskinin yüksek olduğu bilinmektedir.

2.2. Akciğer Kanseri Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri hastaları için 5 yıllık hayatta kalma oranı %89 seviyesindeyken, bu seviye akciğer kanseri hastalarında %15'e düşmektedir. Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %70'inde erken evrelerde belirgin semptomlar görülmediğinden teşhis ileri evrelerde gerçekleşmekte, bu durum tedavi başarısını ve hayatta kalma oranlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Tedavi seçenekleri; cerrahi (erken evre hastalar), radyoterapi ve kemoterapi olarak sıralanmaktadır. Akciğer kanseri tedavisinde göreceli olarak yeni bir yaklaşım da hedeflenmiş terapidir. Monoklonal antikolar, aşılar ve gen terapileri hedeflenmiş terapi yöntemlerindendir ve kansere özel süreçleri hedeflediklerinden klasik tedavilere göre daha etkili olabilmekte, sağlıklı hücrelere daha az toksik etki göstermektedirler.

Akciğer kanseri hastaları üzerinde yapılan bazı çalışmalarda cisplatin ve radyoterapinin beraber uygulanması geleneksel tedaviye göre daha etkili olmasına rağmen gözlemlenen ortalama hayatta kalma süresi 17 aydır [Parkin *et al.*, 2005]. Radyasyon tedavisinin başarısı tümörün bölgesel kontrolünün zor olması ve normal akciğer dokusunda radyoterapiye bağlı hasar gelişmesi sebebiyle azalmaktadır. Radyasyon verilen normal akciğer dokusunda oluşan hasara bağlı olarak gelişen inflamasyon yanıtı pnemöniye sebep olmaktadır. Bu durum akciğerlerde yara dokusunun oluşmasına ve fibroze yol açarak hastanın nefes almasını zorlaştırmakta ve yaşam kalitesini düşürmektedir [Kong *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2009;].

2320 NSCLC hastası kadının baz alındığı çalışmada akciğer kanseri gelişiminden önce veya sonra alımına bağlı olmaksızın antiöstrojen tedavisi gören kadınlarda ölüm oranlarının daha düşük olduğu belirlenmiştir [Lothar *et al.*, 2013]. Bu durum östrojen yolağının akciğer kanserinin hem gelişim hem de ileri evrelerinde görev aldığını gösterir. ER fonksiyonunu baskılayan ajanların (fulvestrant) veya E2 sentezini durduran kimyasalların (exemestane) kullanımı sonucu akciğer tümör büyümesinin durduğu gösterilmiştir [Pietras *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007]. Bu veriler aynı zamanda yüksek östrojen seviyelerine sahip NSCLC hastalarına uygulanan tedavi yöntemlerinin daha az etkili olmasına da açıklama getirmektedir.

Geleneksel tek yönlü kemoterapiler bir sinyal yolağında yer alan tek bir

spesifik geni hedef alacak şekilde geliştirildiğinden başarı oranları istenilen seviyelere ulaşamamaktadır [Li *et al.*, 2010]. Doğal ajanların kullanımı hem diğer kemoterapi yöntemlerine kıyasla minimal sitotoksositeye sahip olmaları, hem de çok sayıda sinyal yolağını etkileyebilme potansiyelleri sayesinde son zamanlarda ön planda tutulan bir tedavi yaklaşımıdır. Doğal ajanlar kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyonel olarak kullanıldığında ilaca bağlı toksisiteyi azaltarak ve/veya ilaç direncini düşürerek terapinin başarı oranlarını arttırmaktadır.

2.3. NSCLC ve SCLC

Akciğer kanseri vakalarının %85-90'ı NSCLC olarak sınıflandırılır ve küçük hücreli akciğer kanserinden (SCLC) klinik ve patolojik olarak oldukça farklıdır. SCLC genellikle tütün kullanımından kaynaklanan, erken evrelerde metastaz görülen ve çok agresif gelişim gösteren bir kanser türüdür. NSCLC, SCLC'ye oranla daha yavaş gelişim ve yayılma gösterir. Hücreler birbirlerinden histolojilerine göre veya salgıladıkları ligand türleri baz alınarak ayrılabilirler. Örneğin IGF-I peptidi sadece SCLC hücre hatlarında bulunurken, IGF-II hem SCLC hem de NSCLC hücre hatlarında görülebilmektedir [Reeve *et al.*, 1992; Quinn *et al.*, 1996].

NSCLC dünya genelinde kanser kaynaklı ölümlerin en yaygın nedenidir. NSCLC hastalarının tanı konulduktan sonra 5 yıllık sağ kalım oranları %8-14 arasında değişmekte, tümör bölgesinin cerrahi müdahaleyle tamamen alınmasıyla bu oran %40'a yükselmektedir [Greenlee *et al.*, 2000]. NSCLC vakalarının yaklaşık %75'i tanı konulduğunda ileri evre kanserdir [Hansen *et al.*, 2002] ve ileri seviye veya metastatik özellik gösteren hastaların ortalama yaşam süresi 6-8 aydır [Evans and Lynch, 2001]. NSCLC hücrelerin büyüklüğüne, şekline ve içeriğine bağlı olarak kendi içinde üçe ayrılır; adenokarsinoma (%50), squamous hücreli akciğer kanseri (%25-30), büyük hücreli akciğer kanseri (%10-15) [Vaporciyan *et al.*, 2000].

Günümüzde sigara kullanan bireylerin sayısında azalma olmasına rağmen NSCLC görülme sıklığı, özellikle de adenokarsinoma alt türü, hızlı bir şekilde artmaktadır [Patel *et al.*, 2004]. Adenokarsinoma kadınlarda görülen primer akciğer kanserlerinin %75'ini oluşturmaktadır ve erkeklere oranla daha erken yaşlarda

görülmektedir [Cerfolio *et al.*, 2006]. Aynı zamanda sigara kullanmayanlar ve gençler arasında en yaygın görülen NSCLC tipidir [Subramanian and Gavindan, 2007].

NSCLC hastalarıyla yapılan çalışmada cinsiyete bağlı olmaksızın, kanser dokularının %73'ünde östrojen seviyelerinin normal dokulara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir [Marquez-Garbon *et al.*, 2011]. NSCLC hücre sitoplazmalarında ER- α da bulunmaktadır, ancak bulunma miktarı %3 [Wu *et al.*, 2005]-%73 [Kawai *et al.*, 2005] arası değişen oranlarda olduğu için marker olarak değerlendirilmesi mümkün değildir. Akciğer kanseri gelişiminde ER- β dışında; EGFR/HER, IGF-1R, TGF- α ve TGF- β reseptörlerinin de rol aldığı bilinmektedir [Lynch *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007]. Bu reseptörler tarafından düzenlenen sinyal yolları mitogenezde, anjiyogenezde ve apoptoz inhibisyonunda görev alırlar.

NSCLC, SCLC ile karşılaştırıldığında genel olarak kemoterapiye duyarlı değildir [Pao and Chmielecki, 2010]. NSCLC vakalarının %40-80'inde *EGFR* aşırı ifadenmesi görülür ve bu durum hastalığın kötü seyri ve kemoterapiye dirençle bağlantılıdır [Jaramillo *et al.*, 2008]. *EGFR* mutasyonları; kadın, asya kökenli, adenokarsinoma sahip ve hiç sigara kullanmamış NSCLC hastalarında yaygın olarak görülmektedir [Nguyen *et al.*, 2009]. NSCLC hücre hatları incelendiğinde *EGFR* mutasyonu taşıyan hücrelerde p-IGF-1R/IR seviyelerinin belirgin bir şekilde düşük olduğu görülmüştür [Dong *et al.*, 2015]. Bu duruma tezat olarak sigara içme öyküsü olan, mutant *K-ras* içeren, yabanıl tip *EGFR* taşıyan ve artan p-IGF-1R/IR seviyeleri bulunan NSCLC hastaları *EGFR* tirozin kinaz inhibitörleri kullanılarak uygulanan kemoterapiye en fazla direnç gösteren grubu oluşturmaktadır.

Tablo 2.1: Akciğer kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları.

NSCLC Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	NSCLC Tedavisinde Kullanılan İlaç Kombinasyonları	SCLC Tedavisinde Kullanılan İlaçlar
Afatinib Dimaleate	Carboplatin-taxol	Doxorubicin Hydrochloride
Alectinib	Gemcitabine- cisplatin	Etoposide
Bevacizumab		Etoposide Phosphate
Carboplatin		Mechlorethamine-Hydrochloride
Ceritinib		Methotrexate
Crizotinib		Methotrexate LPF
Docetaxel		Topotecan Hydrochloride
Erlotinib Hydrochloride		
Methotrexate		
Gefitinib		
Gemcitabine Hydrochloride		
Mechlorethamine-Hydrochloride		
Necitumumab		
Nivolumab		
Osimertinib		
Paclitaxel		
Pembrolizumab		
Pemetrexed Disodium		
Ramucirumab		
Vinorelbine Tartrate		

2.4. İzoflavonlar

Yapılan araştırmalar kanserlerin %30-40'ının direkt olarak diyet alışkanlıklarına bağlı olarak geliştiğini ve uygun diyetlerin bu kanserlere karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir [Wiseman, 2008]. Günümüzde kullanılan anti-kanser ajanlarının birçoğu bitkiler (vincristine, vinblastine, etoposide, paclitaxel, camptothecin, topotecan, curcumin, resveratrol, genistein, irinotecan), deniz canlıları (cytarabine) ve mikroorganizmalar (dactinomycin, bleomycin, doxorubicin) gibi doğal ürünlerden geliştirilmiştir [Bhanot *et al.*, 2011].

İzoflavonlar östrojenik etki gösteren ve çoğunlukla antioksidan özelliğe sahip

olan polifenolik bileşiklerdir. İzoflavonların temel kimyasal yapısı; heterosiklik piran halkasına bağlı 2 benzen halkasından oluşan flavon çekirdeğinden meydana gelmektedir. Hidroksil gruplarının varlığı ve pozisyonunun (özellikle β halkasında yer alanların) antioksidan aktivitede önemli olduğu, en etkili aktivitenin de 4 veya 6 hidroksil grubu içeren kimyasallarda görüldüğü belirlenmiştir [Heim *et al.*, 2002]. Bu yan gruplar metillendiğinde polifenollerin aktivitesi azalmakta veya tamamen ortadan kalkmaktadır [Miller *et al.*, 1996; Pietta *et al.*, 2000; Rosenberg *et al.*, 2002]. İzoflavon yapısındaki -OH grubu sayısında artış ve yan gruplarda çift bağ bulunması sitotoksiteyi artırırken, polifenolün uzunluğuna bağlı görülen etki ve kullanılabilen maksimum doz miktarı hücre tipine bağlı olarak değişmektedir [Balabhadrapathruni *et al.*, 2000; Han., 2001;].

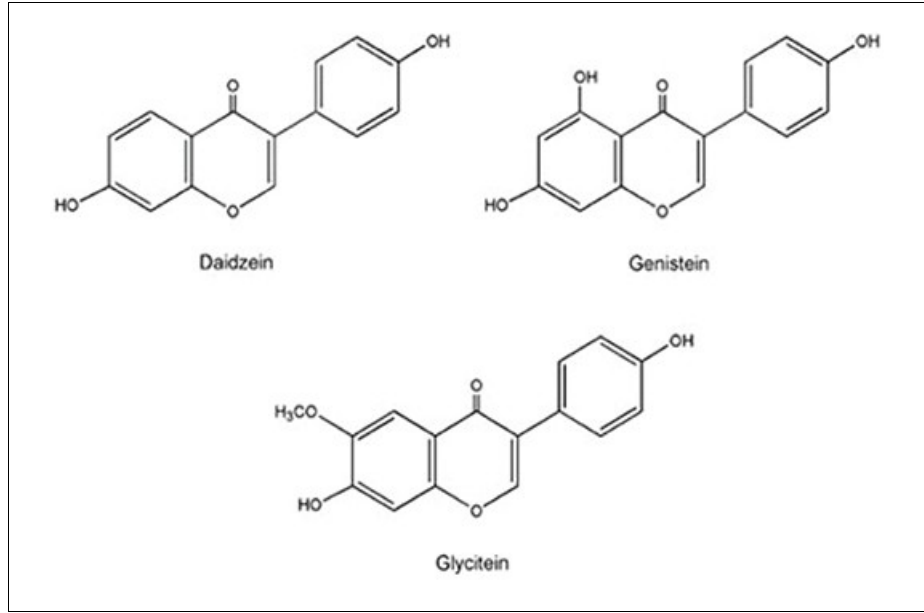
Fitoöstrojenler; soya fasulyesi, tofu, sebzeler, meyveler ve yapraklarda bulunan, yapısal olarak memeli östrojeni 17β -estradiol benzeyen, bu sayede de ER'ye bağlanabilen fenolik izoflavon bileşikleridir [Sirtori *et al.*, 2005; Mense *et al.*, 2008; Velentzis *et al.*, 2008]. Fitoöstrojenlerin; menopozal semptomları, koroner kalp hastalıkları riskini, osteoporoz gelişimini azalttığı, kan kolestrolü ve kan basıncının düşürülmesine yardımcı olduğu ve çeşitli kanserlere karşı koruyucu işleve sahip olduğu bilinmektedir. Fitoöstrojenlerin antikanser aktiviteleri; antioksidan aktivitesi, tirozin kinazların ve DNA topoizomeraaz enziminin inhibisyonu, anjiyogenezin, metastazın ve hücre invazyonunun inhibisyonu olarak sıralanabilir [Velentzis *et al.*, 2008]. Fitoöstrojenler proapoptotik proteinlerin (p-p53, p53 ve p21) seviyesini artırırken, bazı antiapoptotik proteinlerin (Bcl-xL ve siklin B1) seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır [Seo *et al.*, 2011].

Amerikan toplumuna oranla 20-50 kat daha fazla soya ürünü tüketen Asya toplumlarında meme ve prostat kanseri oranlarının düşük olması, soya fasulyesinin bu kanserlere karşı doğal koruyucu bir ajan olduğunu düşündürmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar soya fasulyesi kaynaklı fitoöstrojenlerin özellikle meme kanseri görülme sıklığını düşürdüğünü göstermiştir [Duffy *et al.*, 2007; Velentzis *et al.*, 2008;]. Soya izoflavonlarının lökemi, nöroblastoma, kas ve karaciğer tümör hücrelerinin büyüme oranlarını ve metastatik yeteneklerini APE1/Ref-1, NF- κ B ve HIF-1 α yollarıyla bağlantılı olarak azalttığı belirlenmiştir [Raffoul *et al.*, 2006; Singh-Gupta *et al.*, 2011; Hillman *et al.*, 2011].

NSCLC, böbrek ve prostat kanser hücre hatlarında hücre ölümüne yol açtığı ve kanser hücrelerini radyoterapiye duyarlı hale getirdiği gösterildiği için soya izoflavonlarıyla radyoterapinin beraber kullanılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. İzoflavonların radyoterapiyle beraber kullanımı, radyasyon tedavisiyle gerçekleşen hücre sağkalımından sorumlu sinyal yollarının aktivasyonunu engellemektedir. NSCLC hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada soya izoflavonlarının APE1/Ref-1'in DNA onarım aktivitesini inhibe ederek, radyoterapi sonucu hücre ölüm oranlarını arttırdığı gösterilmiştir [Singh-Gupta *et al.*, 2011]. Soya izoflavonları aynı zamanda antioksidant özellik göstererek normal akciğer dokusunu radyasyon kaynaklı toksisiteden korumaktadır. Prostat kanseri hastalarıyla yapılan çalışmada radyoterapiyle beraber soya özütü içeren ilaç alan hastalarda radyasyon toksisitesi düşmesi sonucunda hastaların üriner, gastrointestinal ve seksüel fonksiyonlarında düzelme gözlenmiştir [Ahmad *et al.*, 2010].

İzoflavonlar 8 saat gibi kısa bir yarılanma süresine sahiptir ve genelde 24 saat sonunda sistemden tamamen uzaklaştırılmış olurlar [Rowland *et al.*, 2003]. Soya içeriği yüksek diyet uygulayan insanlarda dolaşımda bulunan izoflavon konsantrasyonları 0.2 mM oranına yakın seyretmektedir [Adlercreutz *et al.*, 1993]. Yüksek dozda NovaSoy (300-600 mg) verilen prostat kanseri hastalarında dolaşımdaki genistein konsantrasyonunun 27 mM oranına kadar yükseldiği ve herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı belirlenmiştir [Miltyk *et al.*, 2003]. Yapılan farklı bir çalışmada genistein verilen sıçanlarda oral yollarla alımdan 5 dk sonra serumda genistein belirlenmiştir Sıçan metabolizması göz önüne alındığında 10 mg/kg'lık doz insanlarda 1 mg/kg'lık doza denk gelmektedir ve bu oran Asyalıların diyetle beraber aldıkları genistein miktarına yakındır [Zhou *et al.*, 2008].

Şekil 2.1'de gösterilen izoflavonlar genistein, daidzein ve glycitein soya içerisinde sırasıyla %50, %40 ve %10 oranlarında ve aglikon formunda bulunmaktadır.



Şekil 2.1: Soya izoflavonlarının (genistein, daidzein, glycitein) kimyasal yapısı.

2.4.1. Genistein

Genistein soya ürünlerinde yüksek oranlarda bulunan küçük ve biyolojik olarak aktif bir moleküldür. Genistein; hücre bölünmesi kontrolünde, apoptotik hücre ölümünde, hücre göçü, invazyonu, anjiyogenezi ve metastazında rol olan genlerin ifadenmesini düzenleyerek kanser hücrelerinin invazyonu, metastazı ve anjiyogenezinin inhibisyonunda rol alır [Li and Sarkar, 2002].

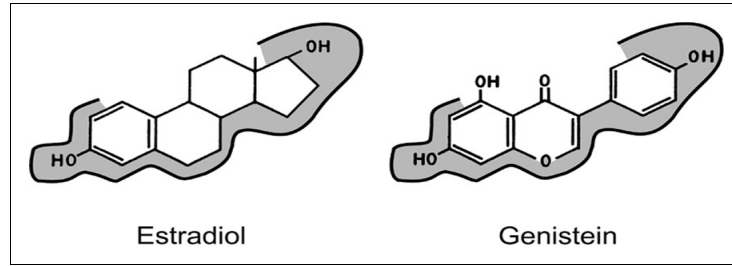
Hücrelerde östrojen cevabı nükleer steroid hormon reseptörü ailesinin üyeleri olan ER- α ve ER- β reseptörleri ile kontrol edilir. Bu reseptörler temel olarak diziye özgü, ligand bağımlı transkripsiyon faktörleri olarak görev alırlar. Östrojen bağlanması sonucu ER- α ve ER- β reseptörleri östrojen cevap elementleri (ERE) içeren hedef promotörlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır. Bu iki reseptör farklı genler tarafından kodlanmakta ve dokulara göre farklı dağılım göstermektedir. ER- α genellikle mesane, karaciğer, böbrek ve kalpte bulunurken, ER- β genellikle yumurtalık, prostat, akciğer ve merkezi sinir sisteminde bulunmaktadır [Matthews *et al.*, 2003]. ER- β ifadenmesi durdurulan dişi fare modellerinde 3 aylık dönem sonunda alveol sayısında azlık gibi akciğer yapısını etkileyen anomaliler gözlenmiştir [Patrone *et al.*, 2003]. 5 aylık dönem sonunda hem erkek hem de dişi

farelerde akciğer fonksiyonlarında belirgin azalma ortaya çıkmıştır [Morani *et al.*, 2006]. *ER-α* ifadenmesi engellendiğinde aynı etkilerin görülmemesi ve immünboyama yapıldığında akciğer hücrelerinde *ER-α* belirlenememesi, bu reseptörün akciğer gelişimi ve fonksiyonunda görev almadığını göstermektedir [Wu *et al.*, 2005; Schwantz *et al.*, 2005]. Akciğer kanserinde *ER-α* seviyeleri *ER-β* seviyelerine oranla oldukça düşüktür ve artış görülmesi genelde *EGFR* mutasyonlarının varlığına bağlıdır [Raso *et al.*, 2009; Mazieres *et al.*, 2013]. Belirgin *ER-α* ifadenmesi olan akciğer kanseri hastalarıyla yapılan iki farklı çalışmada, ifadenmenin hayatta kalma süresine ya da tümör gelişim hızına etkisi olmadığı belirlenmiştir [Skov *et al.*, 2007]. *ER-β*; NSCLC türlerinde hem kadın hem de erkek hastalarda baskın olarak bulunan *ER* tipidir [Kawai *et al.*, 2005; Raso *et al.*, 2009; Stabile *et al.*, 2011]. Akciğer kanseri hücre hattı A549 hücrelerinde *ER-β* varlığının hem çekirdek hem de sitoplazmada belirlenmesi, reseptörün genomik ve genomik olmayan sinyal yollarının düzenlenmesinde görev alabileceğini göstermektedir [Hershberger *et al.*, 2009].

Östrojen hormonu stoplazmik kinaz sinyal yollarını saniyeler içerisinde hızlıca aktive edebilir. Bu hızlı sinyal aktivasyonu genomik olmayan yolak olarak adlandırılır ve sitoplazma veya membranda yer alan östrojen reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Östrojen, *ER-α* aracılığıyla *IGF-1R* yolağıyla etkileşime geçerek onkonogenez potansiyelini ortaya çıkarmakta ve östrojen duyarlı meme kanseri ve prostat kanseri gelişiminde rol almaktadır [Boccardo *et al.*, 2006; Kanagaraj *et al.*, 2007]. Akciğer kanseri hücre ve dokularında da östrojen bağlanmasıyla gerçekleşen *ER-β* aktivasyonunun, *IGF-I* ve *IGF-1R* ifadenmesini arttırdığı belirlenmiştir [Tang *et al.*, 2012]. Fareler üzerinde yapılan deneylerde bu yolların beraber çalışarak akciğer kanseri gelişimine neden oldukları gösterilmiştir [Tang *et al.*, 2013].

Genisteinin kimyasal yapısı östrojeninkine büyük ölçüde benzemektedir (Şekil 2.2). Bu sayede *ER* ile etkileşime girerek östrojenlerin bağlanmasını engellemekte ve yüksek dozlarda kullanıldığında hormon bağımlı kanserlerin engellenmesinde potansiyel bir ajan olarak görülmektedir. Düşük dozlarda genistein varlığının östrojene benzer etki yaratarak *ER* aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Genistein estradiolün aksine spesifik olarak *ER-β*'ya bağlanmaktadır [Kuiper *et al.*, 1998]. Genisteinin *ER-β* reseptörüne bağlanma ilgisi *ER-α*'ya oranla 26 kat, *ER-β*

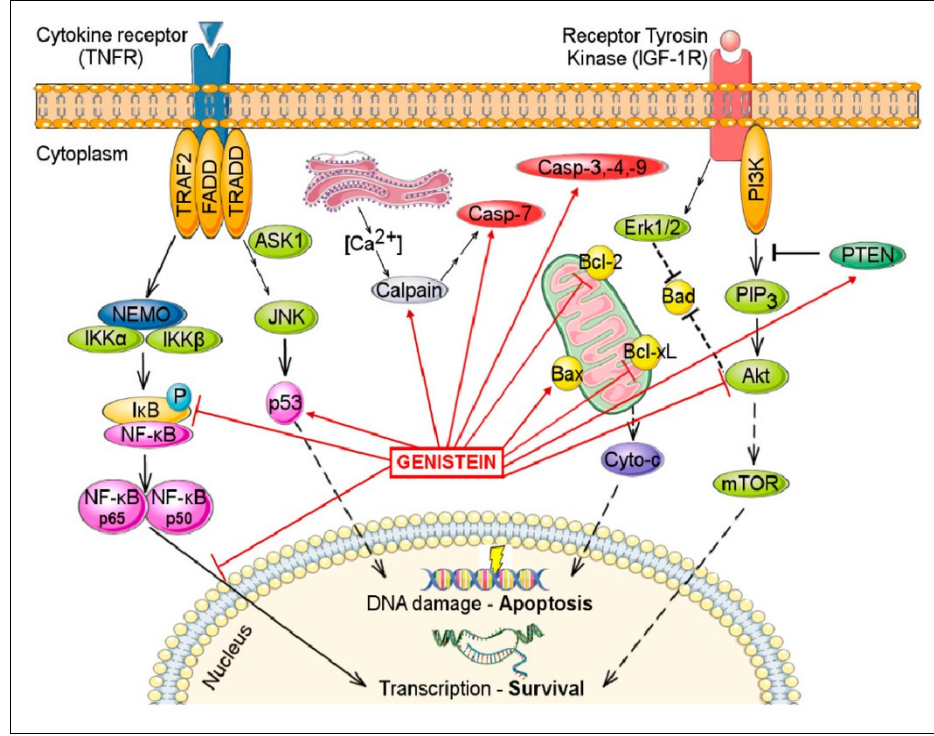
aktivasyonunu sağlama oranı ER- α 'ya göre 7 kat daha fazladır [Escande *et al.*, 2006]. Genistein ER bağlantılı etkilerinin dışında tirozin kinaz inhibitörü olarak da etki göstermektedir. 0.01 μ M gibi düşük dozlarda uygulandığında hormonal etki gösterirken, tirozin kinaz inhibisyon etkisi genellikle 30 μ M ve üstündeki dozlarda görülmektedir [Van den Belt *et al.*, 2004]. Bu özelliğiyle bağlantılı olarak genisteinin metaztaz ve tümör büyümesi üzerinde düşük dozlarda uyarıcı, yüksek dozlarda baskılayıcı etki göstermesi bifazik etki olarak tanımlanmaktadır [El Toury and Banerjee, 2008].



Şekil 2.2: Genistein ve estradiol kimyasal yapılarının karşılaştırılması.

Genisteinin ER yolağı dışında, büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından uyarılan tümör büyümesini de baskıladığı bilinmektedir. Genistein; androjenlerin östrojene dönüşümünü sağlayan enzimlerin, tirozin protein kinazların, sitokrom p450 enzimlerinin ve COX-2'nin inhibisyonuna neden olarak hücre fonksiyonlarına etki etmektedir [Rice and Whitehead, 2006; Shan *et al.*, 2006; Kousidou *et al.*, 2006]. Bunun yanında Sp1 ifadenmesini azaltırken, Sp3 ifadenmesinde artışa sebep olduğu bilinmektedir [Zhou *et al.*, 2009]. Genistein; östrojen ve androjen bağlantılı yolların da düzenlenmesini sağlamakta, serbest radikallerin temizlenmesinde görev almakta ve Akt, NF- κ B, Wnt gibi sinyal yollarını düzenleyerek apoptoza neden olmaktadır [Li *et al.*, 2011; Mahmoud *et al.*, 2014]. Genistein ve diğer soya izoflavonlarının APE1/Ref-1 fonksiyonunu engellediği bilinmektedir [Raffoul *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014]. Genistein aynı zamanda topoizomerez II, TGF- β sinyal yolağının üyeleri, büyüme faktörleri ve onların reseptör seviyeleri, MAPK ve p38 aktivitesi, uPA ve MMP salınımı, fokal adezyon kinaz ifadenmesi gibi çok sayıda sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. *RHOA*, *RAC1*, *CDC42* ve *PAK1* gibi

hücre invazyonu ve metastazıyla bağlantılı genlerin de ifadenlenme oranlarını azalttığı bilinmektedir [Martinez-Montemayor *et al.*, 2010]. Genistein bağlantılı yollar Şekil 2.3'te gösterilmektedir.



Şekil 2.3: Genistein bağlantılı yolların şematik gösterimi.

2.4.2. Genisteinin Kanser Hücrelerine Etkisi

Çok sayıda çalışma genisteinin de içinde bulunduğu diyetle alınan izoflavonların akciğer kanseri de dahil olmak üzere çoğu kanser türüne karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır [Nagata *et al.*, 2007; Gadgeel *et al.*, 2009; Li and Chen, 2011]. Genistein içeren soya ürünlerinin kullanımı, estradiol kullanımına oranla daha az yan etkiye neden olmakta [Wolters *et al.*, 2004] ve kanser hücrelerinin büyümesini *in vivo* ve *in vitro* koşullarda durdururken normal hücrelerde herhangi bir toksisiteye yol açmamaktadır [Sarkar *et al.*, 2006].

Yapılan faz II çalışmalarında genisteinin; akciğer, meme, mesane ve prostat kanser hücrelerinin apoptozunu uyardığı belirlenmiştir [Pendleton *et al.*, 2008]. Genistein sırasıyla 50 µM, 100 µM, 50 µM dozlarında uygulandığında meme (MCF-

7), yumurtalık (HeLa) ve prostat (PC3) kanser hücrelerinin bölünme oranlarını %50 oranında azaltmaktadır [Onozawa *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999]. Hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda genistein uygulamasının meme [Barnes, 1997], prostat [Onozawa *et al.*, 1998] ve mesane [Zhou *et al.*, 1998] tümör gelişimini engellediği gösterilmiştir.

Prostat, meme, akciğer ve pankreatik kanser hücreleriyle yapılan *in vitro* deneylerde genistein, NF- κ B'nin DNA bağlanma aktivitesini belirgin bir şekilde baskılamıştır [Gong *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005]. Pankreas kanser hücreleriyle yapılan çalışmalarda genisteinin Notch sinyal yolağını inhibe ederek NF- κ B aktivasyonunda azalmaya yol açtığı ve hücre bölünmesini baskıladığı belirlenmiştir [Wang *et al.*, 2006]. Genisteinin kanser hücrelerini G1 veya G2/M kontrol noktalarında durdurduğu bilinmektedir [Salti *et al.*, 2000; Cappelletti *et al.*, 2000]. Yapılan *in vitro* deneylerde genisteinin tübilin polimerizasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir [Mukherjee *et al.*, 2010].

Epidemiyolojik çalışmalar dışardan takviyeyle alınan ya da beslenme yoluyla plazmada yer alan genisteinin akciğer kanseri riskini azalttığını göstermektedir [Schabath *et al.*, 2005; Shimazu *et al.*, 2011]. Genisteinin insan akciğer adenokarsinom hücrelerini G2 fazında durdurduğu bilinmektedir [Zou *et al.*, 2008]. Akciğer kanseri taşıyan nude farelere genistein uygulanması kanser dokusuna kan akışını %35 oranında azaltmış, tümör ağırlığında %36 oranında düşüşe neden olmuştur [Wietrzyk *et al.*, 2001].

Prostat kanseri hücre hattı LNCaP hücreleriyle yapılan deneylerde genistein uygulamasıyla Akt fosforilasyonunun ve Akt aktivitesinin belirgin şekilde baskılanmasının, NF- κ B inhibisyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir [Li and Sarkar, 2002]. LNCaP hücrelerinde genistein uygulamasının *GSK-3 β* ifadenmesini arttırması, β -katenine bağlanan *GSK-3 β* miktarında ve β -katenin fosforilasyonunda artışa sebep olmakta, bu durum da Wnt inhibisyonuyla hücre bölünmesinin durdurulmasını sağlamaktadır [Li *et al.*, 2008]. LNCaP hücreleriyle yapılan çalışmalarda genistein uygulamasının *AR* ifadenmesini transkripsiyonel seviyede baskıladığı, çekirdekte bulunan AR'nin ARE'ye bağlanma miktarını azalttığı, PSA üretimini transkripsiyonel ve translasyonel seviyede baskıladığı belirlenmiştir [Davis *et al.*, 2002]. Hayvan deneylerinde de diyetle alınan genisteinin *AR* ifadenmesini

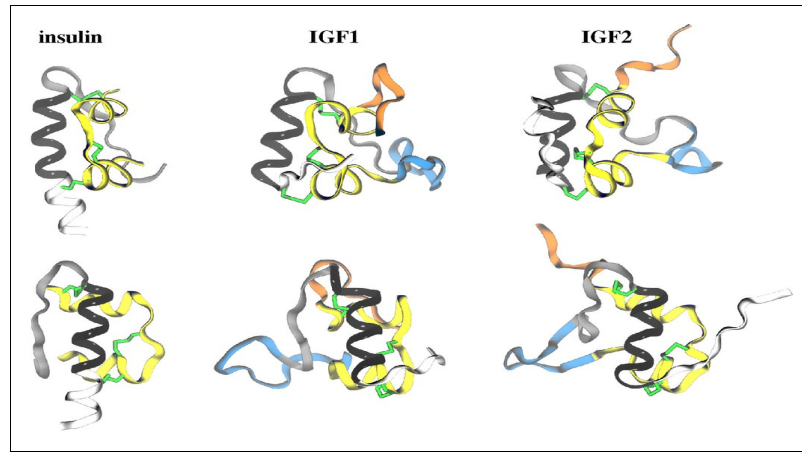
azalttığı gösterilmiştir [Fritz *et al.*, 2002]. İnsan prostat kanser hücrelerinde genistein uygulamasının G1/S geçişini engellediği belirtilmiştir [Shen *et al.*, 2000].

Genisteinin düşük dozlarda (0.01 - 10 μ M) ER- α pozitif meme kanseri hücrelerinde bölünmeyi uyardığı, yüksek dozlarda ise (100 μ M) hücre bölünmesini inhibe ettiği bilinmektedir. ER- α negatif meme hücrelerinde ise yüksek dozların hücre bölünmesi üzerindeki inhibisyonu devam ederken, düşük dozlarda hücre bölünmesi uyarılmamaktadır [Seo *et al.*, 2006]. Büyüme inhibisyonu apoptoza ve G2/M fazındaki hücre sayısındaki artışa bağlı olarak gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmada meme tümör büyümesi genistein kullanımıyla %33 oranında azalmıştır. Meme ve prostat kanserlerinde genistein uygulamasının, proapoptotik faktörler olan Bax ve p21'in üretimini uyardığı belirlenmiştir [Shao *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 1998]. Genisteinin meme kanser hücrelerinde anti-apoptotik faktör olan Bcl-2'nin inhibisyonunu sağladığı da bilinmektedir [Constantinou *et al.*, 1998]. Bunun yanında soya izoflavonlarının özellikle genisteinin MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyüme oranlarını arttırdığını ve prostat kanserinde metastaz oranlarını yükselttiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [Allred *et al.*, 2001; El Touny and Banerjee, 2009]. Bu durum izoflavonların *in vivo* etkisinin belirlenmesinde alınan dozun ve hormonal etkileşimlerin önemini göstermektedir.

Genisteinin diğer anti-kanser ilaçlarının etkisini sinerjetik olarak arttırdığı ve bu yolla kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [Ali *et al.*, 2009; Gadgil *et al.*, 2009; Lattrich *et al.*, 2011]. Genistein kullanımı NF- κ B ve Akt yollarının inhibisyonunu sağlayarak, farklı kanser türlerinde kemoterapi amaçlı kullanılan nükleosit analogu gemcitabinin etkisinin artmasını sağlamaktadır [Banerjee *et al.*, 2005]. Pankreatik karsinom hücreleriyle *in vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda genistein uygulamasının, cisplatin tedavisiyle sağlanan büyümedeki baskılanma ve apoptotik etkileri arttırdığı belirlenmiştir [Mohammad *et al.*, 2006]. Meme kanseri taşıyan farelerde yapılan deneylerde genisteinin östrojen seviyelerini ve aktivitesini düşürerek tamoxifenin etkisini arttırdığı görülmüştür [Mai *et al.*, 2007]. Bu veriler sonucunda genistein uygulamasının tedaviye dirençli diğer kanser türlerinde de kemoterapi ilaçlarına karşı duyarlılığı sağlayabileceği ve daha düşük dozlarda kemoterapi ilaçlarının kullanımını sağlayarak toksisitenin azaltılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

2.5. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) normal büyüme ve gelişmede önemli rol oynayan bir büyüme hormonudur. IGF ailesi insülin benzeri iki liganddan (IGF-I ve IGF-II), reseptör tirozin kinazlardan (IGF-1R ve IGF-2R) ve IGF bağlanma proteinlerinden (IGFBP1-6) oluşur. İnsülin benzeri tanımlaması her iki ligandın da insülin gibi yağ ve kas hücrelerine glukoz alımını uyarmasına ve yapılarının insülinle %50 oranında benzerlik göstermesine dayanmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: IGF-I, IGF-II ve insülin protein yapıları.

2.5.1. IGF-I

IGF-I otokrin, parakrin ve endokrin büyüme faktörü olarak işlev görmektedir. IGF-I hormonal cevabın akut metabolik etkilerini düzenlemekte [Zapf *et al.*, 1999], hücre çoğalma ve farklılaşmasını arttırmakta ve hücreleri apoptozdan korumaktadır [Stewart and Rotwein, 1996; Werner and LeRoith, 1997]. IGF-I salınımı, büyüme hormonlarının etkisiyle karaciğer ve periferel dokulardan; EGF, FGF ve PDGF gibi faktörlerin etkisiyle de hasar görmüş dokulardan gerçekleşmektedir [Clemmons, 2007]. IGF-I; büyüme hormonunun efektör molekülüdür ve normalde negatif feedback sağlayarak büyüme hormonu salgılanmasını baskılar. VEGF ifadenmesi ve salınımı doğrudan IGF-I tarafından yönetilmekte, dolaylı olarak da PI3K/Akt ve Erk/MAPK yollarının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu yollar aynı

zamanda VEGF üretiminin artmasında etkili olan HIF-1 α aktivasyonunu da sağlamaktadır [Slomiony *et al.*, 2006].

İnsülin, hedef reseptörlerine direkt bağlanırken, IGF-I'in bağlanabilirliği IGFBPleri tarafından düzenlenmektedir. IGF-I plazmada çok yüksek konsantrasyonlarda (150-400 ng/ml) bulunmasına rağmen çoğunluğu protein bağlı formda yer almaktadır. Plazmadaki serbest ligand konsantrasyonu %1'den daha düşüktür [Clemmons, 2007]. Dolaşımda yer alan IGF-I yıkımdan kendisine yüksek afiniteyle bağlanan IGFBPlerle kompleks oluşturarak kurtulur.

Bir hücre somatik mutasyonların birikimi sonucu DNA hasarına uğradığında, hücre mikroçevresindeki IGF biyoaktivitesinin yoğunluğu hücrenin malignant hücre hattına evrilmesine veya erken karsinogenezde apoptoza uğramasına neden olur [Brahmkhatri *et al.*, 2014]. Hücrelerin IGF yanıtı büyük ölçüde IGF-1R tarafından yönetilir. Yüksek IGF-I seviyelerinin düşük IGF-1R seviyelerini beraberinde getirmesi, IGF ligandının *IGF-1R* ifadelenmesini baskılayarak yolağın negatif düzenlenmesinden sorumlu olduğunu düşündürmektedir [Yang *et al.*, 1996; Werner *et al.*, 1997]. IGF-I ve IGF-II ligandlarının IGF-1R proteinlerinin degradasyonunu sağlamanın yanı sıra *IGF-1R* mRNA seviyelerini de düşürdüğü belirlenmiştir [Rosenthal and Brown, 1996].

Meme ve prostat kanseri vakalarında IGF-I'in yüksek seviyede ifadelendiği görülmektedir [Renehan *et al.*, 2004]. Akciğer kanserinde plazmada yüksek sevide IGF-I bulunmasının hastalık riskiyle bağlantılı olduğu ve bu bağlantının erken karsinogeneze dayandığı bilinmektedir [Yu *et al.*, 1999]. Akciğer dokusunda özel olarak *IGF-I* ifadelenmesinin arttırılmasının tümör gelişimine yol açtığı gösterilmiştir [Kim *et al.*, 2009]. IGF-I integrinlerle etkileşime girerek tümör hücre göçünü arttırmakta, E-kaderin gibi adezyon molekülleriyle etkileşime girerek hücre-hücre bağlantılarının kurulmasını sağlamakta [Playford *et al.*, 2000; Maile *et al.*, 2002] ve IGF-1R'nin sürekli aktivasyonuna yol açarak metastatik potansiyelin artmasına neden olmaktadır [Sachdev ., 2004]. Epidemiyolojik çalışmalar IGF-I'in artan serum konsantrasyonlarının meme [Hankinson *et al.*, 1998], akciğer [Yu *et al.*, 1999], baş ve boyun [Wu *et al.*, 2004], kolorektal [Ma *et al.*, 1999], pankreas [Bergmann *et al.*, 1995], sarkoma [Xie *et al.*, 1999] ve prostat kanserlerinin [Chan *et al.*, 1998] gelişme riskini arttırdığını göstermiştir.

2.5.2. IGF-II

İnsülin-benzeri büyüme faktörü II (IGF-II) memelilerde organizmanın büyümesinde, fetal hücre bölünmesinde, farklılaşmasında ve metabolik regülasyonda rol oynamaktadır.

IGF-II'nin IGF-1R'ye bağlanma oranları oldukça düşüktür. IGF-1R'nin IGF-I'e olan afinitesi IGF-II'ye oranla 15-20 kat daha fazladır. Ancak IGF-II'nin çok sayıda farklı reseptöre bağlanabilme kapasitesi IGF-I'den daha geniş biyolojik fonksiyona sahip olmasına yol açar. IGF-I ve insülin, IGF-1R ve IR'ye yüksek afiniteyle bağlanırken; IGF-II, IGF-1R'ye ve IR'nin alternatif kesimle oluşan varyantı olan IR-A4'e bağlanmaktadır. IGF-II'nin bağlandığı bir diğer reseptör insülin-benzeri büyüme faktörü reseptörü 2 (IGF-2R)'dir. IGF-II, IGF-2R'ye yüksek afiniteyle bağlanır ve IGF-2R'nin ana ligandıdır. IGF-II, IGF-2R'ye bağlandığında çok net bir sinyal oluşturmaz. Bağlanma sonucunda genellikle kltrin-kaplı veziküller oluşur ve IGF-II hücre içerisine alınarak yıkımı sağlanır. Böylece, IGF-II molekülünün hücre yüzeyindeki miktarını azaltma yoluyla biyoetkinliği sınırlanmış olur.

IGF-II normal koşullarda maternal olarak baskılandığından [Cui *et al.*, 2003], bu durumun ortadan kalkması artan *IGF-II* ifadenmesine ve buna bağlı olarak kanser gelişimine neden olabilmektedir [Ogawa *et al.*, 1993; Vorwerk *et al.*, 2003; Brentoni *et al.*, 2003]. NSCLC hücre hatlarında IGF-II miktarının artması maternal baskılanmanın ortadan kalkmasıyla meydana gelmektedir ve bu durum NSCLC hastalarının yaklaşık %50'sinde görülmektedir [Kohda *et al.*, 2001]. *IGF-II* ifadenmesindeki artışa tümör-stromal hücreler arasındaki bağlantı da neden olabilmektedir. Örneğin; integrin $\alpha 11$ primer NSCLC'de aşırı ifadenmektedir [Wang *et al.*, 2002] ve $\alpha 11$ ifadeleyen fibroblast hücrelerinin; yakınlarında bulunan A549 hücrelerinin tümör geliştirme oranlarını arttırdığı ve *IGF-II* ifadenmesinde 250 kat artışa neden olduğu belirlenmiştir [Zhu *et al.*, 2007]. Bu sonuçlar IGF-II'nin NSCLC gelişiminde IGF-1R ile etkileşime geçen dominant ligand olduğunu düşündürmektedir [Reeve *et al.*, 1992; Pavelic *et al.*, 2005].

2.6. İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlanma Proteinleri

IGFBP'lerin her biri farklı genlerin ürünleri olmalarına ve farklı fonksiyonel özelliklere sahip olmalarına rağmen yapısal olarak birbirlerine çok benzemektedir. IGFBP'lerin yapısına bakıldığında hem N terminal hem de C terminal domainlerinde IGF bağlanma bölgeleri olduğu, merkez domainin ise proteoliz ve post-translasyonel modifikasyon bölgeleri içerdiği görülmektedir [Rosenzweig, 2004]. Dolaşımda bulunan IGF-I ve IGF-II'nin çoğunluğu IGFBP3 ve fonksiyonu olmayan ALS (acid labile subunit) ile yaklaşık 150 kDa ağırlığında bir kompleks oluşturmuş durumdadır [Firth and Baxter, 2002]. Kompleksten ALS'nin ayrılmasıyla IGFBP/IGF ikilisi dolaşımdan ayrılarak hedef dokuya yönelir ve hücre yüzeyindeki reseptörlerle etkileşime girer. IGF moleküllerinin yarı ömürleri serbest haldeyken yaklaşık 10 dakika iken IGFBP'ler ile kompleks oluşturdıklarında 30-90 dakikaya, eğer bu ikili komplekse ALS eklenirse yaklaşık 12 saate kadar yükselmektedir [Zapf *et al.*, 1995]. Ligand-IGFBP bağlantısının kopması proteolitik kesimle gerçekleşir. IGF'lerin IGFBP'ler tarafından bağlanması ve inaktif halde tutulması IGF ligandlarının proliferatif ve anti-apoptotik etkilerini baskılamaktadır. IGFBP'lerin IGF'ye olan afinitesi çok yüksek olduğundan doku içerisinde de reseptör-IGF etkileşimini engelleyebilirler. IGFBP'ler normal koşullarda IGF-1R sinyal yolağını baskılamalarına rağmen, IGFBP proteazlarının fazla üretimi veya IGFBP'lerin ECM'ye bağlanma oranlarının artması gibi sebeplerle tümör gelişimini uyarıcı etkiler de gösterebilirler [Brahmkhatri *et al.*, 2014].

IGFBP3 kan dolaşımında en fazla bulunan IGF bağlanma proteindir. IGFBP3'ün regülasyonu pek çok apoptotik ve anti-apoptotik sinyalin kontrolü altında gerçekleşir. p53, vitamin D ve analogları, hipoksi gibi anti-apoptotik sinyaller *IGFBP3* ifadelemesini uyarırken, AR, insülin ve steroid reseptör koaktivatörleri *IGFBP3* mRNA seviyesini düşürmektedir [Krishnan *et al.*, 2003; Liao *et al.*, 2008].

IGFBP3, IGF varlığından bağımsız olarak da bölünmeyi engelleyici ve proapoptotik etki göstermektedir. Bu duruma *IGF-1R* delesyonlu fibroblast hücrelerinde *IGFBP3* aşırı ifadelenmesinin hücre ölümüne sebep olması örnek gösterilebilir [Yu *et al.*, 1999]. IGFBP3 seviyelerindeki yükselişin kolorektal [Ma *et*

al., 1999], baş ve boyun [Brown *et al.*, 2006] kanserlerinin gelişme riskini azalttığı belirlenmiştir. *IGFBP3* promotörünün metilasyonu ile ifadenin engellenmesine yol açan epigenetik değişimlerin akciğer kanseri vakalarında kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir [Chang *et al.*, 2004]. *IGFBP3*'ün artan plazma seviyeleri de akciğer kanseri gelişme riskini düşürmektedir [London *et al.*, 2002]. *IGFBP3* akciğer kanseri hücrelerinde IGF kaynaklı büyümenin doğal inhibitörü olarak görev yapmaktadır [Lee *et al.*, 2009]. NSCLC hastalarının serum *IGFBP* seviyeleri EGFR tirozin kinaz inhibitörleriyle ya da sistemik kemoterapiyle tedavi konusunda belirleyici olmaktadır [Fidler *et al.*, 2009; Karmali *et al.*, 2010].

Prostat kanseri hücrelerinde *IGFBP2* ve *IGFBP5* ifadenin artmasına rağmen, IGF ligandına bağlanma mekanizmaları bozulduğundan, IGF/IGF-1R bağlantısına neden olmakta ve ilaç direncine yol açmaktadır [Nickerson and Pollak, 1999]. Bu yüzden *IGFBP* hedefli tedavi yaklaşımları hedef dokuya ve hastalık seviyesine bağlı olarak değişkenlik göstermelidir. *IGFBP1*; IGF-I'in insülin düzeyi değişikliklerine cevabını primer olarak düzenlemektedir [Janssen ve ark., 1997]. Hepatik *IGFBP1* üretimi insülin tarafından negatif düzenlenmekte ve *IGFBP1*'in hücrelerde aşırı ekspresyonu glikoz intoleransı veya insülin direnciyle sonuçlanmaktadır [Dunger ve ark., 2003]. *IGFBP1* aynı zamanda kan şekerinin düzenlenmesi, adiposit farklılaşması, obezite, damar sistemi hücreleri, sinir hücreleri metabolizması gibi pek çok olayda fonksiyoneldir [Legrand ve ark., 2012].

2.7. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörleri

2.7.1. IGF-1R

IGF-1R ve IGF-2R aralarında hem yapısal hem de fonksiyonel farklılıklar bulunan transmembran glikoproteinlerdir. *IGF-1R*, 15. kromozomda yer alır, 1367 aminoasitlik tek bir polipeptit kodlar ve çoğu hücrede sürekli ifadenmektedir [Abbott *et al.*, 1992]. DNA'da yaklaşık 100 kb'lık yer kaplayan *IGF-1R* 21 ekzon içerir. *IGF-1R*'nin ekzon/intron organizasyonu büyük ölçüde IR'ninkine benzer, aralarındaki temel fark *IR*'de yer alan ekzon 11'in *IGF-1R*'de bir karşılığının

bulunmamasıdır [Pedrini *et al.*, 1994].

IGF-1R'nin bilinen 1964 varyantı olmasına rağmen çoğunluğu popülasyonda belirlenemeyecek kadar düşük frekansa sahiptir ve dbSNP veri bankasına göre amino asit dizilimini değiştiren herhangi bir varyantı bulunmamaktadır. *IGF-1R* reseptörünün CAG- ve CAG+ olarak isimlendirilen bilinen iki izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar birbirlerinden alternatif mRNA kesimi sonucu CAG nükleotitlerinin silinmesiyle ayrılırlar. CAG- β domaininin ekstrasellüler kısmında Thr-Gly yerine Arg aminoasiti yer alır [Abbott *et al.*, 1992]. İki izoform da *IGF-1*'e eşit affiniteyle bağlanmasına rağmen CAG- izoformuyla sinyal yolağının düzenlenmesi daha yaygındır. Yapılan çalışmalarda iki izoformun normal hücrelerde ve kanser hücrelerindeki dağılımı açısından bir farklılık gözlenmemiştir [Condorelli *et al.*, 1994].

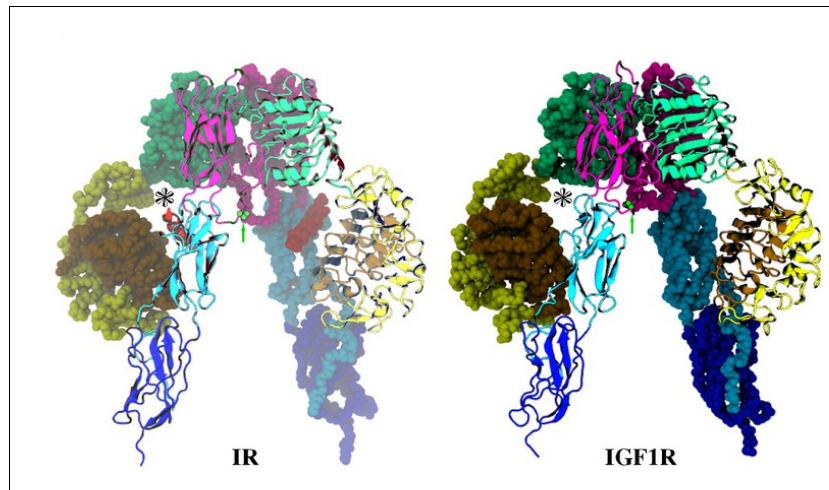
IGF-1R promotör bölgesi TATA veya CAAT motifleri içermez. TATA kutusu yer almadığından, transkripsiyon tek bir başlangıç bölgesinden gerçekleşmektedir. *IGF-1R* promotörünün 5'flanking bölgesi GC açısından zengindir ve promotörün hem 5'flanking hem de 5'UTR bölgesi çok sayıda Sp1 ve erken büyüme cevabına neden olabilecek bağlanma bölgeleri içermektedir. Sp1'in *IGF-1R* promotör aktivitesini 5'flanking bölgedeki GC dizilerine ve 5'UTR bölgesindeki homopürin/homopüridin motiflere (CT elementleri) bağlanarak arttırdığı bilinmektedir [Werner *et al.*, 1995]. Hücre döngüsü ve tümör baskılayıcı proteinlerin regülasyonunda kritik role sahip bir diğer transkripsiyon faktörü olan E2F1 de *IGF-1R*'nin pozitif regülatörlerindendir. *IGF-1R* promotörü üç farklı E2F1 bağlanma bölgesi içermektedir. Bu bağlanma bölgelerinin sayısı azaltıldığında ya da yapıları bozulduğunda *IGF-1R* promotör aktivasyonu da azalmaktadır [Schayek *et al.*, 2009].

IGF-1R'nin bazal seviyede ifadenmesini kontrol eden ana transkripsiyon faktörü Sp1'dir ve Sp1'in diğer regülatör faktörlerle olan ilişkisi kullanılarak *IGF-1R* ifadenmesi kontrol edilebilir [Beitner-Johnson *et al.*, 1995]. Tümör baskılayıcı proteinler (p53, p63, p73, WT1 ve BRCA1) Sp1'in promotör bölgesine bağlanmasını engelleyerek, *IGF-1R* ifadenmesinin azalmasını sağlamaktadır [Ohlsson *et al.*, 1998; Idelman *et al.*, 2003; Nahor *et al.*, 2005; Sarfstein *et al.*, 2006]. Bu proteinleri kodlayan genlerin karsinogenez sırasında mutasyona uğraması, baskılama etkisinin ortadan kalkmasına ve *IGF-1R* aşırı ifadenmesine neden olmaktadır. FGF, PDGF

ve EGF ligandlarının da *IGF-1R* ifadenmesini uyardığı bilinmektedir [Rosenthal *et al.*, 1991; Rubini *et al.*, 1994 ; Sepp-Lorenzino, 1998]. *IGF-1R* ifadenmesi aynı zamanda östrojenler, glukokortikoidler, GH, FSH, LH ve tiroid hormonları tarafından da uyarılmaktadır [LeRoith *et al.*, 1995].

IGF-1R mRNA'sının translasyonu sonrasında polipeptit Arg-Lys-Arg-Arg proteolitik kesim bölgesinden kesilerek α ve β domainlerine ayrılır. Bu domainler daha sonra iki ekstrasellüler ligand bağlanan α domaini (125 kDa) ve iki katalitik transmembran β domaini (95 kDa) içeren heterotetramerik glikoproteinleri oluşturur. β alt ünitelerinin sitoplazmada yer alan bölümleri bir juxtamembran bölgesi, bir tirozin kinaz domaini ve bir C-terminal bölgesi içermektedir.

IGF-1R yapısal olarak insülin reseptörüyle (IR) büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (%84 tirozin kinaz domaini, %61 juxtamembran domaini ve %44 C-terminal domaini dizi benzerliği) [Blakesley *et al.*, 1996] (Şekil 1.5). Yapısal benzerlik oranının bu kadar yüksek olması bu iki reseptörün hibrit reseptörler oluşturmalarına ve aynı ligandlara bağlanmasına olanak tanımaktadır [Frattali and Pessin, 1993]. IGF-1R/IR hibrit reseptörlerinde her bir reseptörden bir α domaini ve bir β domaini yer almaktadır ve hibrit reseptörlerin miktarları farklı dokularda belirgin bir şekilde değişmektedir [LeRoith *et al.*, 1995; Jones and Clemmons 1995]. Hibrit reseptörlerin IGF ligandına bağlanma isteği insülininden daha yüksek olduğundan pratikte IGF-1R gibi davrandıkları söylenilebilir.



Şekil 2.5: IGF-1R ve IR protein yapılarının gösterimi.

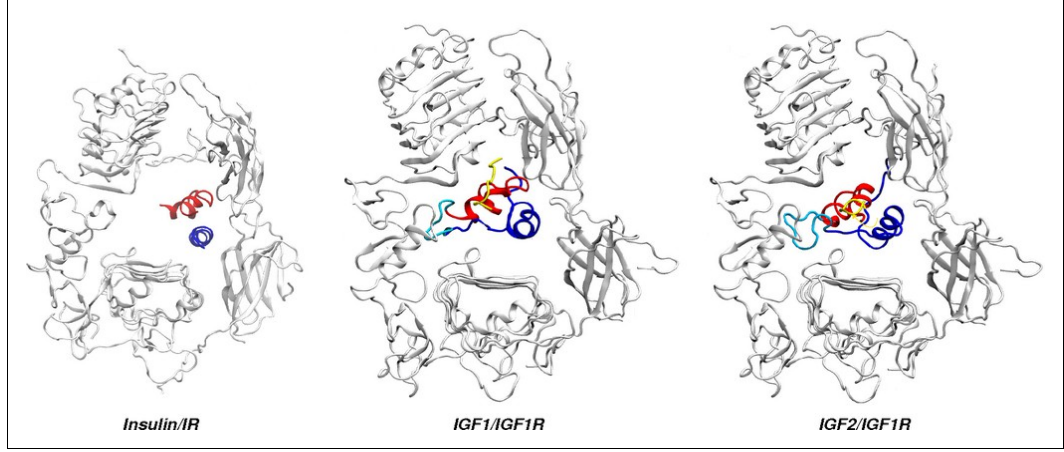
IGF-1R aktivasyonu ligand bağımlı olarak gerçekleşir. IGF-I ve IGF-II'nin reseptöre bağlanmasıyla kinaz domainlerinden biri diğerini fosforilleyerek (transotofosforilasyon) üç boyutlu yapının yeniden düzenlenmesine ve kinaz domaininin otoinhibisyon etkisini göstermesini sağlayan yapısının da değişmesine neden olur. Tyr 1161/1165/1166 üçlü tirozin bölgesinin fosforilasyonu ile konformasyonda gerçekleşen bu değişiklik katalitik bölgeye ATP'nin ve substratların erişimine izin verir ve bu durum kinaz aktivitesinin bazal duruma göre 120 kat artışına yol açar [Favelyukis *et al.*, 2001].

IGF-1R aktivasyonunun hücre transformasyonunun gerçekleşmesinde ve transforme olmuş fenotipin korunmasında etkili olduğu düşünülmektedir [Rubin and Baserga, 1995]. Aktif IGF-1R; IRS-1 ve Shc proteinlerini fosforilleyerek hücre içi sinyal iletim yollarının ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlamaktadır. Normal ve neoplastik epitel hücrelerinde mitojenik ve antiapoptotik sinyal yollarının düzenlenmesinde IGF-1R ve IR beraber çalışmaktadır. IR glukoz homeostazisinde merkezi rol oynarken, IGF-1R hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev almaktadır. Fibroblastlar üzerinde yapılan deneylerde *IGF-1R* aşırı ifadelenmesinin diğer bütün hücre dışı büyüme faktörlerine olan bağımlılığı ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [Pietrkowski *et al.*, 1992]. *IGF-1R*'nin embriyonik dönemde inaktivasyonu vasküler endotelial hücrelerin kaybına ve mezenşimal hücrelerin apoptozuna yol açmaktadır [Han *et al.*, 2003]. *IGF-1R* ifadelenmesinin tamamen engellendiği farelerle yapılan incelemelerde akciğer hipoplazisi geliştiği ve farelerin doğumda solunum yetmezliğinden öldüğü belirlenmiştir [Liu *et al.*, 1993].

2.7.1.1. IGF-1R Sinyal Yolağı

IGF sinyal yolağı IGF-I ve IGF-II ligandları, bu ligandlara ait reseptörler (IGF-1R ve IGF-2R), IGF-bağlanma proteinleri (IGFBP1-6) ve diğer düzenleyici faktörlerin birlikte çalışmasıyla oluşur. IGF sinyal yolağının aktivasyonu IGF-1R ve IGF ligandlarının bağlanmasıyla gerçekleşir, inhibisyonu ise IGFBPler tarafından IGF bağımlı veya bağımsız olarak gerçekleştirilebilir [Rodon *et al.*, 2008; Feldman *et al.*, 2009]. IGF-1R/IR hibrit reseptörleri afinitelerine bağlı olarak sırasıyla IGF-I,

IGF-II ve insülinle aktive olabilmektedir. IGF-1R'nin hücre dışı α domainleri ise IGF-I ligandına, IGF-II ve insüline oranla daha yüksek afiniteyle bağlanmaktadır. Şekil 2.6'da IR ve IGF-1R proteinleri ligand bağlı durumda gösterilmiştir.



Şekil 2.6: IR ve IGF-1R protein yapılarının ligandlarıyla birlikte gösterimi.

IGF-1R-ligand bağlanmasıyla aktivasyonu gerçekleşen iki ana yolak bulunmaktadır (Şekil 2.7). İlk yolda IGF-1R; PI3K/Akt yolağının aktivasyonuna sebep olur [Kim *et al.*, 1999]. Diğer tirozin kinaz reseptörler hedef sinyal yollarını aktive edecek proteinlere direkt bağlanırken IGF-1R aktivasyonu bir ara molekül üzerinden gerçekleştirilir. IGF-1R'nin aktivasyonunu sağladığı ilk molekül insülin reseptörü substrat proteinidir (IRS-1). IRS-1, IGF-1R yolağının diğer hedef molekülleri için bir scaffold protein işlevi görmektedir. IRS-1 tirozin fosforilasyonu gerçekleştikten sonra diğer proteinler SH2 veya PTB domainleriyle bağlanarak IGF-1R bağımlı sinyal yollarının aktivasyonunu sağlarlar. PI3K bu yolak üzerinden aktif hale gelmekte ve PIP3 miktarında artışa neden olmaktadır. PIP3, hücre büyümesi ve hayatta kalmasında rol oynayan protein kinaz B'nin (Akt) aktivasyonunu sağlar. Akt'nin aktivasyonu pro-apoptotik proteinlerin (Bad, kaspaz 9) fosforillenerek inhibe olmasına yol açar. Akt aktivasyonu aynı zamanda anti-apoptotik proteinlerin (Bcl-2, Bcl-xL, NF- κ B) ifadenmesinde artışa yol açmaktadır [Brazil *et al.*, 2004]. Aktif olarak IGF-1R geri dönüşümü gerçekleştirilen hücrelerde Akt aktivasyonunun büyük ölçüde baskılandığı belirlenmiştir [Romanelli *et al.*, 2007].

belirlenmiştir [Slomiony *et al.*, 2007]. Bazı çalışmalarda EGFR'nin IGF-1R ile dimer oluşturarak ERK artışına sebep olduğu gösterilmiştir [Kuribayashi *et al.*, 2004; Morgillo *et al.*, 2006]. IGF-1R ve EGFR arasındaki ilişki göz önüne alındığında, IGF-1R sinyal yolağının inhibisyonu EGFR yolağının aşırı aktivasyonu ile kompanse edilmektedir [Morgillo *et al.*, 2007; Barnes *et al.*, 2007; Buck *et al.*, 2008].

IGF-1R'nin integrinle beraber çalışarak hücre göçünü düzenlediği belirlenmiştir [Kiely *et al.*, 2006]. Yapılan çalışmalar β 1A integrin moleküllerinin IGF-1R ve IRS-1 ile kompleks oluşturarak, IGF-1R bağlantılı hücre bölünmesine ve yüzey bağımsız büyümeye yardımcı olduğunu göstermektedir [Goel *et al.*, 2004]. İntegrinin stoplazmik bir varyantı olan β 1C ise IGF-I ligand varlığında ECM'ye hücre adezyonunun artmasına sebep olmaktadır ve bu etki IGF-1R antikoru olan α -IR3 tarafından inhibe edilebilmektedir [Canonica *et al.*, 2008]. IGF-1R sinyali MMP-2, MMP-9, u-PA gibi ECM bileşenlerinin parçalanmasını sağlayan enzimlerin aktivasyonundan sorumlu olan proteolitik enzimlerin ifadenme seviyelerini arttırmaktadır [Qian *et al.*, 2007].

2.7.1.2. IGF-1R Kanseri İlişkisi

IGF-1R'nin kanser gelişimiyle direkt bağlantılı bir yolak olduğu bilinmektedir. IGF-1R ve bağlı yolakların aktivasyonu kanser hücrelerinin onkogenik transformasyonuna, büyümesine ve hayatta kalmasına yol açmaktadır [Baserga *et al.*, 1997]. Yapılan çalışmalar çoğu onkogenin etkili olabilmesi için IGF-1R sinyal yolağına ihtiyaç duyduğunu göstermiştir [Pollak, 2008; Baserga, 2009]. *IGF-1R* $-/-$ farelerde yapılan deneylerde SV40 T antijeni, H-ras, v-src, Raf ve sıgır papilloma virüsü ile transfeksiyon yapılmasına rağmen hücre transformasyonu gerçekleşmemiştir [Sell *et al.*, 1993; Baserga, 1995; LeRoith *et al.*, 1995].

IGF-1R fonksiyonundaki azalmanın tümör hücrelerinde apoptozu uyardığı [Burgaud *et al.*, 1995; Ferber *et al.*, 1996], *IGF-1R* geninin aşırı ifadenmesinin ise tümör hücrelerini apoptozdan koruduğu belirlenmiştir [Resnicoff *et al.*, 1995; Prisco *et al.*, 1997]. IGF-1R aşırı ifadenmesi veya sürekli aktivasyonu fibroblast hücrelerinin ligand bağımlı transformasyonuna [Kaleko *et al.*, 1990], transforme

edilmiş kolonositlerin hayatta kalmasına [Garrouste *et al.*, 2000] ve nude farelerde tümör gelişimine neden olmaktadır [Singh, 2000]. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda meme ve deri dokularında spontane tümörlerin gelişmesi, dokuya özgü IGF-1R ifadelenmesindeki ya da aktivasyonundaki artışın kanser gelişimi açısından risk faktörü oluşturduğunu düşündürmektedir [DiGiovanni *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007]. Tüm bu etkenler göz önüne alındığında *IGF-1R*'nin bir onkogen gibi değerlendirilmesi gerektiği söylenebilir. Ancak IGF-1R sadece transformasyonu sağlayabilir. Sürecin devamında gelişen malignant profili IGF-1R tek başına yönetemez. Malignant profil oluşumu için gerekliliği de bulunmamaktadır. Çoğu kanser tipinde görülen yüksek seviyedeki IGF-1R ifadelenmesi de genellikle malignant profilin sonucudur.

Kanser hastalarında IGF-1R davranışı incelendiğinde gen kopya sayısında artış veya sürekli aktivasyona sebep olan tirozin kinaz mutasyonları gibi genel mekanizmaların bulunmadığı görülmüştür [Hirsch *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2004]. Geniş çaplı kanser genomu dizileme çalışmalarında *IGF-1R* geninde çok nadir mutasyon gerçekleştiği ve bu mutasyonların da genellikle reseptörün ligand bağımsız sürekli aktivasyonuna neden olduğu belirlenmiştir [Craddock and Miller, 2012]. Akciğer kanseri hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda IGF-1R tirozin kinaz mutasyonu veya *IGF-1R* kopya sayısında artış gibi etmenler bugüne kadar belirlenemediğinden, bu mekanizmalar tedaviye yönelik yaklaşımlarda göz ardı edilmektedir [Yin *et al.*, 2009].

İnsülin reseptörünün embriyonik dönemde sentezlenen türü olan IR- α ve IGF-1R; kanser hücrelerinde aşırı ifadelenen proteinlerdendir. Her iki reseptörün de fazla miktarda ifadelenmesi IGF-1R/IR hibrit reseptörlerinin oluşma olasılığını arttırmaktadır. IGF-1R/IR-A ve IGF-1R/IR-B hibrit reseptörleri IGF-II, insülin ve IGF-I ligandlarının tamamına bağlanabilme özelliğine sahiptir ve bu durum reseptör aktivitesinde bir sürekliliğe yol açmaktadır [Belfiore, 2007]. Normal akciğer dokusuyla karşılaştırıldığında, her iki reseptörün de ifadelenme miktarı tümör dokusunda daha yüksektir [Stabile *et al.*, 2011].

Metastaz; hücrenin primer tümör bölgesinden ayrılması, göçü, dokulara invazyonu ve damar yoluyla dolaşıma katılmasını gerektiren çok basamaklı bir süreçtir. IGF-1R yolağı bu süreci yönetebilecek pleiotropik etkiyi gösterme

kapasitesine tek başına sahiptir. Tümör büyümesi ve metastaz oranlarının IGF-1R fonksiyonu engellendiğinde düştüğü belirlenmiştir [Long *et al.*, 1998; Samani *et al.*, 2001]. Sadece IGF-1R ekstraselüler domaini bulunan hücrelerin tümör oluşturma ve metastatik potansiyelleri tamamen ortadan kalkmıştır [Samani *et al.*, 2004]. Yüksek metastatik özellik gösteren kanserlerde *IGF-1R* ifadenme seviyeleri artmıştır [Rowinsky *et al.*, 2007]. NSCLC erken evrelerde genellikle belirli bir bölgeye lokalize halde bulunurken, ileri seviyelerde yüksek metastaz oranlarına sahiptir. İleri seviye NSCLC ve lenf nodu metastazına sahip hastaların IGF-1R seviyelerinin metastaz içermeyen ve erken evre NSCLC hastalara oranla çok daha yüksek olduğunun belirlenmesi IGF-1R yolağının NSCLC metastazının gelişim sürecinde önemli olduğunu göstermektedir [Tang *et al.*, 2012].

Tümör hücrelerinin büyümesinde sınırlayıcı etmenlerden birisi de ortamdaki besin ve oksijen miktarıdır. Besin azlığı ve oksijensiz kalan dokuda oluşan hipoksi tümör hücrelerinin ölümüne neden olur. Bu durum, hücrelerde IGF ve insülin sinyal yolları tarafından angiogenезin uyarılması ile ortadan kalkar. Yapılan çalışmalar, IGF-I ve IGF-II'nin *HIF-1α* ifadenmesini, MAPK ve PI3K sinyal yolları aracılığı ile indüklediğini göstermiştir. *HIF-1α*, anjiyogenезin temel düzenleyicisi olan *VEGF*'nin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar. IGF-I ve IGF-II bu yolla endotelial hücrelerin göçünü ve farklılaşmasını uyararak anjiyogenезe sebep olabilmektedir [Rosenzweig ve Atreya, 2010]. IGF-1R sinyal yolağı aktivasyonunun, kanser hücrelerinde görülen sürekli *HIF-1α* aktivasyonu/ifadenmesinin yaklaşık %50'sinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [Stoeltzing *et al.*, 2003]. Bu durum IGF-1R'nin anti-anjiyogenik terapiler için hedef olabileceğini göstermektedir. NSCLC anjiyogenезiyle IGF-1R aktivasyonu arasında direkt bağlantı gösterilmemesine rağmen; meme kanseri, endometrial adenokarsinom, hepatik kanser ve kolorektal kanser türlerinde *VEGF* ifadenmesinin IGF-1R tarafından uyarıldığı belirlenmiştir [Kim *et al.*, 1998; Bermont *et al.*, 2000; Reinmuth *et al.*, 2002; Tong *et al.*, 2007].

IGF-I ve IGFBP-3 arasındaki denge tümör hücresinin hayatta kalmasına, bölünmesine veya apoptoza uğramasına neden olabilir. Serum seviyesi artmış IGF-I ve/veya azalmış IGFBP-3; NSCLC [Masago *et al.*, 2011], kolon [Gao *et al.*, 2012] ve meme kanseri [Teas *et al.*, 2011] başta olmak üzere çoğu kanserde büyüme ve

yayılma açısından risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. IGF-I/IGFBP3 oranının yüksek olması akciğer kanser riskinin artışıyla, *IGF-1R* ifadenme seviyelerindeki artış da akciğer kanseri hastalarında, hastalığın hızlı ilerleyişiyle bağlantılıdır [Lee *et al.*, 2008].

Artan IGF ligand üretimi IGF-1R aktivasyonuna neden olmanın yanı sıra ligand bağlanmasına bağlı olarak reseptörün hücre yüzeyinden uzaklaştırılmasını sağlar ve IGF yolağının dengesi korunmuş olur. NSCLC hücre hatlarında *IGF-1R*'nin aşırı ifadenmesiyle bu denge bozulmaktadır. NSCLC hatlarından alınan doku örneklerinde artan IGF ifadenmesi ve artan IGF-1R fosforilasyonu (Tyr1161 veya Tyr1165 ve Tyr1166) belirlenmiştir [Kim *et al.*, 2012; Prudkin *et al.*, 2012]. NSCLC hücre hatlarına IGF-I uygulaması yapıldığında IGF-1R ve Akt seviyelerinde artış gerçekleşmektedir [Lee *et al.*, 2004].

IGF-1R sinyal yolağının PI3K ve MAPK yolaklarını aktivasyonunun yanı sıra mutant KRAS sinyalinin regülasyonunda da rol aldığı belirlenmiş ve mutant KRAS geni taşıyan NSCLC türlerinde hedef yolak olarak düşünölmeye başlanmıştır. Sürekli aktif formda KRAS proteinine sahip NSCLC hücre hatları PI3K yolağının aktivasyonu için bazal seviyede IGF-1R aktivitesine ihtiyaç duymaktadır [Molina-Arcas *et al.*, 2013].

NSCLC hücrelerinde gerçekleştirilen boyama işlemi sonucunda IGF-1R proteininin çoğunlukla sitoplazmada, az miktarda membranda yer aldığı, çekirdekte ise bulunmadığı belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal boyama yapılan 13 akciğer kanseri dokusundan 11'inde (%85) hücre membranında IGF-1R protein miktarının arttığı belirlenmiştir [Ouban *et al.*, 2006]. Western blot analizleri sonucunda NSCLC hücre hatlarının normal bronşiyal epitel hücrelerinden çok daha yüksek IGF-1R aktivasyonuna sahip olduğu görölmüştür ve bu durum NSCLC hastalarına yönelik IGF-1R hedefli tedavilerin geliştirilmesine yönelik çalışmaları hızlandırmıştır [Lee *et al.*, 2004].

In vitro çalışmalar IGF-1R/NSCLC bağlantısının önemli olduğunu göstermesine rağmen hastalardan alınan örnekler incelendiğinde hasta hayatta kalım süresiyle düşük veya yüksek *IGF-1R* ifadenme seviyeleri arasında bir bağlantı bulunamamıştır. Hastalar tümör tiplerine göre sınıflandırıldığında ise *IGF-1R* ifadenme seviyelerinin tümör tipinde belirleyici olduğu görölmüştür [Agullo-

Ortuno, 2014]. Tümörleri cerrahi olarak alınan NSCLC hastalarıyla yapılan çalışmada *IGF-1R* ile birlikte *EGFR*'nin de ifadenme miktarında artış olmasının yeniden tümör oluşum süresini kısalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada 125 NSCLC hastasından alınan doku örneklerine boyama işlemi yapıldığında IGF-1R negatif veya pozitif olmanın, hasta hayatta kalma süresiyle bağlantılı olmadığı belirlenmiştir [Ludovini *et al.*, 2009]. Akciğer tümörleri hastalığının birinci evresinde cerrahi olarak alınmış 71 NSCLC hastasıyla yapılan incelemede de IGF-1R seviyelerinin hasta hayatta kalma süresiyle bağlantısı bulunmamaktadır [Lee *et al.*, 2008]. Bu durum IGF-1R'nin asıl işlevinin kanser gelişiminin erken evrelerini yönetmek olduğunu göstermektedir. Ayrıca EGFR örneğinde olduğu gibi IGF-1R inhibisyonu veya yokluğundan kaynaklanan açık, farklı reseptörlerin aktivasyon etkisiyle kapatılabilmektedir.

2.7.1.3. IGF-1R Bağlantılı Tedavi Yöntemleri

IGF-1R yolağının tümör oluşumu ve metastazında rol aldığı, bilinen antikanser terapilerine dirence neden olduğu bilinmektedir [Adams *et al.*, 2000; Pollak *et al.*, 2008]. IGF-1R'nin tümör hücrelerini kemoterapi, radyoterapi ve sitokinler tarafından uyarılan apoptozdan koruduğu gösterilmiştir [Wu *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1997; Scotlandi *et al.*, 2002].

IGF-1R ifadenmesinin susturulması, *MMP-2*, *MMP-9* ve *u-PA* gibi invazyonla bağlantılı genlerin ifadenme oranlarının ve Akt/ERK fosforilasyonunun azalmasına neden olmaktadır. IGF-1R seviyelerindeki %60-70 oranındaki baskılanma transforme fenotipin normale dönmesi için yeterlidir. Bu durum IGF-1R'nin hücre bölünmesini kontrol etmektense transformasyonu sürdürecektir şekilde etki ettiğini göstermektedir.

IGF-1R karşıtı tedavi yaklaşımları; monoklonal anti-IGF-1R antikollarının kullanımı, tirozin kinaz inhibitör moleküllerinin uygulanması ve IGF ligand antikollarının kullanımı şeklinde 3 başlıkta incelenebilir. Klinik çalışmalar her bir yöntemin kendi içinde ayrı seçicilik, etkinlik ve toksisite seviyeleri olduğunu ve bu durumun tedavi başarısını etkilediğini göstermiştir [Ji *et al.*, 2007; Carboni *et al.*,

2009; Haluska *et al.*, 2012]. IGF-1R yolağını hedefleyen üç tedavi yaklaşımında da *in vivo* ve *in vitro* koşullarda anti-tümör aktivitesi görülmüştür. Anti-IGF-1R antikorları ve tirozin kinaz inhibitörleriyle yapılan çalışmalarda çoğu kanser tipinde hastalığın stabilizasyonu sağlanmıştır [Carden *et al.*, 2010; Soria *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2013]. İlaç geliştirme çalışmaları insülin reseptörüne etki etmeden sadece IGF-1R baskılanmasını sağlayacak moleküller üzerinde yoğunlaşmaktadır. Çünkü IGF-1R ve IR reseptörleri arasındaki yapısal benzerlik yüzünden IGF-1R sinyal yolağını inhibe etmek için kullanılan kimyasallar IR inhibisyonuna da neden olarak hiperglisemi ve hiperinsülinemi gibi yan etkilere neden olmaktadır. [Sachdeu *et al.*, 2006]. Bu durumu engellemek amacıyla IGF ligand antikorlarının geliştirilmesine çalışılmaktadır. IGF-I ve IGF-II bağlanmasının engellenmesiyle glukoz toleransına herhangi bir olumsuz etki olmaksızın reseptör aktivasyonunun inhibisyonu sağlanabilmektedir [Haluska *et al.*, 2012; Friedbichler *et al.*, 2013].

Günümüze kadar kullanılan IGF-1R tirozin kinaz inhibitörlerinin çoğunluğu IGF-1R kinaz domainine bağlanmak için ATP'yle yarışarak etki göstermektedir [Ji *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2008; Carboni *et al.*, 2009]. IGF-1R ve IR arasındaki yapısal benzerlik sonucu ATP'yle yarışmalı inhibitör etkisi IR reseptöründe de baskılanmaya yol açmaktadır [Favelyukis *et al.*, 2001]. IGF-1R inhibitörleri kaynaklı hipergliseminin önüne geçmek amacıyla ATP'yle yarışmalı olmayan ajanların geliştirilmesine çalışılmaktadır. Bazı tirozin kinaz inhibitörleri de tirozin kinaz domainine bağlanarak konformasyonel değişiklikleri engellemekte ve bazal konumdan fosforile konuma geçişi durdurarak aktivasyonu inhibe etmektedir. Tirozin kinaz inhibitörlerinin en büyük avantajı *in vitro* deneylerde nanomolar seviyesindeki konsantrasyonlarda IGF-1R inhibisyonunun gerçekleşebilmesidir. Yöntemin dezavantajı olarak da IGF-1R kinaz domaininin IR ile %85 homoloji taşıması ve ATP bağlanma bölgesinin her ikisinde de %100 korunmuş olması sebebiyle IGF-1R tirozin kinaz inhibitörlerinin dizaynının zor olmasıdır.

Akciğer kanseri hücre hatlarıyla yapılan çalışmalar IGF-1R tirozin kinaz inhibitörlerinin MAPKK inhibitörleriyle beraber kullanımı sonucu K-Ras mutant hücre hatlarını seçici şekilde toksisite gösterdiği belirlenmiştir. K-Ras mutant hücrelerde görülen bu hassasiyetin onkogenik K-Ras varlığında Akt aktivasyonunun büyük ölçüde IGF-1R bağımlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [Molina-

Arcas *et al.*, 2013; Chen and Sweet-Codero, 2013]. IGF-1R inhibisyonu mutant K-Ras tarafından uyarılan IGF bağımlı PI3K aktivasyonunu baskılayabilmektedir. Bu duruma ters olarak, K-Ras mutasyonunun hücrelerde IGF-I üretimini ve buna bağlı olarak IGF-1R aktivasyonunu arttırdığı, dolayısıyla da IGF-1R tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç sebep olduğu gösterilmiştir [Molina-Arcas *et al.*, 2013].

IGF-1R tirozin kinaz inhibitörlerinin çoğu IR'yi de hedef alabilirken IGF-1R monoklonal antikoları daha spesifik etki göstermektedir. IGF-1R monoklonal antikolarının IGF-1R ekstrasellüler domainine seçici şekilde bağlanarak ligand bağlanmasını engellemesi ve sinyal yolağını baskılaması, tirozin kinaz inhibitörlerine oranla daha güvenilir olmalarını sağlamaktadır. Ancak mikroçevresel faktörlerin IGF-1R antikolarının tümör dokusuna vasküler geçişi sınırlandırması, daha küçük moleküler yapıya sahip inhibitörlerin geliştirilmesini gerektirmektedir. IGF-1R monoklonal antikor olan CP-751,871'in 21 günlük döngüler şeklinde 3-20 mg/kg dozlarında uygulandığı bir faz I çalışmasında, çalışmaya katılan 15 hastanın 10'unda tümör büyümesi sabitlenmiş ve hastalarda ağır yan etkiler görülmemiştir [Haluska *et al.*, 2007]. Farklı çalışmalarda ise tedavi başlangıcında anti-IGF-1R monoklonal antikor uygulamasına iyi cevap verilmesine rağmen, tedavi ilerledikçe bu antikolara hızlı bir direnç geliştiği görülmektedir [Reidy *et al.*, 2010; Ramalingam *et al.*, 2011; Schmitz *et al.*, 2012]. Direncin IGF-1R proteininin hibrit IGF-1R/IR reseptörlerinin yapısına katılmasının engellenmesi sonucu IR homodimerlerinin sayısındaki artışla ortaya çıkan IR sinyaline bağlı olduğu düşünülmektedir. Direnç gelişiminin diğer bir sebebinin de IGF-II bağlanmasıyla aktivasyonu gerçekleşen alternatif bir yolak olan IR-A aktivasyonuna bağlı olduğu bilinmektedir [Kim *et al.*, 2012; Bid *et al.*, 2012].

Klinik öncesi çalışmalar EGFR, HER2, PDGFR ve c-Met gibi reseptör tirozin kinazların IGF-1R inhibisyonuna karşı adaptif direnç gelişiminden sorumlu olduğunu göstermiştir [Haluska *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010; Hau *et al.*, 2011]. Yapılan çalışmalar EGFR ve IGF-1R yolaklarının, herhangi birinin inhibisyonundan doğan açıkları reseptör ifadenme oranlarının artması, PI3K-Akt sinyal yolağı aktivasyonunun artışı, hücre döngüsü düzenleyicilerinin fonksiyonlarının artması, kromatin modifikasyonu ve gen ifadenmesi seviyelerinin düzenlenmesi gibi yollarla kapatabildiğini göstermiştir [Chakravarti *et al.*, 2002; Buck *et al.*, 2008; Zha *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010; Jameson *et al.*, 2012]. Tirozin kinaz inhibitörleri

EGFR/IGF-1R heterodimer oluşumunu uyarabilir ve EGFR inhibisyonu ile etkisiz hale gelen sinyal yollarının IGF-1R üzerinden aktive edilmesine yol açabilir [Morgillo *et al.*, 2006]. EGFR tirozin kinaz inhibitörüne karşı dirençli primer glioblastomalarda *IGF-1R* ifadenin seviyelerinin yüksek olduğu belirlendiğinden IGF sinyal yolağının EGFR inhibitörlerine karşı gelişen direncin ortadan kaldırılmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir [Chackravarti *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2004]. Buna karşılık olarak EGFR sinyal yolağının düzenlenmesi de IGF-1R inhibitörlerine karşı gelişen dirence karşı etkili olabilir. NSCLC hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda EGFR inhibisyonu sonrası IGF-1R sinyal yolağının transaktivasyonu hücrelerin apoptozdan kurtulmasına yol açmakta, IGF-1R sinyalinin de inhibe edilmesi ise hücrelerin EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine gösterdiği direnci ortadan kaldırmaktadır [Morgillo *et al.*, 2006].

Tek bir ajan kullanımına dayalı kemoterapi yöntemleri genellikle ilaç direncine yol açmakta ve tedavi başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. İleri seviye NSCLC hastalarında EGFR tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinib ve carboplatin/paclitaxel tedavisine anti-IGF-1R antikoru CP-751,871 eklenmesini araştıran iki faz III denemesi yürütülmektedir. 3. ve 4. evredeki NSCLC hastalarıyla yürütülen bir faz II çalışmasında, standart kemoterapiye (paclitaxel ve carboplatin) anti IGF-1R antikoru (CP-751,871) eklenmesi sonucu tedaviye verilen yanıt oranı %32 değerinden %46'ya ulaşmıştır [Karp *et al.*, 2007]. Yapılan farklı bir çalışmada IGF-1R varlığının EGFR inhibitörü erlotinibin anti-tümör etkisini azalttığı belirlenmiştir. Bu etkinin sebebinin EGFR/IGF-1R heterodimerlerinin varlığı olduğu düşünülmektedir. EGFR/IGF-1R hibrit reseptörlerinin aktivasyonu fosforlanmış PI3K/Akt, p44/42, MAPK seviyelerinde ve m-TOR bağlantılı protein sentezinde artışa sebep olmaktadır. İlaç uygulaması yapılmamış veya her bir inhibitör ayrı ayrı uygulanmış tümörlerle karşılaştırıldığında, erlotinib ve IGF-1R inhibitörü AG1024'ün beraber kullanılması tümör büyümesini azaltmıştır [Morgillo *et al.*, 2006]. Fare deneylerinde de antikorların birlikte kullanımı hayatta kalma oranını arttırmaktadır [Goetsch *et al.*, 2005].

IGF-1R kanser türlerinin neredeyse tamamında sürekli olarak ifadenmesine rağmen, anti-IGF-1R tedavisine karşı olan hassasiyet oranları hastalara ve kanser türlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir [Yee, 2012]. Bu duruma IGF-1R

antikoru ganitumab kullanımı sonucu K-Ras mutasyonu taşıyan kolorektal kanser hastalarının FOLFIRI tedavisine gösterdikleri duyarlılıkta artış görülmemesi örnek gösterilebilir [Cohn *et al.*, 2013]. Metastatik sarkomalarda yapılan çalışmalar çekirdekte artan IGF-1R miktarının, IGF-1R antikoru kullanımında daha etkili bir cevap alınmasıyla bağlantılı olduğunu göstermiştir [Asmone *et al.*, 2012]. IGF-1R'ye ligand bağlanmasının hücre zarından çekirdeğe translokasyonuna sebep olduğu ve bu durumun EGFR inhibitörü gefitinibe karşı gelişen dirençle bağlantılı olduğu bilinmektedir [Aleksic *et al.*, 2010; Sarfstein *et al.*, 2012; Bodzin *et al.*, 2012]. Bu durum çekirdekte yer alan IGF-1R miktarının, kanser hücrelerinin IGF sinyaline olan bağımlılıkları ve yolağın inhibisyonuna karşı gösterecekleri hassasiyet konusunda bir belirteç gibi kullanılabileceğini fikrini ortaya çıkarmıştır.

2.7.2. IGF-2R

IGF-2R monomerik yapıya sahiptir ve fonksiyonel olarak IGF-1R ve IR ile bir bağlantısı bulunmamaktadır [Stewart and Rotvein, 1996; Dates *et al.*, 1998]. IGF-2R bir mannoz-6-fosfat reseptörüdür, kinaz domaini içermediğinden fonksiyonel değildir ve temel olarak IGF-II ligandının sistemden temizlenmesinde görevlidir [Jones and Clemmons, 1995]. Genin promotor kısmında iki tane E-box motifi ve Sp1 ile NGF-1A bağlanma bölgeleri bulunmaktadır.

IGF-2R ekstraselüler domaini üç ligand bağlanma bölgesi içerir. Bölgelerden biri IGF-II bağlanması için diğer ikisi ise mannoz-6-fosfat (M6P) ve fonksiyonel olmayan TGF içeren proteinlerin bağlanması içindir [Jones and Clemmons, 1995]. Reseptörün ekstraselüler domaini proteolitik kesimle çözülebilir bir forma dönüştürülür ve hücre membranından ayrılarak dolaşımda yer alan IGF-II proteinlerine bağlanıp parçalanmalarına neden olur [Costello *et al.*, 1999]. IGF-2R'nin sitoplazmik alt birimi protein kinaz C (PKC), cAMP-bağımlı protein kinaz ve kazein kinaz I ve II için potansiyel substrat olabilecek bölgeleri içerir [MacDonald *et al.*, 1988]

IGF-2R büyüme inhibitörü fonksiyonuna sahiptir ve fonksiyon kayıpları durumunda hücre büyümesi uyarılmış olur [Foulstone *et al.*, 2005]. Tümör baskılayıcı

özelliği olan IGF-2R'nin bazı kanser hücrelerinde mutasyonlar taşıdığı ve bu hücrelerde IGF-2R'de fonksiyon kayıpları olduğu belirlenmiştir.

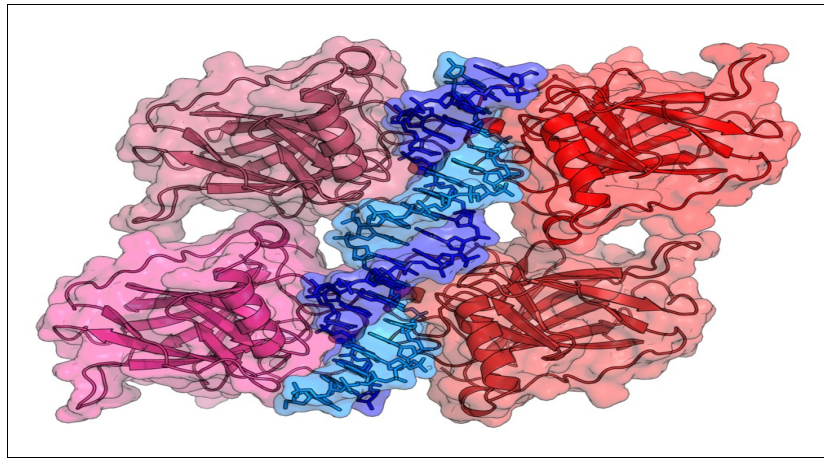
2.8. p53

p53; hücre döngüsünün kontrolünde, programlanmış nekrozda, otofajide, metabolizmada, kök hücre homeostazisinde, anjiyogenez ve yaşlanmada rol oynayan genlerin aktivasyonu ve baskılanmasında görev alan bir transkripsiyon faktörüdür [Zambetti *et al.*, 1992; Kem *et al.*, 1992]. Tümör baskılayıcı bir protein olan p53 hücrel streslere cevap oluşturulmasında ve hücre döngüsünde tutuklanmanın yada programlanmış hücre ölümünün gerçekleşmesiyle genomik stabilizasyonun sağlanmasında görev alır [Agarwal *et al.*, 1998]. p53 aktivasyonu; DNA hasarı, oksidatif stres, ozmotik şok, ribonükleotit eksikliği, onkogen ifadenmesinin yeniden düzenlenmesi gibi stres koşullarına cevap olarak gerçekleşir. Hücrenin içinde bulunduğu koşullara bağlı olarak hücre ölümünü, yaşlılığı, hücre döngüsünün durdurulmasını veya DNA onarımını uyarabilir [Stegh, 2011]. p53; p21 yoluyla G1/S kontrol noktasından [Ding *et al.*, 2003] ve G2/M kontrol noktasından [Pawlik and Keyomarsi, 2004] geçişleri düzenlemektedir. Farklı hücre hatlarında, Sp1 ve p53'ün farklı promotorlerin düzenlenmesinde beraber çalıştığı gösterilmiştir [Borellini and Glazer, 1993].

p53 proteini, asidik bir N terminal transaktivasyon domaini, proline zengin bir domain, diziye özgü DNA bağlanma domaini, oligomerizasyon domaini ve C- terminal düzenleyici domainden oluşur. p53'ün transaktivasyon domaini hem p53'ün p300 gibi koaktivatörlerinin bağlanması, hem de Mdm2 gibi moleküllerin bağlanmasının düzenlenmesi için gereklidir. Mdm2; p53'ün transaktivasyon domainine bağlanarak bu domainin fonksiyonunu, buna bağlı olarak da p53'ün biyokimyasal aktivitesini engeller. Mdm2 aynı zamanda p53'e özel bir E3 ubiquitin ligaz gibi davranarak, p53'ün ubiquitinasyonuna ve proteozomal yıkımına yol açar [Levine and Oren, 2009].

p53 aktivasyonu için iki temel olay gerçekleşmesi gerekmektedir. İlk olarak stres altındaki hücrede p53 yıkımı engellenerek hücre içinde protein miktarında artış sağlanır. İkinci olarak da p53 de meydana gelen konformasyonel değişiklikler akti-

vasyonu sağlayarak transkripsiyonel düzenleme mekanizmalarının devreye girmesini sağlarlar. Aktivasyonda kritik önem taşıyan bölüm N-terminal fosforilasyonunun gerçekleşmesidir. N-terminal domaini çok sayıda fosforilasyon bölgesi içerir ve bu bölgeler strese karşı aktive olan sinyal yollarını yöneten reseptör tirozin kinazların hedefi konumundadır. Aktif p53 bir transkripsiyon faktörü gibi çalışarak hücre döngüsünün kontrolünde, genomik stabilitenin sağlanmasında ve *p21*, *Bax* gibi apoptoz uyarıcı genlerin ifadenmesinde rol alır [Agarwal *et al.*, 1998]. Bu durum p53 proteinini hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA onarımı ve apoptozla bağlantılı yolların merkezine yerleştirir.



Şekil 2.8: p53 tetramer yapısının DNA'ya bağlı formda gösterimi.

p53 mutantları kanser hücrelerinin çoğalmasından sorumlu moleküllerin çoğunun transaktivasyonundan sorumludur. Bilinen tüm tümörlerin %50'sinin *p53* geninde mutasyon bulunmaktadır. *p53*'te gerçekleşen kanser ilişkili mutasyonların çoğunluğu anlamsız mutasyonlardır. Bu mutasyonlar genellikle en korunmuş bölge olan DNA bağlanma domaininde gerçekleşir ve bilinen yaklaşık 6 tane hot spot noktası bulunmaktadır. Yabancıl tip p53 stres bulunmayan koşullarda çok kısa ömürlü bir protein iken, anlamsız mutasyonlar sonucu oluşan mutant p53 molekülü çok daha uzun bir yarı ömre sahiptir. Mutant p53'ün yabancıl tip p53 üzerinde baskın bir negatif etkisi vardır ve bu etkiye bağlı olmadan da onkojenik aktivite gösterebilir. p53 tarafından transaktive edilen promotör dizileri ya çok az homoloji gösterir ya da hiç göstermezler. Bu durum mutant p53'ün DNA dizisi yerine DNA'nın yapısal motifine

ilgi gösterdiğine dair hipotez geliştirilmesine neden olmuştur (Şekil 2.8). p53'ün mutasyon şekli meme kanseri başta olmak üzere çoğu kanser için belirleyici özelliktedir. Mutant p53; DNA sentezi, hücre bölünmesi, hücrenin hayatta kalması, kimyasal direnç, anormal sentrozomlar, gen kopyasında artış, somatik hücre programlanması, kök hücre karakterizasyonu, doku yapısının bozulması, anjiyogenez, hücre göçü, hücre invazyonu ve hücre metastazında görev alır [Freed-Pastor and Prives, 2012].

2.8.1. p53 Bağlantılı Sinyal Yolakları

Gen ifadenmesinin p53 tarafından uyarılmasında p53'ün hedef promotör dizisine direkt bağlandığı, transkripsiyon baskılanmasının ise p53 ve diğer transkripsiyon faktörleri arasındaki protein-protein etkileşimleriyle gerçekleştiği düşünülmektedir [Ohlsson *et al.*, 1998].

Sp1 ve p53 arasındaki heterokompleks yapısı her iki proteinin de düzenleyici elementlerinin bağlanma davranışını değiştirebilir ya da aktivitelerinde farklılığa neden olabilir. p53-Sp1 komplekslerinin oluşumu Sp1 tarafından düzenlenen promotör dizilerinin transkripsiyon seviyelerini doğrudan etkilemektedir.

İmmünpresipitasyon ve western blot analizleri sonucu p53 ve WT1'in fiziksel olarak etkileşimde olduğu belirlenmiştir [Mahesworon *et al.*, 1993]. WT1'in p53 proteininin stabilizasyonunu sağladığı, transaktivasyonel özelliklerini yönettiği ve apoptozu uyarma fonksiyonunu baskıladığı gösterilmiştir [Mahesworon *et al.*, 1995]. WT1 ve mutant p53'ün ifadenme seviyelerinin agresif ER (-) meme kanserleriyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir [Silberstein *et al.*, 1997]. WT1'in tersine p53, *IGF-1R* promotör bölgesine *in vitro* koşullarda spesifik bir bağlanma göstermez.

PI3K, p53 kaynaklı apoptozu engelleyebilmektedir [Trotman and Pandolfi, 2003]. p53 ve PI3K sinyal yolları arasındaki bu ilişkinin düzenlenmesinde PTEN ve Mdm2 gibi spesifik proteinler rol almaktadır [Mayo and Donner, 2001; Freeman *et al.*, 2003]. p53 bağlantılı apoptoz Bax, Noxa ve PUMA gibi pro-apoptotik proteinlerin ve kaspaz proteinazlarının aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir [Schuler and Green, 2001].

APE1/Ref-1 DNA onarım aktivitesine ve çoğu transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma ilgisini düzenleyen redoks aktivitesine sahip çift fonksiyonlu bir proteindir. APE1'in redoks aktivitesiyle p53'ün DNA bağlanma aktivitesini düzenlediği ve bu bağlamda p53'ün proapoptotik etkisinin aktivasyonunu sağladığı düşünülmektedir [Cun *et al.*, 2014]. p53 transkripsiyonu başladıktan sonra hücrenin redoks stres seviyesine bağlı olarak APE1 bağlantılı p53 yıkımı gerçekleştirilir ve apoptotik yolağ durdurulmuş olur. Oksidatif stres seviyeleri hücre kapasitesinin üstüne çıktığında ise APE1'in ROS tarafından oksidasyonunun gerçekleşmesi p53'ten ayrılmasına ve p53'ün stabilizasyonunun artması sonucu apoptotik yolağın aktivasyonuna neden olmaktadır [Zhu *et al.*, 2015]. APE1 tipik bir ubiquitin kinaz olmamasına rağmen p53 protein yıkımını yönetebilmektedir. Bu duruma açıklama olarak APE1'in N-terminal domaininin ubiquitinasyona hedef olabilecek çok sayıda lizin aminoasiti içermesi gösterilebilir. Yapılan son çalışmalar p53 inhibitörü olan Mdm2 proteininin APE1 ubiquitinasyonundan sorumlu olabileceğini göstermiştir. Mdm2'nin bu şekilde APE1 ve p53 seviyelerini kontrol ederek hücre içi dengenin sağlanmasında rol aldığı düşünülmektedir [Busso *et al.*, 2009].

2.9. Konu ile İlgili Çalışmalar

2.9.1. IGF-1R p53 İlişkisi

IGF-1R ifadelenme seviyeleri *BRCA-1*, *p53* ve *WT1* gibi tümör baskılayıcı genlerin aktivitesiyle düşmektedir. Yabanıl tip p53, *IGF-1R* ifadelenmesinin düzenlenmesinde baskılayıcı olarak işlev görürken; mutant p53, *IGF-1R* ifadelenmesinin kuvvetli transaktivatörü olarak davranmaktadır [Werner *et al.*, 1996]. p53 bu etkisini *IGF-1R* promotör dizilerine direkt bağlanmadan göstermektedir [Sarstein *et al.*, 2006]. Mutasyon içermeyen p53 vektörleriyle transfekte edilen Saos-2 hücrelerinde *IGF-1R* promotör aktivitesinin doza bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir [Werner *et al.*, 1994]. p53 içermeyen Saos-2 hücrelerinde hücre başına IGF-1R miktarı yaklaşık 43.000 reseptör olarak hesaplanmıştır. Aynı hücrelerde yabanıl tip p53 sentezinin gerçekleşmesi reseptör

sayısını 32.000'e düşürürken, mutant p53 proteini sentezleyen Saos-2 hücrelerinde hücre başı reseptör miktarı 55.000'e çıkmıştır. Mutant p53 sentezleyen hücreler, yabancı tip p53 üretenlere oranla %72 daha fazla IGF-1R içermektedir [Ohlsson *et al.*, 1998]. IGF-1R seviyelerindeki bu değişimle p53 arasındaki bağlantıyı sağlayan yolak tam olarak bilinmemektedir.

Hematopoetik hücrelerde apoptoz sürecinde IGF-1R p53'ün fizyolojik hedefi olarak görülmektedir. Farklı orjinlerden gelen hücre hatlarıyla (eritroid hücreleri ve osteoblastik hücreler) yapılan çalışmalarda p53'ün IGF-1R regülasyonunu aynı şekilde gerçekleştirmesi bu durumun hücre tipine bağlı değil genel bir mekanizma olduğunu göstermektedir.

p53'ün yanında WT1'in de *IGF-1R* promotör aktivitesini baskıladığı bilinmektedir. WT1'in aşırı ifadenmesi IGF-1R seviyelerini düşürmekte ve IGF-I kaynaklı hücre proliferasyonunu azaltmaktadır [Werner *et al.*, 1995]. Promotor bölgesine WT1 bağlanmasından sonra gen transkripsiyonu üzerindeki baskılanma seviyesi hücrenin içerdiği p53 miktarına ve formuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yabancı tip p53 içeren 3T3 hücrelerinde WT1'in baskılama etkisi %82 seviyesindeyken, p53 delesyonu yapılmış 3T3 hücrelerinde bu seviye %27'ye düşmektedir [Idelman *et al.*, 2002]. Bu etkinin p53'ün, *IGF-1R* promotöründe yer alan cis-elementlere bağlanma oranındaki artışa bağlı olduğu düşünülmektedir. p53 proteininde fonksiyon kaybolmasına neden olan mutasyonların kontrolsüz hücre bölünmesine sebep olmasının nedeni, WT1'in *IGF-1R* gibi hedef genlerinin promotor bölgelerine bağlanamaması olabilir.

p53 hem hücrel Sp1 miktarını azaltmakta hem de Sp1'in *IGF-1R* promotörüne bağlanmasını engellemektedir. *Sp1* içermeyen hücrelerle yapılan incelemelerde bazal *IGF-1R* promotör aktivitesinin çok düşük olduğu belirlenmiştir. *Sp1* içermeyen Schneider hücrelerinde *Sp1* geninin ifadenmesi *IGF-1R* promotör aktivitesini arttırmaktadır [Werner *et al.*, 1995].

p53'ün *IGF-1R* promotörünü baskıladığı bir diğer yol ise PI3K ve Akt yolları üzerinden ilerlemektedir. p53, bu yolları baskılayarak *IGF-1R* ifadenmesini uyaran sinyalin azalmasına yol açar. Bunun yanında, *PTEN* (fosfotaz ve tensin homolog proteini) gibi *IGF-1R* promotörü üzerinde baskılayıcı özellikleri olan tümör baskılayıcı genlerin ifadenmesini uyarmaktadır [Attias-Geva *et al.*,

2011].

Mutant *p53* taşıyan hücreler yabancı tip *p53* içerenlere oranla daha yüksek IGF-1R seviyelerine sahiptir. IRS-1 ifadenmesi üzerinde *p53*'ün herhangi bir rolü olmamasına rağmen *p53* yabancı tip hücrelerde IGF-I tarafından uyarılan IRS-1 fosforilasyonu seviyelerinde görülen azalma bu hücrelerde aktif IGF-1R miktarının azalışına bağlanabilir.

2.9.2. NSCLC IGF-1R İlişkisi

Kanser gelişimiyle bağlantılı herhangi bir risk faktörü akciğer kanseri gelişim oranını 1.6 ile 2.5 kat arası arttırırken, IGF ligandlarının bu risk faktörleriyle beraber çalışması tümör gelişim oranlarında 17 katlık bir artışa sebep olmaktadır [Wu *et al.*, 2004]. Transforme edilmiş bronşiyal epitel hücrelerinin yüksek bölünme oranlarını koruyabilmek için IGF sinyalinde artışa gereksinim duydukları belirlenmiştir [Lee *et al.*, 2004].

MMTV-IGFII transgenik farelerde yapılan deneylerde otokrin/parakrin IGF-II seviyelerinin akciğer kanseri riskiyle olan bağlantısı araştırılmıştır. Yapılan incelemelerde akciğer tümörleri genelde morfolojik olarak pulmoner adenokarsinom özellikleri göstermekle beraber 6 ay gibi erken bir zamanda oluşmaya başlamış ve 18 ay sonunda %69 oranına ulaşmıştır. Kullanılan bu fare modeliyle IGF-1R sinyal yolağının akciğer kanseri gelişimindeki etkisi *in vivo* koşullarda gösterilmiştir [Moorehead *et al.*, 2003]. Farelerde yaşlanmaya bağlı olarak tümör gelişim sıklığındaki artış, hücre yaşlanmasına bağlı olarak genomda mutasyonların birikmesine ve bu yaşlanma sürecini yöneten IGF-1R yolağının normalden fazla aktiviteye sahip olmasına bağlanmıştır [Dupont and Holzenberger, 2003].

NSCLC hücre hatlarıyla yapılan *in vitro* deneylerde shRNA kullanarak IGF-1R translasyonu engellendiğinde veya hücrelerde *IGF-1R* delesyonu gerçekleştirildiğinde hücrelerin yüzeyden bağımsız koloni oluşturma yeteneklerinde azalma gözlenmiştir [Lee *et al.*, 2007]. IGF-1R aktivitesinin engellenmesi; G1 kontrol noktasında hücre döngüsünün durdurulması ve hücrenin apoptoza yönlendirilmesiyle hücre canlılık oranlarını düşürmekte, IGF-1R aktivasyonunun

uyarılması ise bu etkiyi tam tersine çevirmektedir [Yu and Rohan, 2000].

A549 hücreleri hem EGFR hem de IGF-1R reseptörlerini hücre yüzeyinde aşırı miktarda bulundurmaktadır. A549 hücrelerinde yapılan çalışmalarda EGF uygulamasının EGFR, Akt, Src ve IGF-1R fosforilasyon oranlarını arttırdığı belirlenmiştir [Min *et al.*, 2015]. EGF tarafından uyarılan bu IGF-1R fosforilasyonunun Src inhibitörü dasatinib kullanılarak, hücrelerin Src siRNA'sıyla transfeksiyonuyla ve EGFR tirozin kinaz inhibitörü erlotinib kullanıldığında baskılandığı gösterilmiş, IGF-1R tirozin kinaz inhibitörü olan linsitinib kullanımı ise IGF-1R fosforilasyonu üzerinde minimal baskılama etkisi göstermiştir [Min *et al.*, 2015]. Bu durum bize IGF-1R fosforilasyonunu engellemek için EGFR yolağını inhibe etmenin IGF-1R inhibitörleri kullanmaktan daha etkili olduğunu göstermektedir. IGF-1R'ye özgü inhibitörün beklenen etkiyi göstermemesi IGF-1R/EGFR hibrit reseptörlerinin varlığından kaynaklanabilir. Linsitinibin EGFR üzerinde hiçbir baskılama etkisi bulunmadığı bilinmektedir.

A549 hücre hattı incelendiğinde IGF-1R ve EGFR yolaklarının yüksek aktivasyon değerine, c-Met ve HER2 yolaklarının ise düşük aktivasyon değerine sahip olduğu görülmüştür. A549 hücre bölünmesi, IGF-1R'nin ATP yarışmalı inhibitörü olan BMS-536924 kullanımıyla baskılanmıştır [Gong *et al.*, 2011]. A549 hücrelerinde yapılan deneylerde *IGF-1R* ifadenin siRNA kullanılarak engellenmesi A549 hücrelerinin G0/G1 kontrol noktasında durdurulmasına, apoptotik hücre sayısında artışa, bölünme oranlarının düşmesine ve A549 hücrelerinin adezyon, invazyon ve göç yeteneklerinin inhibisyonuna neden olmaktadır [Ma *et al.*, 2007].

IGF-1R inhibitörü olan monoklonal antikor R1507 verilen A549 hücrelerinde 72 saat sonunda büyümenin %40 oranında baskılandığı gösterilmiştir [Gong *et al.*, 2009]. h7C10/MK-0646 anti-IGF-1R antikorunu kullanarak meme kanser hücre hattı MCF-7 ve NSCLC hücre hattı A549 hücreleriyle yapılan çalışmalarda büyümenin baskılandığı belirtilmiştir [Goetsch *et al.*, 2005]. Bu çalışmada kullanılan antikorun bir diğer önemli özelliği de IGF-1R'ye olan özgüllüğü ve insülin reseptörüyle ilişkiye girmemesidir. A549 hücrelerinde h7C10/MK-0646 ile beraber EGFR antikorunu vinorelbine kullanıldığında büyüme neredeyse tamamen engellenmiştir. A549 hücrelerinde AG1024 uygulaması IRS-1 ve Shc proteinlerinin fosforilasyon

seviyelerini düşürmüş ve hücrelerde apoptoza yol açmıştır [Coseceanu *et al.*, 2007]. 5 µM curciminle beraber düşük dozlardaki inhibitörlerin (AG1478-EGFR inhibitörü, AG1024-IGF-1R inhibitörü, PD173074-FGFR inhibitörü, LY294002-PI3K inhibitörü, CAPE-NF-κB inhibitörü) kullanımı canlı hücrelerin sayısını belirgin bir şekilde düşürmüştür. AG1024 ve curcimin uygulamaları tek başlarına A549 hücrelerinde herhangi bir etkiye sebep olmazken beraber kullanımları hücre canlılığını %10 oranında azaltmıştır. A549 hücreleriyle kıyaslandığında H1299 hücrelerinin uygulanan inhibitörlere karşı daha duyarlı oldukları görülmektedir. Yüksek dozlarda inhibitör kullanımında (PD173074, AG1024) hücre bölünme oranları H1299 da %91-%95, A549 hücrelerinde ise %55-%54 oranlarında düşmüştür [Lin *et al.*, 2012]. Bu çalışmada elde edilen yüksek inhibisyon oranları FGFR ve IGF-1R'nin NSCLC tedavisinde iyi birer hedef olabileceğini düşündürmektedir.

2.9.3. Genistein p53 İlişkisi

NSCLC ve kolorektal kanser hücreleriyle yapılan çalışmalarda genisteinin apoptotik etkisini p53 bağımlı bir şekilde gerçekleştirdiği gösterilmiştir [Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013].

Genisteinin A549 hücrelerine olan apoptotik etkisinin p53 proteiniyle olan bağlantısının anlaşılması için viral transfeksiyonla *p53* ifadenmesi baskılanan hücrelere düşük dozlarda (5-10 µM) genistein uygulanmış ve apoptotik hücre sayısında azalma görülmüştür. Bu durum genisteinin apoptotik etkisinin p53 bağımlı olduğunu göstermektedir [Wu *et al.*, 2016].

0, 15, 30 ve 60 µM genistein uygulaması yapılan A549 hücrelerinde 24 saat sonunda yapılan western blot analizleriyle p53 protein seviyesinin doza bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu etkinin hücre tipine bağlı gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için yabancı tip p53 içeren farklı hücre hatlarıyla (HeLa, Calu-1) da genistein uygulaması incelenmiş ve p53 protein miktarının doza bağlı arttığı görülmüştür [Zhu *et al.*, 2015]. Western blot analizleri p53 miktarının genistein uygulamasından sonra 2 saat gibi kısa bir sürede artış gösterdiğini ve bu artışın 48 saate kadar devam ettiğini göstermektedir. A549 hücrelerinde 90 µM genistein

uygulamasý sonucu p53 seviyesinin en yüksek deęerine 12 saat içinde ulařtıęı gösterilmiřtir [Ding *et al.*, 2003].

Genistein uygulamasının p53 fosforilasyon seviyelerinde de doza bağlı artışa sebep olduğu belirlenmiştir. A549 hücrelerine 60 µM ve 90 µM genistein uygulaması p53-ser15 fosforilasyonunda artışa sebep olurken, 30 µM genistein uygulamasında herhangi bir etki gözlenmemiştir [Ding *et al.*, 2003]. p53'ün Ser15 fosforilasyonu Mdm2 ile bağlanma oranını dūřürerek stabilizasyonunu sağlamaktadır [Shieh *et al.*, 1997]. p53 birikimine bağlı olarak hücre döngüsü inhibitörü ve p53'ün hedef genlerinden olan *p21*'in ifadelenme seviyesi ve G2/M hücre döngüsü kontrol noktasında tutuklanan hücre miktarı belirgin bir şekilde artmıştır.

A549 hücreleriyle yapılan deneylerde genistein uygulaması 72 saate kadar incelendiğinde *p53* mRNA seviyelerinde herhangi bir artış görülmemektedir. Bu sonuç genisteinin *p53* transkripsiyonunu arttırıcı bir etkiye değil, degradasyonunu engelleyici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir [Zhu *et al.*, 2015]. Sadece proteinlerin degradasyonunu engellemek amacıyla bir proteozom inhibitörü olan MG-132 verilen A549 hücrelerinde p53 miktarındaki artış genistein uygulanan ve uygulanmayan hücrelerde aynı seviyede geręekleřmiřtir. Bu durum genisteinin p53 seviyesini arttırıcı etkisini protein yıkımını engelleme açısından geręekleřtięini ortaya koymaktadır.

p53 mutant hale getirilmiş A549 hücreleriyle, normal A549 hücrelerinin radyasyon uygulamasına verdiği tepki ölçüldüğünde mutant hücre hattının daha dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı hücrelere radyasyonun yanında genistein uygulaması yapıldığında mutant p53 taşıyan hücreler radyasyon uygulamasına daha duyarlı hale gelirken, p53 yabanıl tip hücrelerde değişiklik gözlenmemiştir [Hermann *et al.*, 2007]. Yabanıl tip p53 taşıyan ve mutant p53'e sahip bronşiyal kanser hücrelerinde radyasyon ve genisteinin beraber uygulanması incelendiğinde p53 yabanıl tip hücrelerde radyasyon uygulamasını takip eden 12 saat içerisinde apoptozun başladığı gösterilmiştir [Stuschke *et al.*, 2002].

Genistein, ER-α negatif meme kanseri hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü p53-p21 proteinlerine bağlı olarak geręekleřtirmektedir [Seo *et al.*, 2011]. 24 saat genistein uygulaması hem normal meme hücrelerinde (MCF-10A) hem de meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) p53 seviyesinde bir artışa sebep olmadan, p-

p53 seviyelerinin artışı sağlamıştır [Seo *et al.*, 2011]. MCF-7 hücrelerine 90 μ M genistein uygulanması 18 ve 24 saat sonunda p53 miktarında bir değişiklik gözlenmezken, 48 saat sonunda p53 seviyesi en yüksek değerine ulaşmıştır [Xu and Loo, 2001]. Bu durum genisteinin p53 seviyelerini arttırma etkisini farklı hücre hatlarında gösterdiğini, ancak etki görülme süresinin hücre tipine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

2.9.4. NSCLC Genistein Uygulamaları

A549 hücrelerine genistein uygulanması kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında hücre büyümesini yavaşlatmıştır. A549 hücre bölünmesindeki bu azalma doz ve zamana bağlı olarak gerçekleşmektedir. Genistein uygulaması 2.5 μ M gibi düşük konsantrasyonlarda hücre bölünmesini baskılayabilmektedir. A549 hücrelerine farklı dozlarda genistein uygulanmasıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, hücre büyümesindeki yavaşlamanın direkt kimyasal uygulanmasıyla bağlantılı olmadığı, azalmanın görülebilmesi için en az 24 saatlik sürenin gerektiği belirlenmiştir. İnkübasyon süresi arttıkça genisteinin inhibisyon etkisi artmakta ama sitotoksitesi değişmemektedir [Andreescue *et al.*, 2004]. Yapılan çalışmada genistein uygulamasının hücreleri G1/S veya G2/M evrelerinde durdurabildiği [Tokalov *et al.*, 2004; Henker *et al.*, 2004] ve uygulanan genistein miktarının kabul edilemez bir sitotoksik etki gözlenmeden 600 mg/gün dozuna kadar çıkarılabildiği belirlenmiştir [Miltyk *et al.*, 2003].

Genistein uygulaması yapılan A549 hücrelerinde zamana bağlı olarak, apoptotik hücre sayısında belirgin artış gözlenmiştir. A549 hücrelerine 48 saat süreyle 40 μ M genistein uygulanması sonucu hücrelerin yaklaşık %53'ü hayatta kalabilmiştir [Peng *et al.*, 2013]. A549 hücrelerine genistein uygulanması sonrası hücre bölünmesindeki en yüksek inhibisyon değeri (%62) 100 μ M genistein uygulandıktan 24 saat sonra elde edilmiş ve IC50 değeri 72 μ M olarak belirlenmiştir [Mukherjee *et al.*, 2010].

Flow sitometrisi analizleri yapılarak genisteinin A549 hücrelerinde hücre döngüsü üzerindeki etkisi ölçülmüştür. Genistein uygulanmayan hücrelerde %71.76

G0/G1, %10.71 S ve %18.17 G2/M değerleri elde edilirken, 75 µM genistein uygulamasında %46.11 G0/G1, %18.20 S ve %35.28 G2/M değerleri, 100 µM genistein uygulandığında ise %21.35 G0/G1, %30.24 S ve %47.92 G2/M değerleri elde edilmiştir [Mukherjee *et al.*, 2010].

Farklı bir çalışmada A549 ve H1299 hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde 90 µM genistein uygulanmış ve hücre bölünmesi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Genistein her iki hücre hattında da hücre bölünmesini inhibe etmiştir. 72 saat sonunda A549 ve H1299 hücre sayıları kontrole oranlandığında sırasıyla %39.6 ve %29.6 olarak belirlenmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubunda G2/M kontrol noktasında bulunan hücre sayısı A549 hücreleri için %13.8, H1299 hücreleri için %2 seviyesindeyken genistein uygulamasıyla sırasıyla %64.7 ve %17.7 oranlarına yükseldiği belirlenmiştir [Ding *et al.*, 2003].

A549 hücrelerine 10-100 µM arası genistein uygulanarak yapılan deneylerde 30 µM ve üzeri dozlarda S fazındaki hücrelerde azalma gözlenirken, G0 fazındaki hücre miktarında anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir. p53 null H1299 hücrelerinde ise 30 µM ve üzeri dozlarda, doza bağlı olarak G0 fazındaki hücre sayısında azalma belirlenmiştir. Her iki hücre hattında da 30-300 µM arası genistein uygulaması yapıldığında G2/M fazındaki hücre sayısında artış gözlenmiştir ve 100 µM genistein uygulamasında her iki hücre hattında da apoptotik hücre sayısında artış gözlenmiştir [Tokalov *et al.*, 2010]. A549 hücrelerine 40 µM genistein uygulanması G0/G1 ve G2/M kontrol noktalarında tutulan hücre sayılarında belirgin bir değişikliğe sebep olmazken, S fazındaki hücre oranının %40'tan %21'e düşmesine yol açmıştır [Zhou *et al.*, 2011].

A549 hücreleriyle yapılan çalışmalarda genisteinin hücre içi mikrotübül ağında bozulmalara sebep olduğu gösterilmiştir. Bu durum genisteinin tübiline bağlanarak mikrotübülün oluşumunu engellemesi yoluyla gerçekleşmektedir. Genistein tübülün polimerizasyonunu doza bağlı olarak inhibe etmektedir. 87 µM genistein uygulaması %50 oranında, 100 µM genistein uygulaması %60 oranında tübülün depolimerizasyonuna yol açmaktadır [Mukherjee *et al.*, 2010]. Genisteinin antiproliferatif etkisinin mikrotübül oluşumunun engellenmesi yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Farklı dozlarda (0-100 µM) genistein uygulamasının 24 saat sonunda A549 hücre morfolojilerine olan etkisi incelendiğinde 25 µM genistein

uygulaması morfolojide hiçbir değişikliğe sebep olmazken, 50 μM ve üstü dozlarda hücre şeklinin bozulmaya başladığı, 100 μM genistein uygulanan hücrelerin hacimlerinin arttığı ve yuvarlaklaştıkları gözlenmiştir. A549 hücrelerinin morfolojisinde gözlenen değişikliklerin yüksek genistein dozlarının mikrotübül depolimerizasyonuna sebep olmasıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir [Mukherjee *et al.*, 2010].

Mikrotübül depolimerizasyonunu engelleyen taxol ajanının 30-100 μM dozları arasında kullanımı β -tübine bağlanma yoluyla, çeşitli kanser hücrelerinde mitozun durdurulmasını ve apoptozu sağlamaktadır [Bhalla, 2003]. A549 ve H1299 hücrelerine taxol uygulanmadan önce genistein uygulaması gerçekleştirildiğinde, genistein uygulamasının p53 pozitif olan A549 hücrelerinin apoptoza gitme oranlarını belirgin bir şekilde düşürdüğü, p53 null olan H1299 hücrelerinde bu koruyucu etkinin görülmediği belirlenmiştir. Her iki hücre hattında da hücre döngüsü kontrol noktalarında yakalanan hücre oranları yalnızca genistein uygulanan hücrelerinkiyle aynı seviyede kalmıştır [Tokalov *et al.*, 2010]. Bu durum genisteinin tübin polimerizasyonunu engelleme aktivitesinin p53'le bağlantılı olabileceğini göstermektedir.

NSCLC hücre hatlarıyla yapılan çalışmada 10 μM genistein uygulamasının A549 hücrelerinde trikostatin-A tarafından uyarılan apoptozu artırırken, normal akciğer fibroblast hücrelerine zarar vermediği belirlenmiştir [Schabath *et al.*, 2005]. TSA histon deasetilaz inhibitörüdür. TSA ve 10 μM genisteinin A549 hücrelerinde beraber kullanımı apoptotik yolağın kontrolünü sağlayan *TNFR-1R*'nin ifadenmesini 6 saat sonunda %37 oranında arttırmaktadır [Baud and Karin, 2001; Changhui *et al.*, 2009]. TSA ile birlikte 10 μM genistein kullanımı apoptoz miktarında artışa neden olmaktadır [Wu *et al.*, 2012].

NF- κB oksidatif stres koşullarında görev alan transkripsiyon faktörüdür ve inflamasyon sitokinlerinin ifadenmesinde rol alır [Haase *et al.*, 2003; Linard *et al.*, 2004]. Multifonksiyonel bir protein olan Ape1/Ref-1, NF- κB 'nin redoks aktivatörü olarak görev yapmaktadır. Ape1/Ref-1 inhibisyonu NF- κB 'nin DNA bağlanma ilgisini azaltırken, Ape1/Ref-1 aşırı ifadenmesi NF- κB aktivasyonu ile bağlantılıdır [Ando *et al.*, 2008; Raffoul *et al.*, 2007]. A549 hücreleriyle yapılan çalışmalarda genisteinin *Ape1/Ref-1* ifadenme miktarını azaltma yoluyla NF- κB aktivitesinde

azalmaya sebep olduğu ve böylece radyasyon tedavisi sonucu gelişen pnömöniyi engellediği belirlenmiştir [Zhou and Mi, 2005]. Akciğer dokusuna radyasyon uygulanan farelerde tümör nodüllerinin küçüldüğü, bağışıklık hücrelerinin tümör bölgesinde artış gösterdiği, kanser hücrelerinde çok sayıda küçük vakuol oluştuğu görülmüştür. Radyasyonla beraber soya özütü verilen farelerin çoğunda gözlenebilen bir tümör nodülü bulunmamaktadır, varolan az sayıda nodülde de büyük vakuoller içeren zarar görmüş kanser hücreleri yer almaktadır. A549 hücrelerine soya özütü uygulanması sonucu anormal derecede büyük ve çok çekirdekli tümör hücreleri oluşmuş, tümör nodülleri içerisine sızan bağışıklık sistemi hücrelerinde belirgin artış gözlenmiştir [Hillman *et al.*, 2011]. A549 hücrelerinde radyasyon uygulamasından sonra hücre içi ROS seviyeleri hızlıca artarken, genistein uygulaması artan ROS seviyelerinin hızlıca düşmesini sağlamıştır. Radyasyon uygulamasından 24 saat önce genistein verilen hücrelerle 3 gün sonunda yapılan western blot analizi Ape1/Ref-1 seviyelerinin radyasyon verilen hücreden düşük olmasının yanında normal hücrelerin Ape/Ref-1 seviyelerinden de düşük olduğunu göstermiştir. A549 hücrelerinde radyasyon uygulaması sonucu *NF-κB* ifadenmesinde artış gözlenmiştir. Radyasyon uygulamasından 24 saat önce genistein uygulamasıyla bu hücrelerdeki *NF-κB* seviyesi en düşük değerine ulaşmıştır [Liu *et al.*, 2014].

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

RPMI-1640 medium (Sigma R6504), RPMI-1640 medium (Sigma R8755), Fetal Bovine Serum (FBS), %0.5 1X Trypsin-EDTA (fenol red içermeyen), % 0.25 1X Trypsin-EDTA (Thermo Scientific), Penicillin-streptomycin (Gibco), 1X PBS (Gibco). Genistein (G6649) Sigma'dan alınmıştır. DMSO kullanılarak 50 mM genistein stok solüsyonları hazırlanmış, tüpler alüminyum folyoyle sarılarak -20 C'de saklanmıştır. Rabbit polyclonal anti IGF-1R β , mouse monoclonal anti-p53 antibody, mouse polyclonal anti- β -actin antibody, anti-rabbit secondary IgG-HRP antibody, anti-mouse secondary IgG-HRP antibody (SantaCruz). TurboFect transfection reagent (Fermentas), XtremeGENE siRNA transfection reagent (04476093001, Roche), Dual-Luciferase reporter assay system (E1910, Invitrogen), GeneJet RNA isolation kit (Thermo Scientific), Maxima H minus First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific), BCA protein assay kit (Thermo Scientific), Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermantas), p53 siRNA, Control siRNA (FITC Conjugate), DMSO (Sigma-Aldrich, D5879), ECL plus (Pierce), Ethidium bromide, charcoal (Sigma, C6241), agarose (Sigma, A9539), non fat dry milk, PMSF (Applchem, A0999), aprotinin (Applchem, A2132), leupeptin (Sigma, L2023), pepstatin A (Applchem, A2205), Akrilamit/bisakrilamit (Biorad), PVDF transfer membrane (Pierce), Blue prestained molecular weight marker (Thermo Scientific).

3.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler

CO₂ inkübatörü, Laminar kabin, Işık mikroskobu (Nikon TMS), Floresans mikroskobu (Nikon, Eclipse Ti-S), plate reader (Thermo, Varioskan Flash), dikey elektroforez ve transfer sistemi (BioRad Mini Protean), soğutmalı santrifüj

(Beckman Coulter 22R), mikrosantrifüj (Beckman Coulter, Microfuge16), santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-22), inkübatör (BioSan, ES-20), RT-PCR (Roche, LC480II), jel görüntüleme sistemi (BioRad, ChemiDoc XRS+), sıvı azot tankı (Arpege 140), -80°C dondurucu, ısıtıcı blok (VWR), manyetik karıştırıcı (Heidolph), su banyosu, hassas terazi (Precisa) otoklav (Hirayama, HVE-50), pH metre (Mettler Toledo) cam malzemeler (Isolab). LightCycler 480 Multiwell 384 kuyulu beyaz plateler (04729749001) Roche'dan temin edilmiştir. F96 Micro 96 kuyulu beyaz plateler (NC-136101) Nunc ürünüdür. Microsantrifüj ve PCR tüpleri Axygen'den satın alınmıştır. 6, 12, 96 kuyulu plateler TPP ürünüdür. 100 mm x 20 mm boyutlu, hücre kültürü petripleri BD Biosciences ürünüdür.

3.1.3 Hücre Hatları

NSCLC hücre hatları A549 ve H1299, Doç. Dr. Asuman D. Zergeroğlu (GTÜ) tarafından hediye edilmiştir. IGF-1R regülasyonunda p53'ün rolünün belirlenebilmesi için yabancıl tip *p53* taşıyan A549 hücreleri kullanılmıştır. H1299 hücrelerinde ise *p53* delesyon olduğundan bu hücreler dış kontrol olarak kullanılmıştır. A549 hücreleri mutant *KRAS* genotipine, H1299 hücreleri *NRAS* mutant genotipe sahiptir. Her iki hücre hattında da *IGF-1R* aşırı ifadenmektedir. A549 hücreleri ek olarak *CDKN2A* delesyonu taşıdığından bu hücrelerde p14 ve p16 proteinleri üretilmez.

3.1.4. Kullanılan Solüsyonlar

Hücre Dondurma Solüsyonu: A549 ve H1299 hücrelerini sıvı azot ve -80°C dondurucuda saklayabilmek için; FBS içerisine %5 (v/v) olacak şekilde DMSO eklenerek -20°C'de saklanmıştır.

10X SDS Yürütme Tamponu: 30.3 g Tris base, 144.1 g glisin ve 10 g SDS toplam hacim 1L olacak şekilde dH₂O içerisinde çözümüştür. Kullanılmadan önce dH₂O ile 1:10 oranında seyreltilmiştir.

10X Transfer Tamponu: 28.1 g Tris base, 131 g glisin toplam hacim 1L olacak şekilde dH₂O içerisinde çözümüştür.

1X Transfer Tamponu: %10 10X transfer tamponu, %20 metanol ve %70 dH₂O olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır. 1L 1X transfer tamponu hazırlamak için; 100 ml 10X transfer tamponu + 200 ml methanol + 700 ml dH₂O kullanılmıştır.

4X SDS Yükleme Tamponu: 2.4 ml Tris-HCl (1M, pH 6.8), 0.8 g SDS, 4 ml gliserol (%100), %0.01 (w/v) bromophenol blue, 1 ml β-mercaptoethanol, 2.8 ml dH₂O eklenerek homojen hale gelene kadar karıştırılmış ve alüminyum folyoyla sarılarak -20°C'de saklanmıştır.

10X TBS: 0.2 M Tris (pH 7.5) ve 1.5 M NaCl final konsantrasyonları olacak şekilde dH₂O eklenerek son hacim 1L ye tamamlanmıştır.

1X TBS-T: 10X TBS tamponu 1:10 oranında seyreltilerek 1X TBS hazırlanmıştır. 1X TBS içerisine %0.1 (v/v) olacak şekilde Tween 20 eklenmiştir.

Membran Bloklama Solüsyonu: Hacmen %5 olacak şekilde yağsız kuru süt tozu 1X TBS-T içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Tris-HCl Çözeltileri: SDS-Poliakrilamid jel hazırlanırken kullanılmak üzere iki farklı Tris-HCl çözeltisi hazırlanmıştır. Belirlenen bir hacimde final konsantrasyonları 1.5 M ve 0.5 M olacak şekilde Tris tartılarak bir miktar dH₂O ile çözülmüştür. 12.2 M HCl kullanılarak 1.5 M'lık Tris'in pH değeri 8.8'e, 0.5 M'lık Tris'in pH değeri 6.8'e ayarlanmıştır. Çözeltiler dH₂O kullanılarak son hacmine tamamlanmıştır.

Hücre Liziz Tamponu: Kullanılacak hacimde final konsantrasyonları 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, %10 gliserol, %1 Triton-X 100 olacak şekilde kimyasallar dH₂O içerisinde çözülür. Kullanımdan hemen önce 10 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 1 nM Pepstatin , 1 mM PMSF olacak şekilde proteaz inhibitörleri eklenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Genisteinin IGF-1R regülasyonunda aldığı rolün anlaşılabilmesi için NSCLC hücreleri A549 ve H1299 kullanılmıştır. Her iki hücre hattı da RPMI-1640, %10

FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 sodyum pirüvat, 4.5 g/L glukoz, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 25 mM HEPES içeren besiyerlerinde, %5 CO₂ ve 37°C ortam koşullarında büyütülmüştür.

Hücrelere genistein uygulaması yapılırken stok solüsyonları besiyeri kullanılarak 10³ kat seyreltilmiştir. Genistein örneklerindeki final DMSO konsantrasyonu %0.1'e düştüğünden kontrol hücrelerine de %0.1 DMSO uygulanmıştır.

Genisteinin IGF-1R üzerindeki etkisinin östrojenin kimyasal yapısına olan benzerliğinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Hücreler üzerinde sadece genistein kaynaklı etkinin görülebilmesi için besiyeri ortamından östrojen ve benzeri hormonların etkisini gösterebilecek bütün kimyasalların uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla östrojene benzeyen etki gösterdiği bilindiği için fenol red içermeyen RPMI kullanılarak besiyerleri hazırlanmıştır. Aynı zamanda deneyler sırasında kullanılan tripsinde de fenol red bulunmamaktadır. FBS içerisindeki hormon içeriğini uzaklaştırmak için de charcoal uygulaması yapılmıştır. 50 ml FBS için 1 g charcoal kullanılarak, soğuk odada (+4°C) gece boyu 160 rpm de çalkalanmış, daha sonra 2000 rpm de 40 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu üst kısımdaki FBS dikkatli bir şekilde alınmış ve kullanılarak antibiyotik içeren ve içermeyen fenol redsiz iki farklı besiyeri hazırlanmıştır. Antibiyotik içermeyen besiyeri siRNA transfeksiyonu sırasında kullanılmıştır.

3.2.1.1. Hücre Ekimi

A549 ve H1299 hücre hatlarının ekimi sırasında ATCC'de (American Type Culture Collection) yer alan protokol uygulanmıştır. Besiyeri 20 dk 37°C'de su banyosunda bekletilerek hücre ekimine uygun pH (7.2-7.4) ve ısıya gelmesi sağlanmıştır. Stoktan alınan hücreler hızlı bir şekilde 37°C'de su banyosuna konulmuş yaklaşık 1 dk bekletilerek erimesi sağlanmıştır. Hücreler dondurulurken kullanılan DMSO'yu ortamdan uzaklaştırmak amacıyla tüp içerisindeki süspansiyon bir miktar besiyerine aktarıldıktan sonra 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant çekilmiştir. Pelet besiyerinde çözülerek 3 adet 25 cm²'lik flaska eşit

olarak paylaştırılmıştır. Hücrelerin yüzeye dağılımı kontrol edildikten sonra inkübatöre konularak pasajlanana kadar 37°C'de inkübe edilmiştir.

3.2.1.2. Alt Kültürleme

A549 ve H1299 hücreleri 4 günde bir olacak şekilde pasajlanmıştır. Hücre ekimi ve pasajlanması arasında besiyeri değiştirilmemiştir. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 1X Trypsin-EDTA kullanılarak kalkması beklenmiş, üzerlerine 1:5 oranında besiyeri eklenerek tripsinin etkinliği azaltılmıştır. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra peletler taze besiyerinde çözülmüş ve A549 hücreleri 1:3 oranında, H1299 hücreleri 1:4 oranında bölünerek 75 cm²'lik flasklara ekilmiştir.

2.2.1.3. Hücre Stoklama

Hücreler, pasajlamadaki protokole uygun olarak kaldırıldıktan sonra elde edilen pelet üzerine her 1 ml'ye 1x10⁶ hücre denk gelecek şekilde dondurma solüsyonu eklenerek süspanse edilmiştir. Solüsyon önceden etiketlenmiş kriyo tüplere eşit bir şekilde paylaştırılmış ve tüpler hızlı bir şekilde buza alınmıştır. Daha sonra -80°C soğutucuya ya da -196°C sıvı azot tankına kaldırılarak uzun dönem saklanması amaçlanmıştır.

3.2.2. Hücre Transfeksiyonu

3.2.2.1. siRNA Transfeksiyonu

p53'ün IGF-1R'nin genisteinle olan regülasyonunda rol alıp almadığını anlamak için yabanıl tip *p53* taşıyan A549 hücrelerine *p53* siRNA'sı aktarılması amaçlanmıştır. Hücre ekimi gerçekleştirildikten 20-22 saat sonra ortamın besiyeri antibiyotik ve fenol red içermeyen ve CT-FBS kullanılarak hazırlanmış besiyeriyle değiştirilmiştir. siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmeden önce hücrelerin %55-70 yoğunluğunda ve düzgün dağılmış olmalarına dikkat edilmiştir. Transfeksiyon mix

hazırlanmadan önce, transfeksiyon besiyeri, XtremeGene siRNA transfeksiyon ajanı ve kullanılacak siRNA'lar oda sıcaklığına getirilmiştir. Karışımlar hazırlanırken transfeksiyon besiyerinin içine sırasıyla siRNA ve transfeksiyon ajanı eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Hazırlanan mixler hücrelere besiyeri yüzeyinin hemen altından eklenmiş ve 37°C'de 18-20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda besiyeri fenol red içermeyen, antibiyotik ve CT-FBS kullanılarak hazırlanmış besiyeriyle değiştirilmiştir. 2-3 saat inkübasyondan sonra genistein içeren besiyerleriyle değiştirilerek 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda kontrol siRNA'sıyla transfekte edilen hücrelerin floresans mikroskobuyla görüntüleri alınmıştır.

3.2.2.2. Plazmid Transfeksiyonu

Genisteinin *IGF-1R* promotörüne olan transkripsiyon düzeyindeki etkisini belirlemek için pGL3 lusiferaz raportör vektörleri kullanılmıştır. Kullanılan vektörler farklı promotör bölgelerini içermektedir; sıçan full-length (-476/+641 - RF), sıçan 5' flanking (-476/+41 - 5F), sıçan 5'UTR (-41/+641 - 5U), insan full-length (-548/+570 - HF). Boş vektör pGL3 negatif kontrol olarak kullanılırken, pRLTK vektörü kalibratör olarak kullanılmıştır.

Plazmit transfeksiyonu için 96 well platelere her kuyuya 1×10^4 hücre düşecek şekilde 0.1 ml fenol red içermeyen, antibiyotik ve CT-FBS kullanılarak hazırlanmış besiyeri kullanılarak ekilmiştir. Hücreler yaklaşık %70 yoğunluğa ulaştıklarında besiyerleri antibiyotiksiz besiyeriyle değiştirilmiştir. Transfeksiyon besiyerine sırasıyla plazmid ve TurboFect transfeksiyon ajanı eklenerek transfeksiyon karışımları hazırlanmış ve 30 dk inkübe edilmiştir. Hazırlanan karışımlar besiyeri yüzeyinin hemen altından verildikten sonra hücreler 37°C'de 18-20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda besiyeri, fenol red içermeyen, antibiyotikli ve CT-FBS kullanılarak hazırlanmış besiyeriyle değiştirilmiştir. 2-3 saat inkübasyondan sonra genistein içeren besiyerleriyle değiştirilerek 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda plazmitlerle transfekte edilen hücrelerin floresans mikroskobuyla görüntüleri alınmıştır.

3.2.3. Total RNA İzolasyonu

Hücrelerde gerçekleştirilen transfeksiyon ve genistein uygulamalarının sonucunda *IGF-1R*, *EGFR* ve *p53* mRNA seviyelerindeki değişimlerin RT-qPCR yapılarak incelenebilmesi için total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Genistein uygulamasından 24 saat sonra hücrelerden besiyeri uzaklaştırılmış, 1X PBS ile yıkanmış ve fenol red içermeyen 1X Tripsin eklenerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Tripsinin etkisini azaltmak amacıyla 1:5 oranında besiyeri eklenmiş ve hücreler 1500 rpm de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Pelet üzerine 600 µl liziz tamponu eklenerek vortekslenmiş ve hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Total RNA, GeneJet RNA izolasyon kiti (Thermo Scientific) protokolüne uygun olarak saflaştırılmış ve -80°C'de saklanmıştır. Total RNA'nın konsantrasyon ve saflık değerleri Nanodrop kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.4. cDNA Sentezi

cDNA sentezi 100 ng total RNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Stok RNA'lar konsantrasyon 20 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiş ve her reaksiyon için 5 µl RNA kullanılmıştır. Hazırlanan her reaksiyon karışımının içine sırasıyla RNA, 0.125 µl random hexamer primer, 0.5 µl 10 mM dNTP mix, 11.875 µl nükleaz içermeyen su, 2 µl 5X RT buffer ve 0.5 µl Maxima H Minus Enzyme mix eklenmiş ve karışım yavaşça karıştırılmıştır. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 15 dk 50°C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyonu sonlandırmak için 85°C'de 5 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. cDNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.5. RT-qPCR

RT-qPCR reaksiyonları Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genistein uygulaması yapılan A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde *IGF-1R*, *EGFR*, *p53* genlerinin mRNA seviyeleri belirlenmiştir. Referans gen olarak β -Aktin ($ACT\beta$) ve gliseraldehid 3-fosfat

dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmıştır. Her bir kuyu için 5 µl SYBR Green (2X), 0.3 µM forward primer, 0.3 µM reverse primer içerecek şekilde her bir gen için mixler hazırlanmış ve her kuyuya 8 µl konulacak şekilde nükleaz içermeyen su eklenerek son hacim tamamlanmıştır. Karışımlar her kuyuya paylaştırıldıktan sonra 20 kat seyreltilmiş cDNA örneklerinin her birinden 2 µl eklenerek son hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. Kontaminasyon kaynaklı hataların belirlenmesi için cDNA içermeyen negatif kontroller kullanılarak da PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR, LightCycler 480 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar $\Delta\Delta C_T$ metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Aktin ve GAPDH değerleri kullanılarak sonuçların normalizasyonu gerçekleştirilmiş ve kontrol hücre grubuna göre değişimleri grafik olarak gösterilmiştir. Değerlerin standart sapma değerleri ve istatistiksel analizleri ANOVA yöntemi ile değerlendirilmiştir.

3.2.6. Protein İzolasyonu

24 saatlik genistein uygulaması sonucunda hücre gruplarında IGF-1R ve p53 protein seviyelerindeki değişimin belirlenebilmesi için protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücreler besiyeri çekildikten sonra hızlı bir şekilde iki defa soğuk 1X PBS kullanılarak yıkanmış, 200 µl 1X PBS kullanılarak yüzeyden kazınmıştır. Hücreler mikrosantrifüj tüplerine aktararak 5000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 100 µl liziz bufferda çözülmüş, 15 kez enjektörden geçirildikten sonra 15 dk buz üstünde bekletilmiştir. Hücreler 4°C'de 14000 g'de 15 dk santrifüj edilmiş, üstte kalan sıvı pelet dağıtılmadan alınarak yeni tüpe aktarılmıştır. BCA protein assay kullanılarak örneklerdeki protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Proteinler -80°C'de saklanmıştır.

3.2.7. SDS-PAGE ve Western Blotting

IGF-1R ve p53 protein seviyelerinin belirlenebilmesi için protein örnekleri SDS-PAGE jeline yüklenerek ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmış, daha sonra da

Western blotlama yapılarak protein miktarlarındaki değişim belirlenmiştir. Her örnekten 15 µg protein içerecek miktarda alınmış ve son hacim Tris (pH:6.8) kullanılarak 15 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler üzerine 5 µl 4X yükleme tamponu eklenerek karıştırılmış, denatürasyonu sağlamak için 5 dk 95°C'de inkübe edilmiştir. Buza alınan örnekler kuyulara yüklenmiş, seperating jele geçene kadar 90 V'de 20 dk yürütülmüş, sonra akım 120 V'ye çıkarılarak 1,5 saat daha yürütülmüştür. Jel üzerindeki proteinlerin PVDF membrana aktarılması da 120 V akımda 1,5 saatte gerçekleştirilmiştir. Membran 1X TBS-T içerisinde 2 dk bekletildikten sonra %5 yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T içerisine alınıp 100 rpm'de 1 saat çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bloklama sonunda 5-10-5 dk sürelerle 1X TBS-T ile yıkama işlemi yapılmıştır. Bloklama solüsyonu içerisinde belirlenen oranda seyreltilmiş olan primer antikor membran üzerine eklenerek +4 C'de 160 rpm de 16-18 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda 1X TBS-T kullanılarak 5-10-5 dk yıkama gerçekleştirilmiş ve bloklama solüsyonu içerisinde belirlenen oranda seyreltilmiş sekonder antikor eklenerek +4 C'de 160 rpm'de 2 saat inkübe edilmiştir. Sekonder antikor uygulamasının ardından 1X TBS-T ile 5-10-5 dk yıkama gerçekleştirilmiş ve membran üzerine ECL solüsyonu eklenerek karanlık ortamda 5 dk inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda ChemiDoc XRS+ cihazı kullanılarak proteinlerin ve karşılaştırma yapmak için yüklenen marker proteinin görüntüleri alınmıştır. Alınan görüntüler ImageLab programı kullanılarak incelenmiş ve proteinlerin kalitatif analizi gerçekleştirilmiştir. Referans proteini olarak β-aktin kullanılmış ve diğer proteinlerin bant yoğunlukları β-aktin bant yoğunluklarına bölünerek normalizasyon gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Dual Lusiferaz Raportör Testi

Hücrelerde genistein uygulamasının *IGF-1R* promotörünün regülasyonundaki rolünü belirlemek için hücrelere farklı promotör bölgeleri içeren plazmit aktarımı gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylerde 40:1 pGL3-pRLTK oranı kullanılmıştır. Kontrol olarak da herhangi bir vektör içermeyen pGL3 basic kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon sonrası 24 saat genistein uygulanmış

hücreler besiyerleri çekildikten sonra 1X PBS ile yıkanmış ve her kuyuya 20 µl 1X Passive Lysis Buffer eklenmiştir. 15 dk 80 rpm de inkübe edildikten sonra hücreler kuyulardan çekilerek F96 Micro 96 well beyaz platelere aktarılmıştır. Lusiferaz enzim aktivite ölçümleri Varioskan Flash Multimode okuyucuda gerçekleştirilmiştir. Her kuyuya 100 µl LARII eklenerek pGL3 kaynaklı firefly lusiferaz aktivitesi ölçülmüş, ardından 100 µl Stop&Glo eklenerek firefly kaynaklı lusiferaz aktivitesi durdurulmuş ve pRLTK kaynaklı renilla lusiferaz aktivitesi ölçülmüştür. Her bir enzim aktivitesinin ölçülme periyodu 5 saniyedir. Transfeksiyon etkinliğindeki farklılıklardan kaynaklanacak hatalı hesaplamaları engellemek için her kuyudan elde edilen lusiferaz aktivasyon değerleri aynı kuyudaki bazal protein seviyesini gösteren renilla aktivasyon değerine bölünerek sonuçlar normalize edilmiştir.

4. BULGULAR

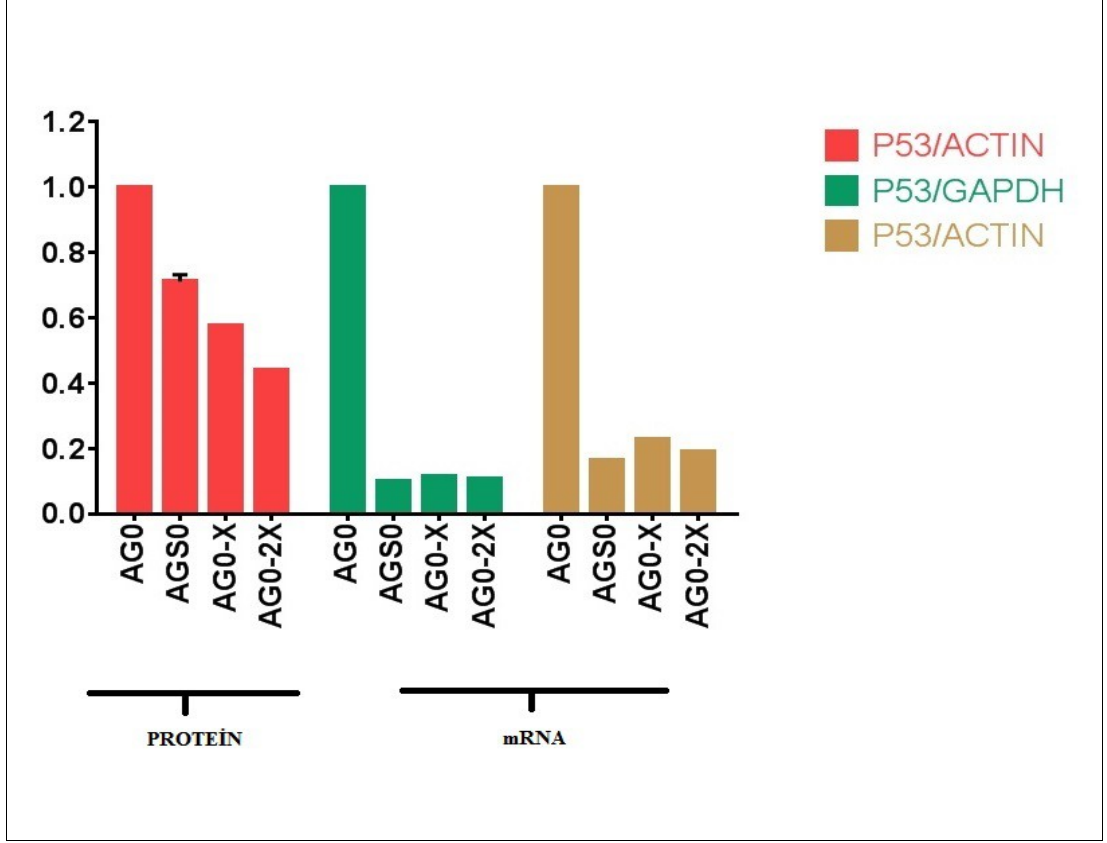
4.1. siRNA Transfeksiyonu

IGF-1R'nin genisteinin farklı dozlarıyla regülasyonunda p53'ün rolünün belirlenmesi için yabancı tip *p53* içeren A549 hücrelerinde siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir (AGS0). p53 baskılanmasını etkin bir şekilde görebilmek için farklı siRNA : transfeksiyon ajanı oranları kullanılarak (1:10, 1:6, 1:5, 1:2) hücreler transfekte edilmiştir. Transfeksiyonun etkisi protein ve mRNA seviyelerinde belirlenmiştir (Şekil 4.1).

1:10 oranıyla siRNA transfeksiyonu yapıldığında p53 protein seviyelerinde azalma gözlenmezken, 1:6, 1:5 ve 1:2 oranlarında transfeksiyon yapıldığında kontrol hücrelerinde p53 protein miktarlarında azalma belirlenmiştir. 1:6 ve 1:5 oranlarında transfeksiyon yapıldığında protein miktarlarında sırasıyla %25 ve %30 azalma gerçekleşmiştir. İki uygulama arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

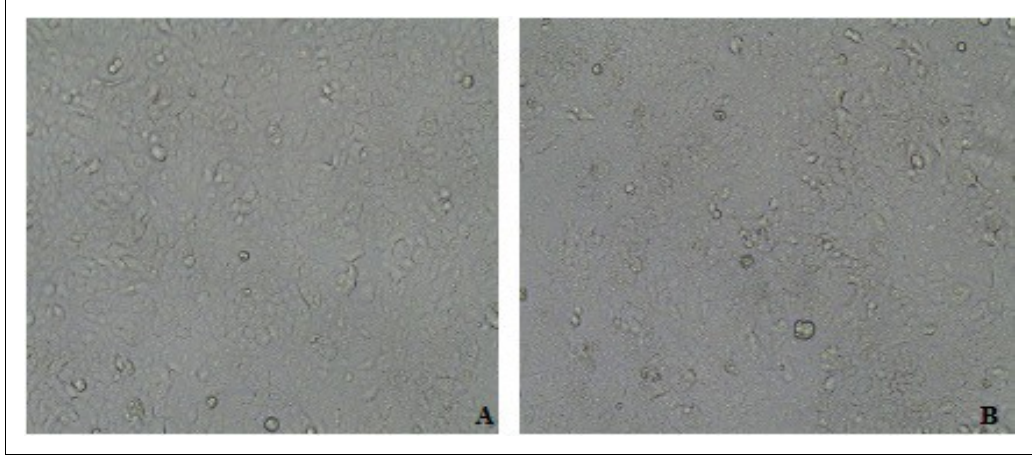
1:2 oranında transfeksiyon yapılırken, kullanılan transfeksiyon ajanı miktarının da transfeksiyona olan etkisini anlamak için iki farklı transfeksiyon karışımı hazırlanmıştır. 1:2 oranı sabit tutulmak kaydıyla kullanılan transfeksiyon ajanı miktarı yarıya düşürülmüştür (1:2-2X ve 1:2-X). p53 protein seviyelerinde azalma sırasıyla %56 ve %43 olarak belirlenmiştir. İki uygulama arasında anlamlı farklılık vardır.

siRNA transfeksiyonunun mRNA seviyelerine olan etkisini belirlemek için aynı oranlarla transfeksiyon gerçekleştirilen örneklerden sentezlenen cDNA'lar kullanılarak RT-qPCR yapılmıştır. 1:10 oranında transfeksiyon yapıldığında protein seviyeleriyle uyumlu olarak mRNA seviyelerinde de herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. 1:6 oranında transfeksiyon yapılan hücrelerde *p53* mRNA seviyelerinde kontrole göre yaklaşık %20 azalma görülmüştür. 1:5, 1:2-X ve 1:2-2X oranları için mRNA seviyelerindeki baskılanma oranları sırasıyla %90, %89 ve %90 olarak belirlenmiştir. Yapılan deneylerde mRNA seviyelerindeki düşüşün aynı olması ve sitotoksitenin düşük olması sebebiyle 1:5 oranı kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı siRNA: transfeksiyon ajanı oranlarının p53 protein ve mRNA seviyeleri üzerindeki etkisi (AGS0; 1:5, AG0-X, AG0-2X; 1:2).

1:5 oranında siRNA transfeksiyonuyla p53 seviyeleri azaltılan hücrelerle kontrol hücreleri arasında 24 saat sonunda büyüklük ve sayı bakımından herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. A) Kontrol A549 hücreleri (AG0) ve B) p53 siRNA transfeksiyonu (1:5) yapılan hücrelerin (AGS0) karşılaştırılması (20X).

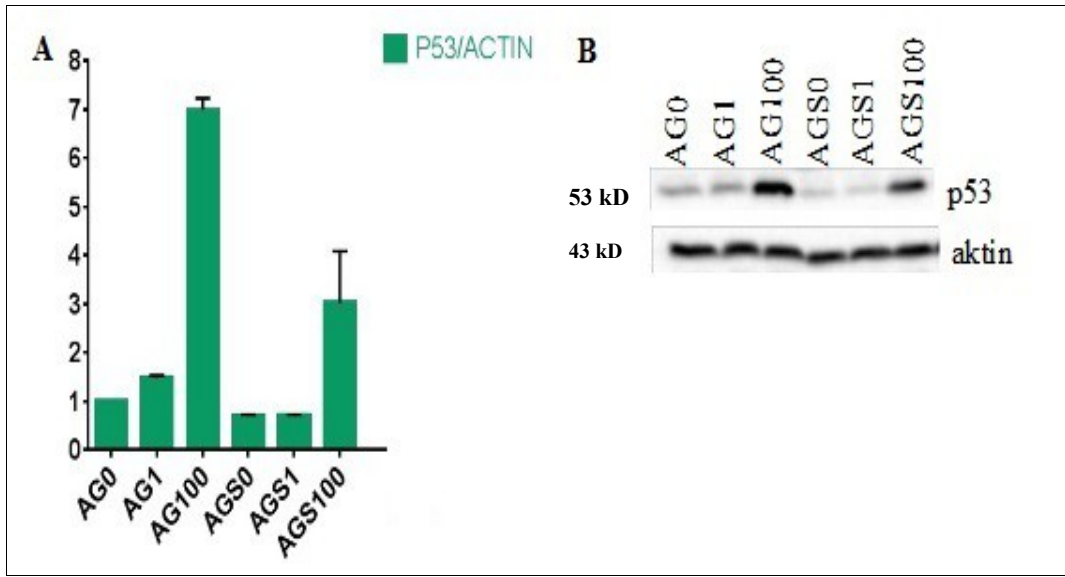
4.2. Genisteinin IGF-1R proteinini doza bağlı regülasyonunda p53 etkisinin incelenmesi

A549 ve H1299 hücreleri *IGF-1R* aşırı ifadelenen hücrelerdir. Literatürde bu hücre hatlarında genistein uygulaması sonucu IGF-1R regülasyonunu inceleyen bir yayın bulunmamaktadır. Yapılan deneylerde A549 ve H1299 hücrelerinde genisteinle IGF-1R regülasyonu incelenmiş ve bu regülasyonda p53'ün rolü anlaşılmaya çalışılmıştır. A549 hücrelerinde p53 miktarının siRNA transfeksiyonuyla azalması sağlanmış ve IGF-1R miktarları kontrol grubuyla karşılaştırılarak p53'ün regülasyondaki rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. H1299 hücreleri ise p53 içermediğinden IGF-1R'nin sadece genisteine bağlı regülasyonunu anlamak için kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Hücrelerin normal p53 seviyelerini ve kullanılan genistein dozuna bağlı değişimlerini belirlemek için genistein uygulamasından 24 saat sonra protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. 1 μ M genistein uygulamasıyla A549 hücrelerinde (AG1) p53 protein seviyesi %50 artarken, 100 μ M genistein uygulamasında (AG100) kontrole göre 6 kat artış belirlenmiştir.

Hücrelerde siRNA transfeksiyonu sonucu p53 protein seviyelerinin azaldığını göstermek amacıyla transfekte edilen hücrelerde de western blotting yöntemiyle p53 protein seviyeleri incelenmiştir. Kontrol DMSO (AGS0) ve 1 μ M genistein

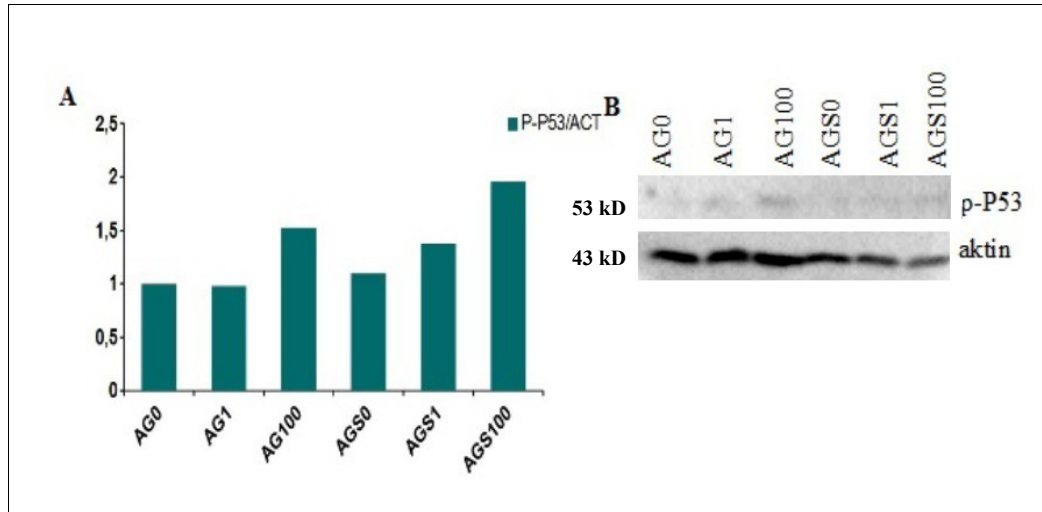
uygulanan hücrelerde (AGS1) p53 protein seviyeleri %30 oranında azalmıştır. 100 μ M genistein uygulanan hücrelerde (AGS100) ise p53 seviyesi kontrole göre 2 kat artmıştır. 100 μ M genistein uygulanan kontrol hücrelerinde 6 kat artış varken, transfekte edilen hücrelerde 2 kat artış görülmesi siRNA transfeksiyonunun bu hücrelerde de gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak genistein p53 protein stabilizasyonunu sağladığı için protein miktarları kontrole göre yüksek seviyede görülmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. A) A549 hücrelerine genistein uygulanması sonucu p53 protein miktarındaki değişiklik. B) A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin farklı genistein dozlarında p53 miktarlarını gösteren poliakrilamid jel görüntüleri.

Genistein uygulamasına bağlı olarak p53 miktarında gerçekleşen artışın p-p53 oranlarına olan etkisini belirlemek için western blot yapılarak p-p53 miktarları ölçülmüştür. A549 hücrelerinde *CDKN2A* geninde delesyon olması p14 proteinin üretimini engellemektedir. P14 proteini Mdm2 miktarını kontrol altında tutarak p53 fosforilasyonunun gerçekleşmesini sağlamaktadır. A549 hücrelerinde p14 olmaması p-p53 seviyelerinin çok düşük olmasına neden olmaktadır. Yapılan deneylerde genistein uygulamasına bağlı olarak p53 seviyesinde görülen artışın da p-p53 miktarında artışa yol açtığı belirlenmiştir. AG100 hücrelerinde %50'lik, AGS100 hücrelerinde ise %95'lik artış gerçekleşmiştir. Artış görülmesine rağmen hücrelerin p-p53 miktarının çok düşük olduğu poliakrilamid jelden alınan görüntülerde de

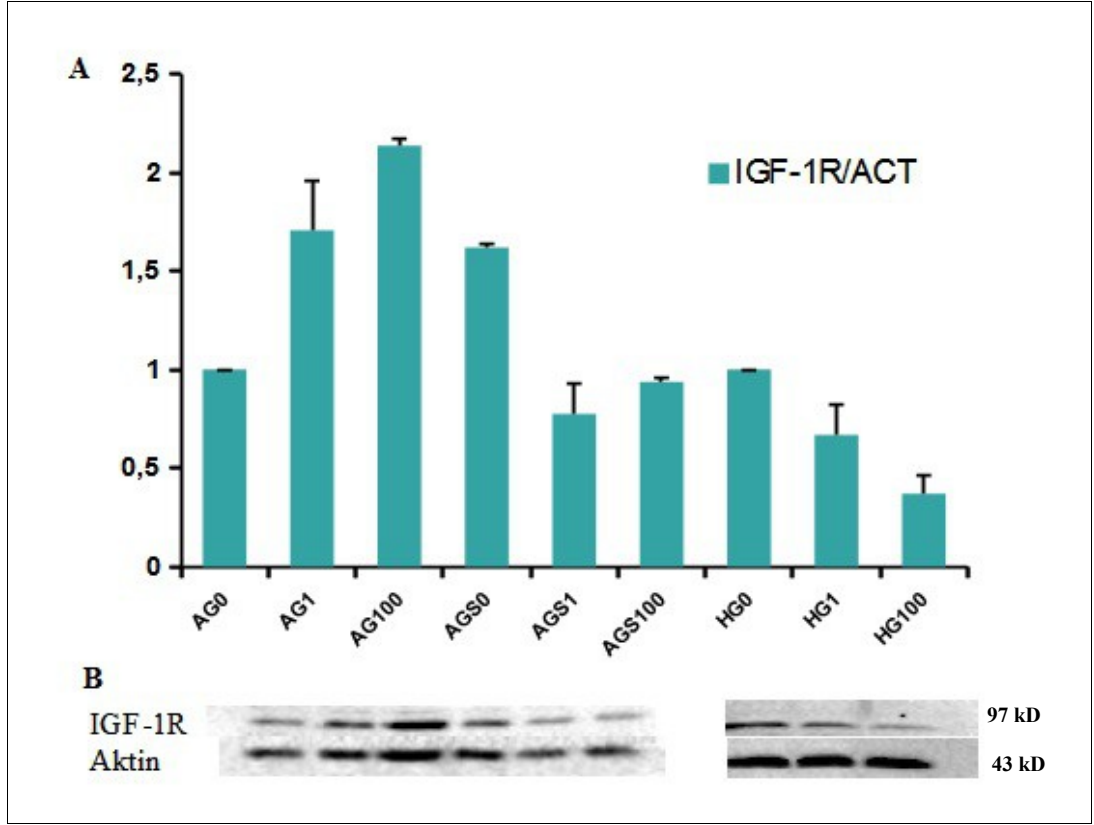
belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin farklı genistein dozlarında p-p53 miktarlarını gösteren A) protein miktarlarındaki değişiklik grafiği, B) poliakrilamid jel görüntüleri.

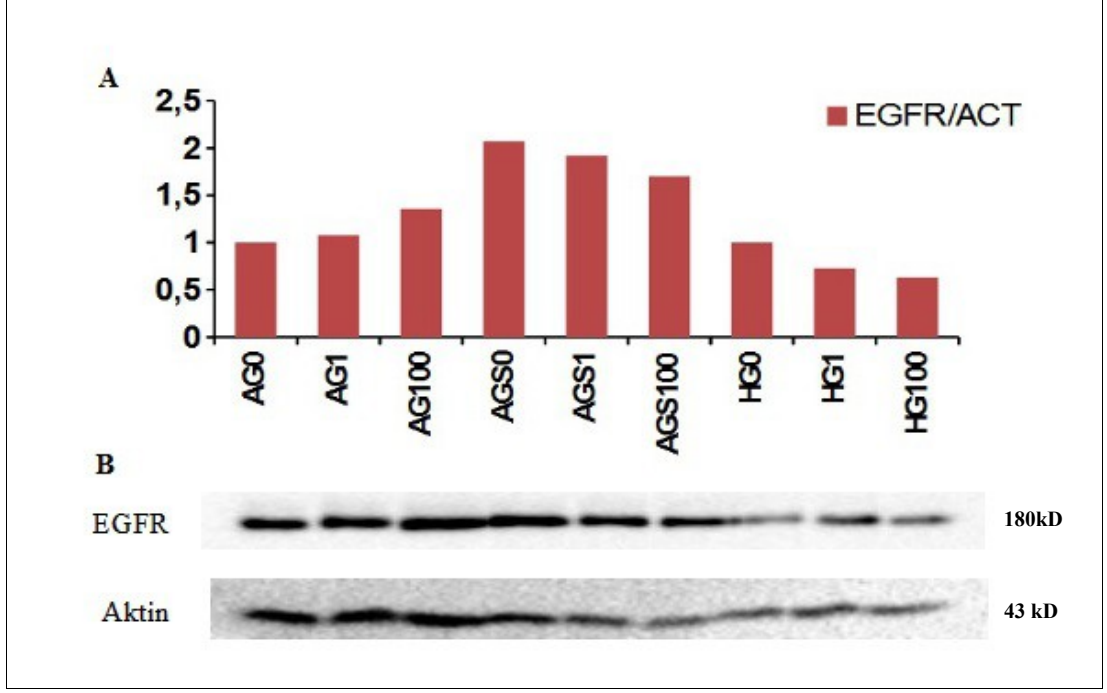
A549 ve H1299 hücrelerinde IGF-1R protein seviyesinin genistein uygulamasına bağlı olarak değişim seviyeleri incelenmiştir. A549 hücrelerinde genistein dozuna bağlı olarak IGF-1R protein seviyelerinde artış görülmektedir. 1 μ M genistein kullanıldığında %70 artış, 100 μ M genistein kullanıldığında ise %110'luk bir artış belirlenmiştir. Hücreler p53 siRNası kullanılarak transfekte edildiğinde ise kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında %65'lik bir artış görülmektedir. 1 μ M genistein uygulamasında, transfekte edilmeyen hücelere göre IGF-1R protein miktarında %20'lik bir azalma görülmektedir. 100 μ M genistein uygulanan hücrelerde ise 24 saatin sonunda kontrol hücrelerine göre protein miktarında bir değişiklik gözlenmemiştir.

H1299 hücrelerinde ise IGF-1R miktarı 1 μ M genistein uygulandığında (HG1) kontrole (HG0) göre %30 azalma gösterirken, 100 μ M genistein uygulandığında (HG100) baskılanma oranı %60'a yükselmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. A) A549 ve H1299 hücrelerine genistein uygulanması sonucu IGF-1R protein miktarındaki değişiklik. B) A549 ve H1299 hücrelerinde farklı genistein dozlarında IGF-1R miktarlarını gösteren poliakrilamid jel görüntüleri.

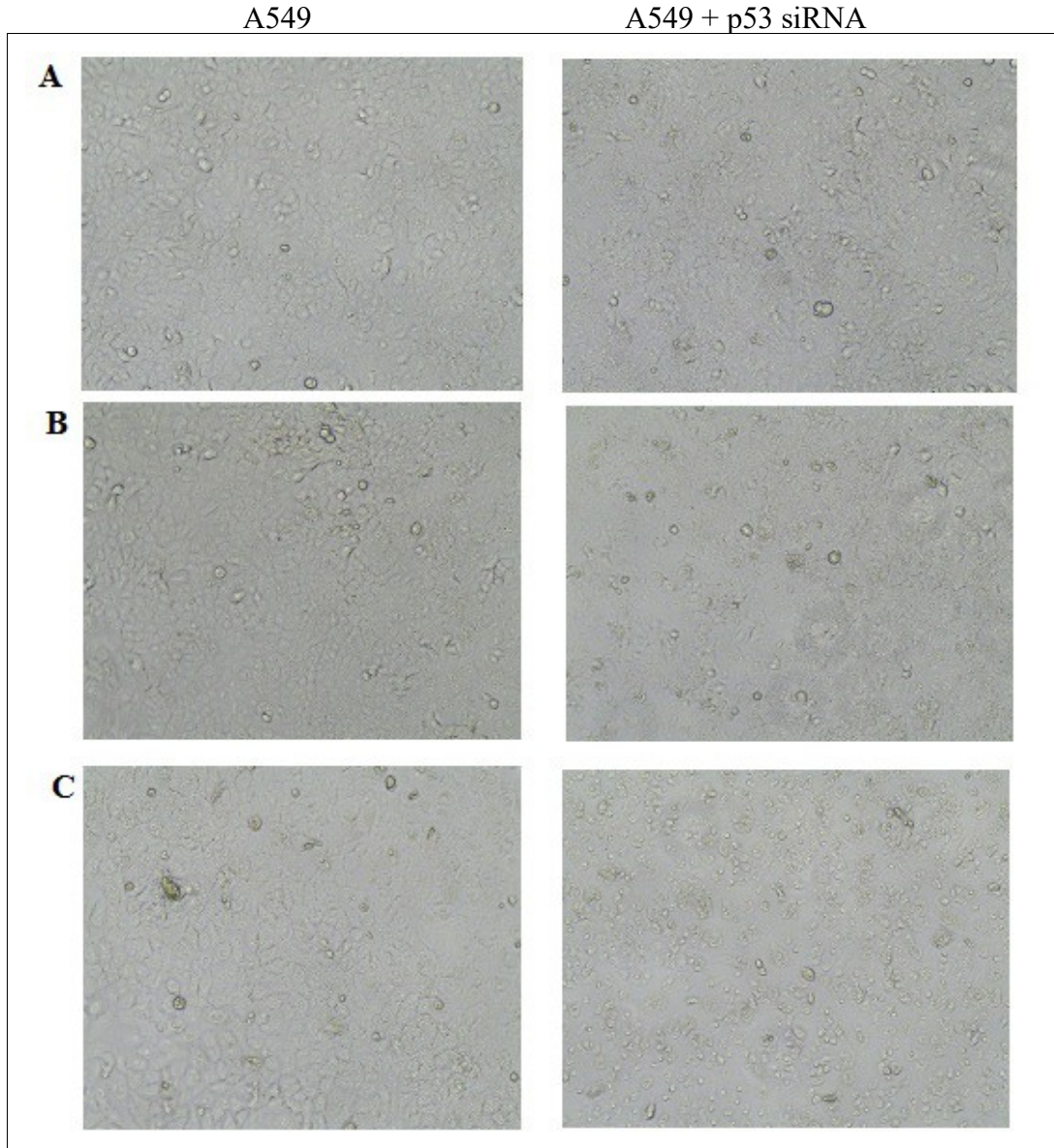
Genistein uygulamasının EGFR protein miktarları üzerindeki etkisini belirlemek için farklı dozlarda genistein uygulanan A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinden protein izole edilerek western blot gerçekleştirilmiştir. SiRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen AGS0 ve AGS1 hücrelerinde kendi kontrollerine oranla sırasıyla %110 ve %80 artış görülmüştür. 100 µM genistein uygulanan hücrelerde artış çok daha düşük seviyelerde gerçekleşmektedir. A549 hücrelerinde artış %40 miktarında gerçekleşirken, A549+p53 siRNA hücrelerinde kontrole göre %70 artış belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bu durum genistein uygulamasının EGFR protein miktarını arttıran yönde etki gösterdiğini, p53 inhibisyonunun da bu duruma pozitif katkısı olduğunu göstermektedir. P53 miktarında daha fazla artışın görüldüğü AG100 hücrelerinde EGFR miktarındaki artışın en düşük seviyede olması da bu durumu destekler niteliktedir.



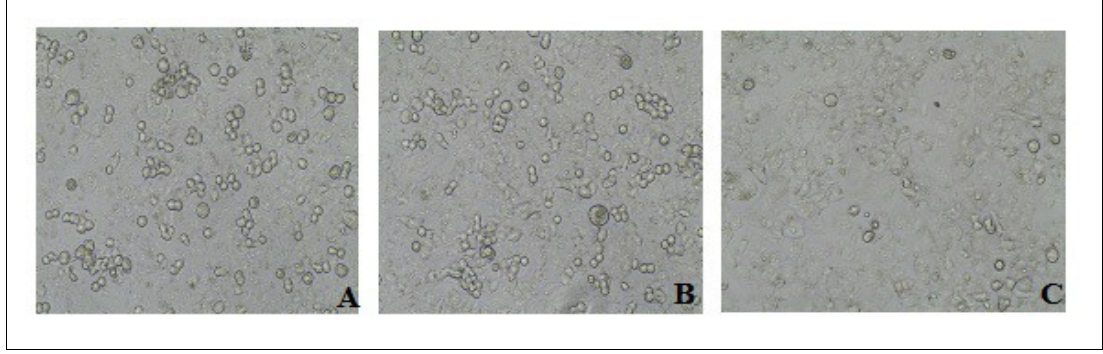
Şekil 4.6. A) A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde genistein uygulamasına bağlı EGFR protein miktarlarındaki değişiklik, B) A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde EGFR protein miktarlarını gösteren poliakrilamid jel görüntüleri.

0 μ M, 1 μ M ve 100 μ M genistein uygulanan hücreler (AG0, AG1, AG100) 24 saat sonra kontrol edildiğinde hücrelerin well yüzeyinin tamamını kapladığı görülmektedir (Şekil 4.7). Hücre şekilleri incelendiğinde 100 μ M genistein uygulanan hücrelerin yüzey kaplamalarının asıl nedeninin hücre bölünmesi değil hücrelerin hacmindeki artış olduğu belirlenmiştir. Genisteinin yüksek dozlarda tübülün polimerizasyonunu bozduğu bilinmektedir [Mukherjee *et al.*, 2010]. siRNA transfeksiyonu yapılan hücreler (AGS0, AGS1, AGS100) incelendiğinde AGS0 ve AGS1 hücrelerinde sağlanan p53 protein seviyesindeki azalmanın hücre sayı ve büyüklüğü açısından bir farklılığa neden olmadığı görülmüştür. Hem p53 siRNA'sı hem de 100 μ M genistein uygulanan hücrelerde; AG100 hücrelerinin tam tersi profil gözlenmektedir. Hücre sayısında yine bir artış görülmemekle beraber, hücreler normale göre çok küçük ve sağlıklıdır. AG100 ve AGS100 petrilerinde hücre sayıları arasında istatistiksel bir fark yoktur. Her iki durumda da hücrelerde granülüzasyon ve çekirdek belirginleşmesi gözlemlenmek mümkündür. Özellikle AGS100 petrilerinde normalden farklı boy ve şekillerde hücreler görülmektedir.

Hücreler bu açıdan apoptotik hücre özellikleri göstermelerine rağmen deney gerçekleştirilen hiçbir hücre topluluğunda 24 saat sonunda hücre ölümü gözlenmemiştir. SiRNA uygulaması tek başına hücelere zarar vermemektedir. AG100 ve AGS100 hücrelerinin her ikisinde de p53 miktarında artış görülmesi şekilsel farklılığın siRNA transfeksiyonu veya p53 miktarına bağlanamayacağını göstermiştir. AG100'de görülen apoptozdan kaçış profilinin artan IGF-1R protein miktarıyla bağlantısı olabilir.

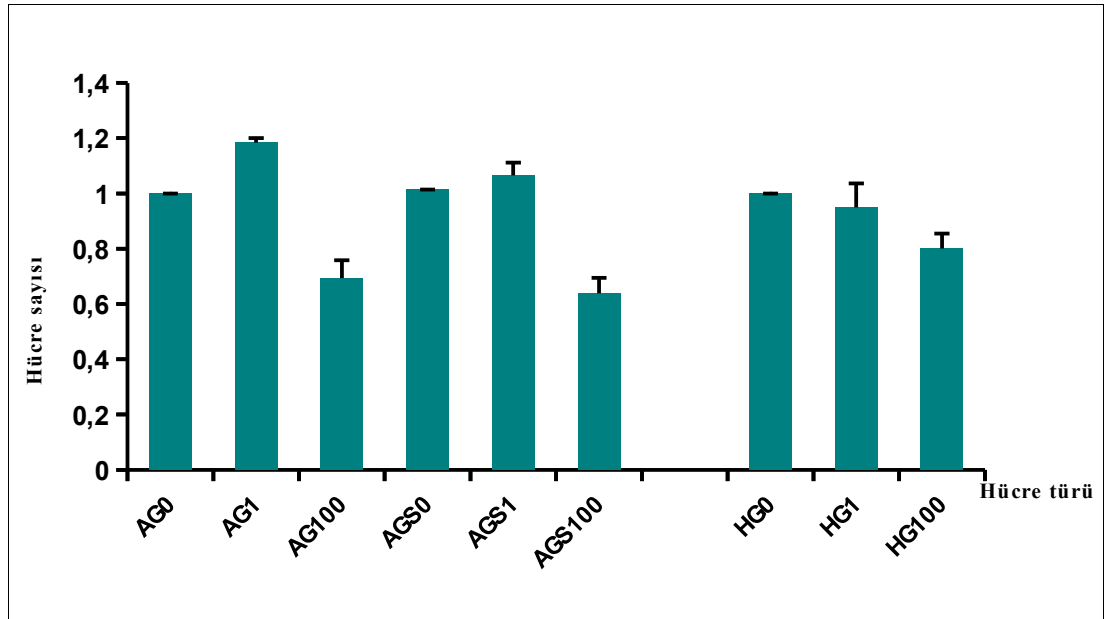


Şekil 4.7. Farklı dozlarda genistein uygulanan A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin görsel olarak karşılaştırılması (20X). A) 0 μ M, B) 1 μ M ve C) 100 μ M.



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda genistein uygulanan H1299 hücrelerinin görsel olarak karşılaştırılması (20X) A) 0 μ m, B) 1 μ M ve C) 100 μ M.

Genistein uygulanan H1299 hücrelerinde (HG0, HG1, HG100) 24 saatin sonunda boyut ve şekil açısından değişiklik görülmemektedir (Şekil 4.8). H1299 hücreleri daha yüksek bölünme hızına sahip olduğundan HG0 ve HG1 %100 yoğunluğu geçmiştir. HG100'de ise hücre sayısı kontrole göre az olmakla beraber azalma %20 seviyesindedir (Şekil 4.9).

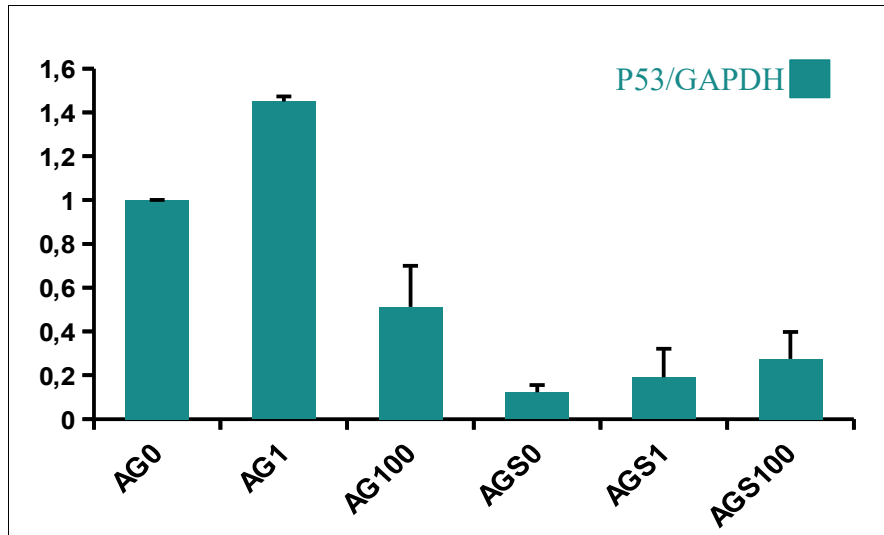


Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda genistein uygulaması sonucu A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücre sayılarında yüzdesel değişim.

4.3. Genisteinin *IGF-1R* ifadenmesini doza bağı regülasyonunda p53 etkisinin incelenmesi

Genisteinin *IGF-1R* ifadenmesi üzerindeki etkisinin anlaşılması için hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinin konsantrasyonları ölçüldükten sonra 100 ng RNA kullanılarak cDNA sentezlenmiş ve RT-qPCR yöntemiyle *IGF-1R*, *EGFR* ve *p53* mRNA seviyeleri belirlenmiştir. Sonuçları normalize etmek için *GAPDH* mRNA seviyeleri kullanılmıştır.

A549 hücrelerinde *p53* ifadenmesinin siRNA transfeksiyonuna ve genistein uygulamalarına bağı olarak değişimi ölçülmüştür. 1 μ M genistein uygulamasıyla *p53* mRNA seviyesi kontrol hücrelerine göre %45 oranında artmaktadır. 100 μ M genistein uygulaması ise *p53* ifadenmesinde kontrole göre %50 oranında baskılanmaya neden olmuştur. siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerin *p53* mRNA seviyelerine bakıldığında AGS0 ve AGS1 hücrelerinde kontrole göre %80 baskılanma olduğu görülmüştür. AGS100 hücrelerinde baskılanma oranı %70'e düşmektedir (Şekil 4.10).

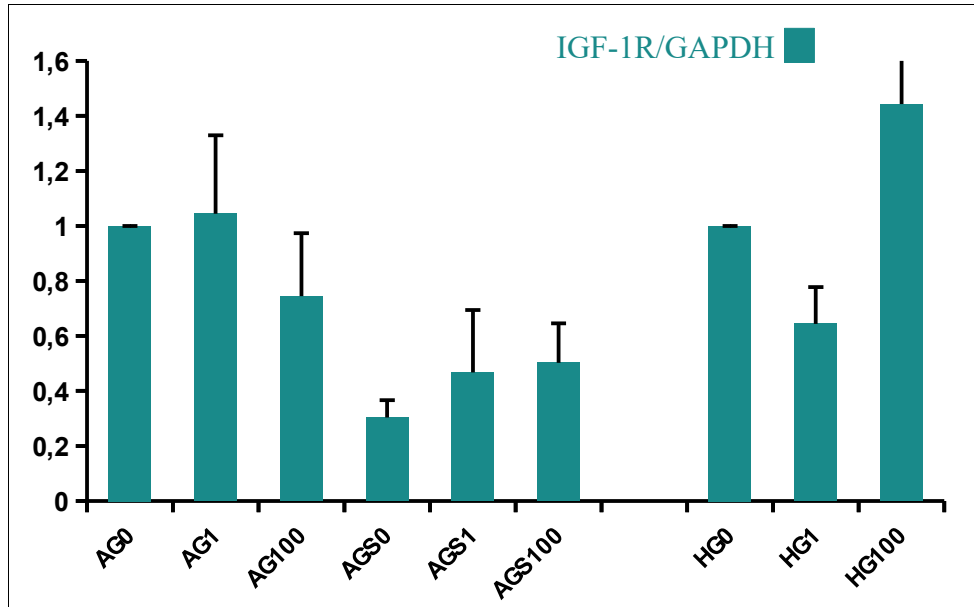


Şekil 4.10. A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin *p53* mRNA seviyeleri.

A549 hücrelerine 24 saat genistein uygulanmasının sonucunda *IGF-1R* ifadenmesindeki değişim incelenmiştir. 1 μ M genistein uygulanmasında *IGF-1R*

mRNA seviyelerinde değişiklik gözlenmezken, 100 µM genistein uygulandığında %25 azalma belirlenmiştir. siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde *IGF-1R* ifadenme seviyeleri kontrol hücrelerinde %70, genistein uygulanan hücrelerde doza bağlı olmaksızın %50 oranında baskılanmıştır (Şekil 4.11).

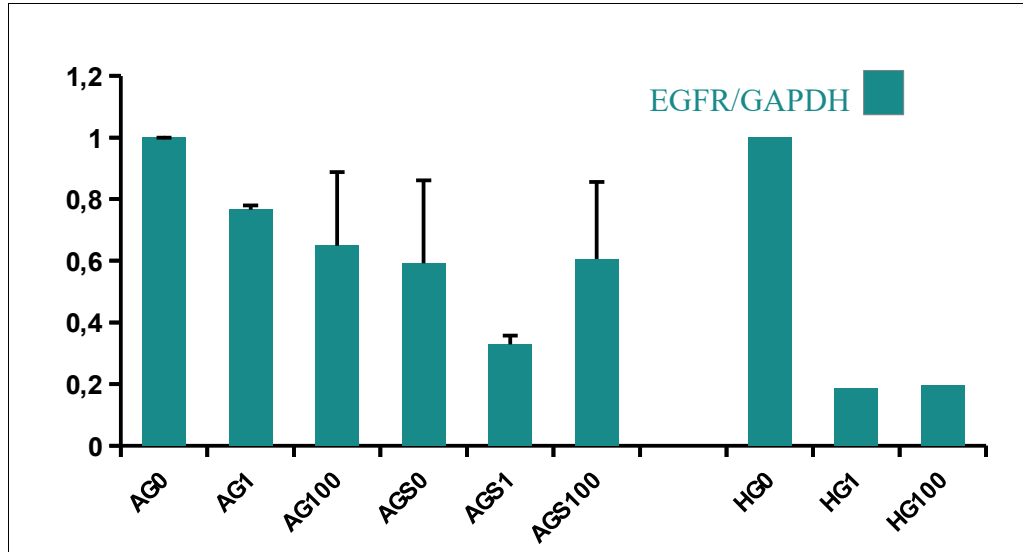
24 saat süreyle genistein uygulanan A549 hücrelerinde *EGFR* mRNA seviyeleri ölçüldüğünde 1 µM ve 100 µM genistein uygulanan hücrelerde *EGFR* ifadenmesindeki baskılanma miktarları sırasıyla %25 ve %35 oranındadır. AGS0 hücrelerinde gen ifadenmesi %40 oranında baskılanmıştır. AGS1 hücrelerinde baskılanma miktarı kontrole göre %70, AGS100 hücrelerinde %40 oranında gerçekleşmiştir. Bu durumda genisteinin baskılama etkisi olduğu ancak *p53* siRNA uygulamasının genisteinden daha etkili olduğu söylenebilir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. A549, A549+*p53* siRNA ve H1299 hücrelerinin *IGF-1R* mRNA seviyeleri.

H1299 hücrelerinde *IGF-1R* ve *EGFR* mRNA seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi incelendiğinde *IGF-1R* ifadenme seviyelerinin doza bağlı değişkenlik gösterdiği, *EGFR* mRNA miktarının ise genistein kullanımına bağlı olarak baskılandığı görülmüştür. 1 µM genistein kullanıldığında *IGF-1R* seviyesi %35 oranında azalırken, 100 µM genistein kullanıldığında %45 oranında arttığı

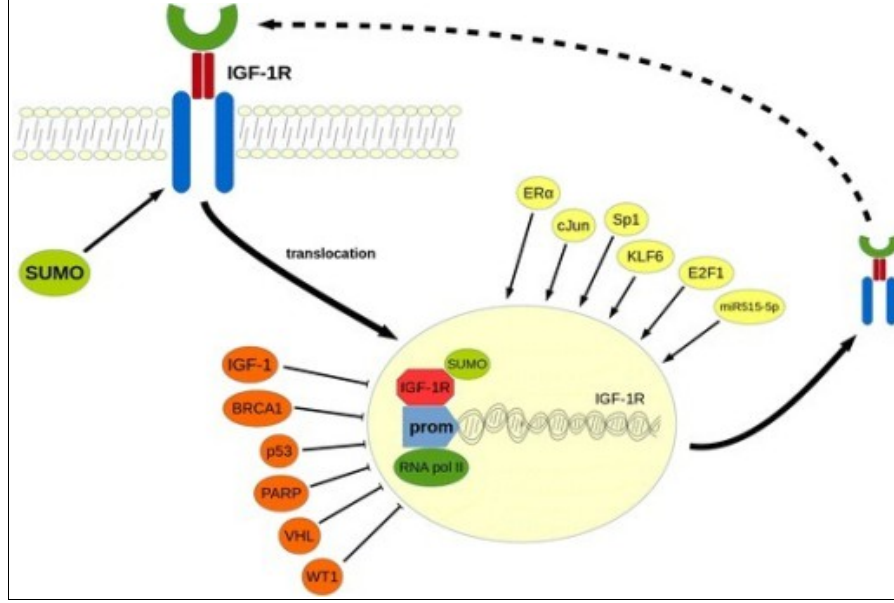
görülmektedir (Şekil 4.11). *EGFR* ifadenme değerleri kullanılan her iki dozda da %80 oranında baskılanmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinin *EGFR* mRNA seviyeleri.

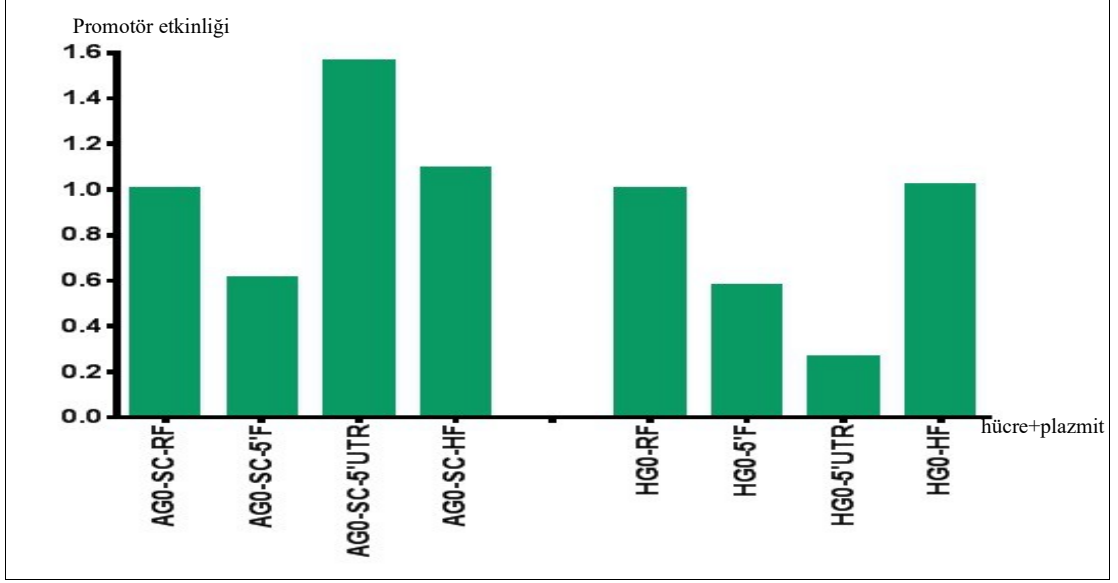
4.4. Genisteinin *IGF-1R* promotörünü doza bağlı regülasyonunda p53 etkisinin incelenmesi

Genisteinin *IGF-1R* promotör aktivitesi üzerindeki doza bağlı etkisinin anlaşılabilmesi için hücreler farklı *IGF-1R* promotörü içeren plazmitler kullanılarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyon için sıçan *IGF-1R* full-length (RF, -476/+641), sıçan *IGF-1R* 5'flanking (5'F, -476/+41), sıçan *IGF-1R* 5'UTR (5'UTR, +41/+641), insan *IGF-1R* full-length (HF, -548/+570) promotör bölgelerini içeren plazmitler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların normalizasyonunu sağlamak amacıyla kontrol hücreleri basic pGL3 plazmitiyle transfekte edilmiştir.



Şekil 4.13. IGF-1R promotörünün ifadenme seviyelerinin kontrolünde rol alan proteinler.

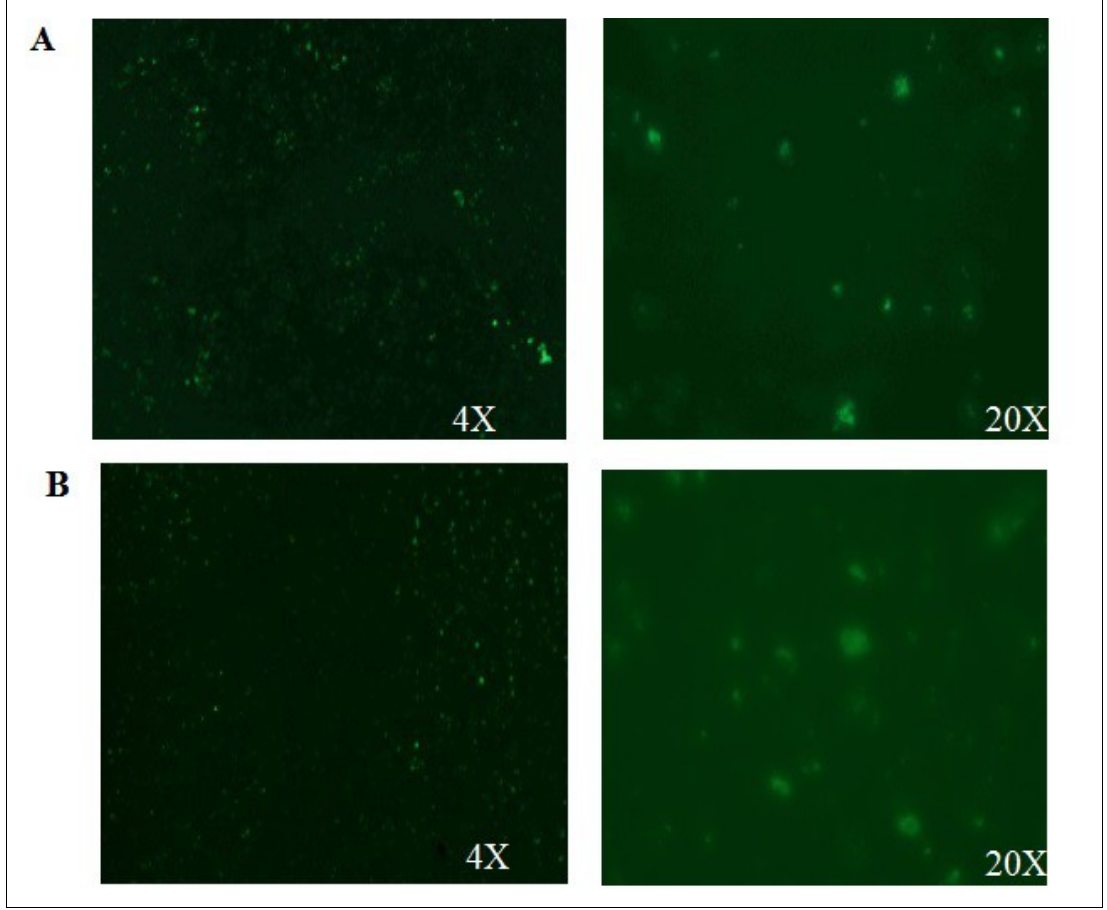
A549 ve H1299 hücreleri transfekte edildikten sonra farklı *IGF-1R* promotör bölgelerinin bu hücrelerdeki göreceli aktiviteleri belirlenmiştir. Genistein uygulaması yapılmayan hücrelerde sıçan full-length promotör aktivitesi kontrol olarak kabul edilmiş ve diğer promotör bölgelerinin aktiviteleri hesaplanmıştır. A549 hücrelerinde insan full-length promotörünün sıçan full-length promotörüne göre %10 daha fazla ifadelendiği, 5'UTR promotöründe bu artışın %55 seviyesinde olduğu görülmüştür. 5'flanking promotörü ise %40 daha az ifadenmektedir. H1299 hücrelerinde insan full-length ve sıçan full-length promotör bölgelerinin ifadenme seviyeleri aynıdır. 5'flanking promotörünün ifadenmesi kontrole oranla %40 daha azdır. 5'UTR promotör bölgesi de kontrole göre %75 daha az ifadenmektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. A549 ve H1299 hücrelerinde *IGF-1R* promotör etkinliği (RF; rat full-length, 5F; 5' flanking, 5' UTR ve HF; human full-length).

Genistein uygulamasının *IGF-1R* promotör ifadenmesine olan etkisini anlayabilmek için hücreler 24 saat boyunca 1 μ M ve 100 μ M genisteine maruz bırakılmışlardır. p53'ün genistein-IGF-1R arasındaki ilişkide rolü olup olmadığının anlaşılması için, genisteinin etkisi her bir plazmit ve doz için *p53* siRNA transfeksiyonu yapılan A549 hücrelerinde de incelenmiştir.

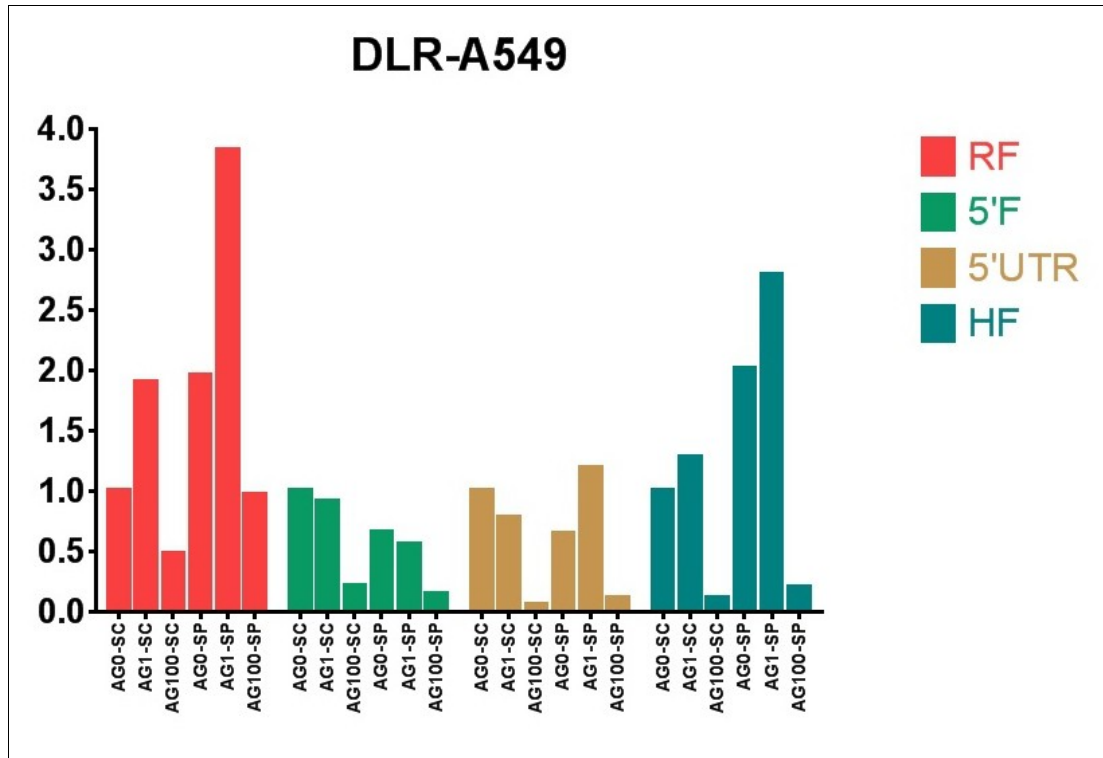
İki farklı transfeksiyon ajanı kullanımının siRNA transfeksiyon etkinliğini azaltıp azaltmadığını kontrol etmek amacıyla pGL3 basic plazmiti aktarılan hücrelere eş zamanlı olarak kontrol siRNA'sı da verilmiş ve sadece kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelerden elde edilen mikroskop görüntüleriyle karşılaştırma yapılmıştır. Hücreler şekil, boyut ve sayı bakımından benzer ve sağlıklı görünmektedir. İki farklı transfeksiyon ajanı kullanımının transfeksiyon etkinliği üzerinde negatif bir etkisi görülmemektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. A549 hücrelerinde transfeksiyon etkinliğinin karşılaştırılması A) A549+p53 siRNA, B) A549+p53 siRNA + pGL3 plazmit.

DLR testi yapılarak hem A549 hem de H1299 hücrelerinde genistein dozuna bağlı *IGF-1R* promotör etkinliği incelenmiştir. Sıçan full-length promotörünü içeren plazmit verilen A549 hücrelerinde *IGF-1R* seviyelerinin 1 μ M genistein kullanıldığında kontrole göre %90 oranında arttığı, 100 μ M genistein uygulamasında ise %50 azaldığı görülmüştür. *p53* ifadenmesi siRNA kullanılarak susturulan hücrelerin hepsinde *IGF-1R* promotör etkinliği kendi kontrollerine göre iki kat artmaktadır. AGS0 hücrelerinde kontrolün iki katı değerinde promotör etkinliği görülmektedir. 1 μ M genistein uygulanan AGS1 hücrelerinde kontrole göre 3 kat artış vardır. AGS100 hücrelerinde promotör aktivitesi kontrol hücreleriyle aynı seviyededir (Şekil 4.16). *p53* negatif olan H1299 hücrelerinde ise 1 μ M genistein kullanıldığında *IGF-1R* promotör etkinliğinde kontrole göre herhangi bir değişiklik olmazken, 100 μ M genistein kullanıldığında %70 azalma gözlenmiştir (Şekil 4.17).

Sıçan 5'flanking promotörünü içeren plazmitlerle transfekte edilen A549 hücrelerinde 1 μ M genistein uygulandığında kontrole oranla %10'luk bir azalma görülmüştür. 100 μ M genistein uygulandığında baskılanma oranı %80'e yükselmektedir. *p53* siRNA'sıyla transfekte edilen ve genistein uygulanmayan hücrelerde IGF-1R miktarı kontrole göre %35 azalmıştır. 1 μ M genistein uygulandığında kontrole oranla baskılanma %45, 100 μ M genistein uygulandığında %85 seviyesindedir (Şekil 4.16). H1299 hücrelerinde 5'flanking promotörünün ifadenme miktarı ölçüldüğünde 1 μ M genistein kullanımının %30 baskılanmaya neden olduğu, 100 μ M genistein uygulamasının ise baskılanma miktarını %95'e çıkardığı belirlenmiştir (Şekil 4.17). Bu durumda 100 μ M uygulamasının 5'flanking bölgesinde yüksek oranda baskılanmaya yol açtığı söylenebilir.

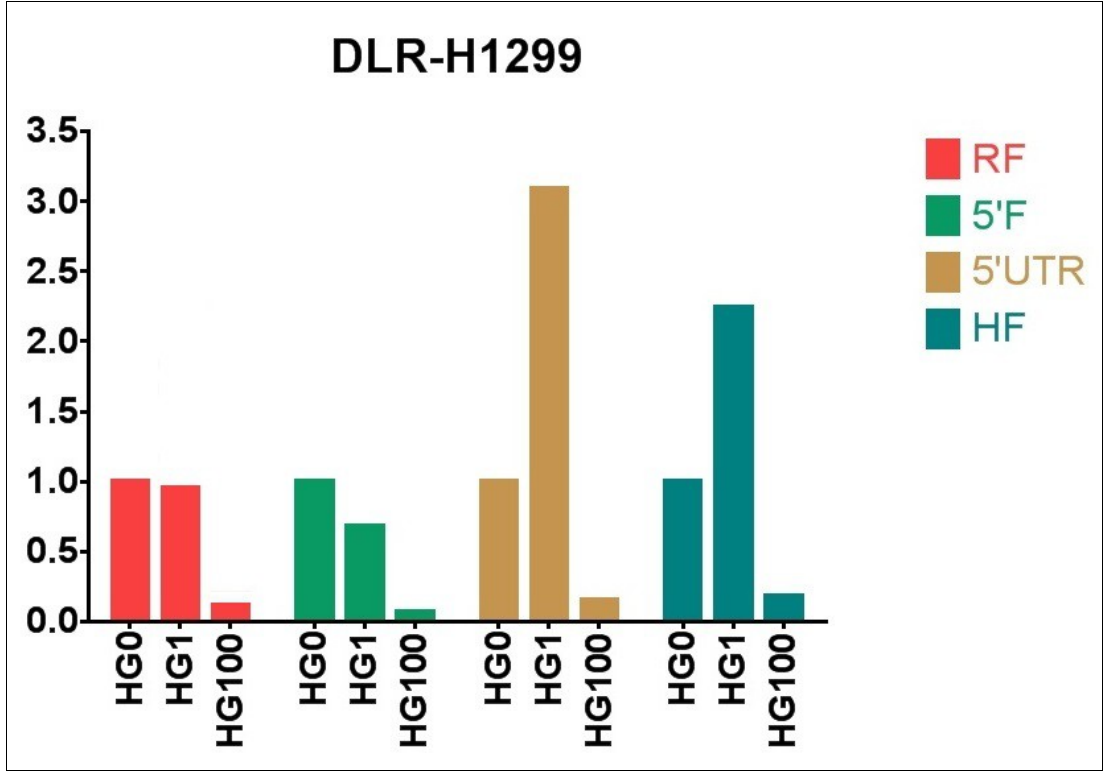


Şekil 4.16.A549 ve A549+*p53* siRNA hücrelerinde farklı *IGF-1R* promotör bölgeleri içeren plazmitlerin ifadenme miktarlarının genistein uygulamalarına bağlı olarak değişimi.

Sıçan 5'UTR promotörünü içeren plazmitlerin aktarıldığı A549 hücrelerinde promotör etkinliğinin doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir. 1 μ M genistein

uygulamasıyla %20 baskılanma gerçekleşirken 100 μ M genistein uygulandığında baskılanma miktarı %95'e çıkmıştır. *p53* siRNA'sı uygulanan hücrelerde promotör etkinliği %35 azalmıştır. 1 μ M genistein uygulamasında IGF-1R seviyesinin %20 arttığı görülmektedir. 100 μ M genistein uygulamasında ise elde edilen baskılanma miktarı %90'dır (Şekil 3.16). H1299 hücrelerinde ise 1 μ M genistein uygulamasıyla 5'UTR promotör etkinliği iki kat artarken, 100 μ M genistein uygulamasında kontrole göre %85 oranında baskılanmıştır (Şekil 4.17). Bu sonuçlar göz önüne alındığında *p53* olmayan durumlarda 1 μ M genistein kullanımının 5' UTR bölgesinin ifadenmesinde yüksek miktarda artışa sebep olduğu söylenebilir.

İnsan full-length *IGF-1R* promotörü kullanılarak transfekte edilen hücrelerde 1 μ M genistein uygulamasında ifadenme seviyesi %30 artarken, 100 μ M genistein uygulamasında %90 baskılanma gerçekleşmiştir. *p53* siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerde promotör etkinliği kendi kontrollerine oranla yaklaşık %50 artmaktadır. AGS0 hücrelerinde IGF-1R miktarı kontrole göre iki kat, 1 μ M genistein uygulanan hücrelerde ise 2.5 kat artış göstermiştir. 100 μ M genistein kullanılan hücrelerde ise baskılanma miktarı %80'dir (Şekil 4.16). H1299 hücrelerinde insan full-length promotör aktivite seviyeleri 1 μ M genistein uygulamasında kontrolün 2 katına çıkmıştır. 100 μ M genistein uygulamasında ise baskılanma miktarı %80 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17). 100 μ M genistein A549 hücrelerinde insan full-length promotörünü baskılama açısından sıçan full-length promotörüne oranla daha başarılıdır. Aynı durum H1299 hücrelerinde görülmemektedir. H1299 hücrelerinde yüksek dozda genistein kullanımı iki promotör bölgesinde benzer sonuçları vermiştir. Promotör ifadenme seviyeleri incelendiğinde 5' UTR ve insan full-length promotörünün aynı profili verdiği görülmektedir.



Şekil 4.17. H1299 hücrelerinde farklı *IGF-1R* promotör bölgeleri içeren plazmitlerin ifadenme miktarlarının genistein uygulamalarına bağlı olarak değişimi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatür incelendiğinde A549 ve H1299 hücre hatları üzerinde farklı dozlarda genistein kullanımıyla hücre sağ kalım oranlarını araştıran çalışmalar olduğu görülmektedir. Ancak *IGF-1R* ifadenme seviyeleri yüksek olduğu bilinen bu hücrelerde, genistein uygulamasıyla *IGF-1R* regülasyonu üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Genisteinin yüksek dozlarının IGF-1R miktarını hem protein hem de mRNA düzeyinde azalttığı daha önce prostat ve meme kanseri hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Aynı etkinin NSCLC hücre hatlarında da gösterilmesi hücre sağkalım mekanizmasında IGF-1R yolağının etkinliğinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Yapılan deneylerde p53 ifadenmesinin bu sürece olan katkısı incelenmiştir.

Kullanılan her iki hücre hattı da *IGF-1R* ve *ER-β* aşırı ifadelenen hücrelerdir. A549 hücresi yabanıl tip p53 içerirken, kontrol hücresi olarak kullanılan H1299'da p53 delesyonu vardır. Her iki hücrede de yabanıl tip *EGFR* bulunmaktadır. Hücrelerin p-Src ve p-Shc seviyeleri normalden yüksektir. Hücrelerde bu duruma ek olarak *Ras* mutasyonu belirlenmiştir (A549 – *KRAS*, H1299 – *NRAS*). A549 hücrelerinde ayrıca *CDKN2A* geninde de delesyon vardır.

CDKN2A geni p16 ve p14 proteinlerini kodlamaktadır. P16; cdk4 ve cdk6 ifadenmesini baskılayarak Rb fosforilasyonunu engeller ve bu yolla G1/S arası geçişi durdurarak hücre bölünmesinin önüne geçer. p14 ise Mdm2'nin ifadenmesini baskılayarak p53'ün fosforillenebilen serbest forma geçişini sağlamaktadır. Mdm2 p53'ün DNA bağlanma bölgesine ve transaktivasyon bölgesine bağlanarak aktivasyonunu ve işlevini engeller. Ayrıca ubiquitinasyon yoluyla p53'ün degrade edilmesine de sebep olur. Normal koşullarda RAS miktarındaki artış, p14 üretimini uyardığından, p53 fosforilasyon seviyelerinde artışı beraberinde getirir. A549 hücrelerinde *CDKN2A* delesyonu bulunduğundan p14 üretimi gerçekleşmez. Hücrede aktif olarak p53 üretilmesine rağmen, Mdm2 üretimi sürekli olduğundan p53 degradasyonu gerçekleşir ve hücrenin p-p53 seviyeleri hep bazal seviyede kalır. Normal hücrelerde p53 fosforlanmış formuyla denge durumunda bulunurken, p14 olmayan durumlarda denge bozulur ve bu durum tek başına p53 mutasyonu ile aynı

etkiye yol açar. p53 aktivasyonu yeterli miktarda gerçekleşmediğinden hücre döngüsü kontrolü yapılamaz.

Yapılan deneyler sırasında özellikle A549 hücrelerinde 100 μ M genistein uygulamasına bağlı olarak hücre şekillerinde farklılık görülmüştür. Genistein uygulanmayan kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında 100 μ M genistein uygulanan hücreler hacimsel olarak daha fazla yer kaplamaktadır. Hücrelerin ekildiği yüzeyler karşılaştırıldığında AG0 ve AG100 hücrelerinin ikisinde de yüzeyin tamamen kaplanmış olması ve ölü hücre bulunmaması, 100 μ M genistein verilen hücrelerin sayısal olarak az olmalarına rağmen, kontrol hücrelerine göre daha büyük olduklarından yüzeyi kaplayabildiklerini göstermektedir. Bu durumun gerçekliğini kontrol etmek için farklı büyüklükte yüzeylerde çoğaltılmış olan hücrelerin görüntüleri karşılaştırılarak sayısal farklılıklar belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 4.1'de istatistiksel olarak incelenmiştir.

1 μ M genistein uygulamasıyla A549 hücre sayısının kontrole göre %20 oranında daha fazla, 100 μ M genistein uygulamasıyla ise %30 daha az olduğu belirlenmiştir. Hücre sayısındaki %30'luk fark hücre ölümünün değil, kontrol hücreleri 24 saatlik deney sürecinde bölünmeye devam ederken 100 μ M genistein uygulanan hücrelerde bölünmenin durmasının sonucudur. Yapılan deneylerle siRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerle kıyaslama yapılarak p53 inhibisyonunun hücre sayısında etkili olup olmadığı belirlenmiştir. Genistein uygulanmayan hücrelerle karşılaştırıldığında hücre sayıları arasında farklılık görülmemektedir ($p=1.00$). Transfekte edilen hücrelerde p53 protein seviyesi %30 azalmış olmasına rağmen hücre sayısında farklılık görülmemesi hücre bölünmesinin p53 seviyesinden bağımsız gerçekleştiğini göstermektedir. 1 μ M genistein kullanımı da bu durumu destekler niteliktedir. 1 μ M genistein verilen hücrelerde p53 seviyesinin %50 oranında arttığı, transfekte edilen A549 hücrelerinde ise %30 azaldığı belirlenmiştir. Her iki hücre tipinde de 1 μ M genistein uygulaması sonucu hücre artışı %20 oranında gerçekleşmiştir. 100 μ M genistein uygulanan örnekler arasında ise hücre sayısı açısından %5'lik bir fark bulunmaktadır, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.261$). Hücreler arasında sayısal olarak bir fark bulunmamasına rağmen şekil ve kapladıkları hacim açısından farklılık gösterirler. AG100 hücreleri hacim artışı gösterirken, AGS100 hücreleri çok küçük ve sağlıklıdır. İki hücre tipinde de

p53 miktarı kontrole oranla çok yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Transfekte edilen hücreleri normal A549 hücrelerinden ayıran şey IGF-1R protein seviyeleridir. A549 hücrelerinde 100 μ M genistein uygulanması sonucu IGF-1R seviyeleri iki katına çıkarken, transfekte edilen hücrelerde kontrolle aynı seviyede kalmıştır. Ancak bu durumun hücre şekilleriyle bağlantılı olduğunu gösteren herhangi bir yayın bulunmamaktadır. AG100 ve AGS100 hücreleri arasındaki şekilsel farklılıkların bir başka sebebi de p-p53 seviyelerindeki farklılık olabilir. AGS100 hücrelerinde p-p53 seviyeleri kontrol hücrelerine oranla %95 artış göstermekte, AG100 hücrelerinde bu oranın %50 seviyesiyle sınırlı kalmaktadır. Kontrol A549 hücrelerinin bazal p-p53 seviyelerinin çok düşük olduğu belirlenmiştir. Transfekte edilen hücrelerde görülen %95 'lik artış hücrelerin apoptotik yolağa girebilmesi için gereken p-p53 seviyesini sağlamış olabilir. Ancak seviyelerde %95'e varan artış olmasına rağmen p-p53 seviyelerinin yine de çok düşük olduğunu unutmamak gerekir.

Genisteinin antiproliferatif etkisini, tübülilere spesifik olarak bağlanıp mikrotübül depolimerizasyonuna yol açarak gösterdiği düşünülmektedir. Genisteinin mikrotübül organizasyonunu doza bağlı olarak bozup, A549 hücrelerinde G2/M geçişini engellediği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. A549 hücreleriyle yapılan deneylerde tübülün mikrotübül dönüşümünün engellenmesi için gereken IC₅₀ dozu 87 μ M genistein olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada 100 μ M genistein kullanımı sonucu, bu çalışmada elde edilen verilerle benzer biçimde hücre hacminde artış görülmüştür [Mukherjee *et al.*, 2010].

Tablo 5.1. A549 ve H1299 hücre sayılarının genistein uygulamasına bağlı olarak değişimi (↑ artış, ↓ azalma, * herhangi bir farklılık olmadığını belirtmektedir).

	GEN-0 μM	GEN-1 μM		GEN-100 μM	
A549	C	↑	⌋ *	↓	⌋ *
A549 + p53 siRNA	*	↑		↓	
H1299	C	*		↓	

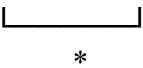
H1299 hücrelerinde genistein uygulanması sonucu hücre sayılarındaki değişimler incelendiğinde 1 μ M genistein uygulamasının hücre sayısı üzerinde

belirgin bir etkisi görülmemektedir (Tablo 5.1). 100 μ M genistein kullanımı ise hücre sayısında kontrole göre %20'lik bir azalmaya yol açmıştır. A549 hücrelerinin aksine, yüksek dozda genistein uygulanan H1299 hücreleri sağlıklı görülmektedir. A549 hücrelerinde gözlenen hacimsel değişiklikler H1299 hücrelerinde gözlenmemektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda 90 μ M genistein kullanımı sonrası H1299 hücrelerinde G2/M geçişinin %20 oranında durdurulduğu gösterilmiştir [Ding *et al.*, 2003]. H1299 hücrelerinde görülen sayısal azalmanın bu geçiş engellendiği için gerçekleştiği düşünülmektedir. IGF-1R protein seviyeleri kullanılan her iki dozda da azaldığından H1299 hücrelerinin büyümesindeki yavaşlamayı IGF-1R inhibisyonu ile bağdaştırmak mantıklı değildir.

Genisteinin östrojen analogu gibi davranarak *IGF-1R* inhibisyonunu gerçekleştirdiği prostat ve meme kanserlerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. A549 ve H1299 hücrelerinde genistein-IGF-1R ilişkisini gösteren herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Yapılan deneylerde genisteinin IGF-1R protein miktarları üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi belirlenememiştir (Tablo 5.2). A549 hücrelerinde yapılan incelemelerde beklenenin tersine her iki genistein dozunda da IGF-1R protein miktarında artış belirlenmiştir. 1 μ M genistein kullanımıyla %70 artış belirlenirken, 100 μ M genistein dozunda protein miktarı kontrolün iki katına çıkmıştır. Elde edilen veriler *IGF-1R* mRNA miktarlarıyla uyumlu görünmemektedir (Tablo 5.2). 1 μ M genistein uygulanması kontrole göre *IGF-1R* mRNA seviyelerinde bir değişikliğe yol açmazken, 100 μ M genistein uygulanması *IGF-1R* mRNA miktarında %25 azalmaya yol açmıştır. mRNA seviyelerinde azalmaya rağmen protein seviyelerinde artış IGF-1R proteininin stabil hale geldiğini veya hidrolizinin engellendiğini göstermektedir. *P53* siRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen A549 hücrelerinde genistein-IGF-1R ilişkisini belirlemek için deneyler tekrarlanmıştır. Transfekte edilen tüm hücrelerde genistein dozuna bağlı olmaksızın *IGF-1R* mRNA seviyelerinde azalma gerçekleşmiştir. Genistein uygulanmayan transfekte hücrelerdeki azalma miktarı kontrole oranla %70 seviyesindedir. Genistein uygulanan hücrelerde ise inhibisyon miktarı doza bağlı olmaksızın %50 seviyesindedir. Normal A549 hücrelerine kıyasla transfekte hücrelerde protein miktarları değişkenlik göstermektedir. Genistein uygulanmayan transfekte hücrelerde en yüksek mRNA inhibisyon oranı görünmesine rağmen protein miktarı %65 artış

göstermiştir. Genistein kullanılan hücrelerde eşit miktarda mRNA inhibisyonu görülmesine rağmen, 1 μ M genistein uygulaması protein miktarında %20 azalmaya sebep olurken, 100 μ M genistein uygulanan hücreler kontrolle karşılaştırıldığında protein miktarında değişiklik belirlenmemiştir. Benzer etki görülmemesini p53 inhibisyonuyla bağdaştırmak, 100 μ M genistein kullanımı p53 miktarını arttırdığından mümkün değildir.

Tablo 5.2. A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin *IGF-1R* mRNA ve protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.

	A549			A549 + p53 siRNA		
	G0	G1	G100	G0	G1	G100
IGF-1R mRNA	C	*	↓	↓	↓	↓
						
IGF-1R protein	C	↑	↑	↑	↓	*

Yapılan deneylerde 100 μ M gibi yüksek bir dozda genistein kullanılmasına rağmen IGF-1R üzerinde inhibisyon etkisi görülmemektedir. Hücrelerde yüksek dozda genistein uygulamasına bağlı olarak gözlenen diğer parametrelerin (genistein uygulamasıyla p53 miktarında artış, hücre iskelet yapısında bozulmalar, bölünmenin durdurulması) literatürle uyumlu olması inhibisyon etkisinin görülmemesinin hücre hattına özgü bir durum olduğunu düşündürmektedir. Aynı hücre hatları üzerinde yapılan IGF-1R inhibisyonuna yönelik diğer çalışmalar incelendiğinde, inhibisyonun genelde gerçekleşmediği görülmüştür. IGF-1R fosforilasyonunu engelleyerek etki gösteren PQIP kullanımı A549 hücrelerinde yüksek dozlarda kullanıldığında bile IGF-1R miktarını azaltmada beklenen etkiyi göstermemiştir. Hücrelerin taşıdıkları diğer mutasyonlar genistein-IGF-1R düzenleme ilişkisinin gerçekleşmesini engellemektedir. Bu durumun ortaya çıkmasına A549 hücrelerinin *KRAS* mutant olmasının neden olduğu düşünülmektedir. *KRAS* yabanıl tip NSCLC hücre hatlarıyla yapılan deneylerde IGF-1R baskılanmasının bu hücrelerde canlılığı azalttığı belirlenmiştir [Kim *et al.*, 2012]. Daha önce yapılan çalışmalarda genistein kullanımıyla IGF-1R inhibisyonunun

gerçekleştiği gösterilen prostat ve meme kanseri hücrelerinde *KRAS* mutasyonu bulunmaması da bu durumu destekler niteliktedir. A549 hücrelerinde *KRAS* mutasyonu bulunmasının IGF-1R yolağına olan bağımlılığı ortadan kaldırdığı düşünülebilir. Benzer bir durum da *NRAS* mutasyonu taşıyan H1299 hücrelerinde görülmektedir. Her iki hücrede de *RAS* mutasyonu olması, IGF-1R fosforilasyonu engellenmiş olsa bile etkisinin görülmesini engellemektedir. Ras yolağının kendisi IGF-1R gibi çok sayıda hücre yüzeyi reseptörünün transkripsiyonel aktivatörü gibi davrandığından IGF-1R mRNA ve protein miktarlarında beklenen düşüş gerçekleşmemektedir.

IGF-1R regülasyonunun p53 yokluğunda nasıl gerçekleştiğini belirlemek amacıyla p53 delesyonu içeren H1299 hücreleri kullanılarak deneyler tekrarlanmıştır. 1 μ M genistein uygulaması sonucu IGF-1R'ın hem mRNA hem de protein seviyesinde sırasıyla %35 ve %30 oranında inhibe edildiği belirlenmiştir. 100 μ M genistein uygulamasında ise mRNA seviyesi %45 oranında artarken, protein seviyesi %60 oranında azalmaktadır. Genisteinin yüksek dozunda mRNA ve protein seviyeleri arasında görülen bu uyumsuzluğun sebebi bilinmemektedir.

Tablo 5.3. H1299 hücrelerinin IGF-1R mRNA ve protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.

		IGF-1R mRNA	IGF-1R protein
H1299	G0	C	C
	G1	↓	↓
	G100	↑	↓

Tezde amaçlanan IGF-1R regülasyonunda p53'ün rolünün belirlenmesi olduğu için ilk olarak hücrelerin genistein uygulamasıyla değişen p53 mRNA ve protein seviyeleri belirlenmiştir. Daha sonra p53 siRNA'sıyla transfeksiyon gerçekleştirilen hücrelerden elde edilen verilerle karşılaştırılarak transfeksiyonun etkinliği ölçülmüştür. Genisteinin p53 protein stabilizasyonunu artırarak protein miktarlarında artışa sebep olduğu ve bu etkisinin mRNA miktarından bağımsız olarak gerçekleştiği farklı bir çalışmada gösterilmiştir [Ding *et al.*, 2000]. P53 miktarını arttıran bu etki uygulamadan sonra 6 saat gibi kısa bir sürede başlamakta ve

72 saate kadar sürmektedir. Yapılan deneyde 1 μ M genistein kullanımı hem protein hem de mRNA seviyelerinde %50 oranında artışa sebep olmuştur. 100 μ M genistein uygulaması mRNA seviyesini %50 oranında azaltırken, p53 protein miktarları 6 kat artış göstermiştir. Bu sonuçlar literatürle uyumludur. P53 ortamda bulunmadığında genistein-IGF-1R ilişkisinin nasıl gelişeceğini anlamak amacıyla *p53* siRNA'sıyla transfecte edilen A549 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerde *p53* mRNA seviyeleri ölçüldüğünde genistein uygulanmayan hücrelerde %90 inhibisyon görülmüştür. 1 μ M genistein uygulamasıyla bu oran %80, 100 μ M genistein verilen hücrelerde ise %70 olarak belirlenmiştir. 1 μ M genistein uygulanan hücreler ve kontrol hücreleri arasında protein seviyeleri açısından bir fark görülmemektedir. Her iki durumda da p53 protein miktarı %30 oranında azalmıştır. 100 μ M genistein uygulamasıyla p53 protein miktarlarında yine artış görülmüş ancak bu sefer 2 kat artışla sınırlı kalmıştır. Artış oranları arasındaki bu farklılığa siRNA transfeksiyonu sonucunda *p53* mRNA miktarında görülen %70 oranındaki azalmanın neden olduğu düşünülmektedir. Sonuçlar genel olarak dikkate alındığında 1 μ M genistein uygulamasının p53 üzerinde net bir etkisi olduğu söylenemez (Tablo 5.4). Literatüre bakıldığında genisteinin p53 üzerindeki stabilizasyon etkisinin 30 μ M ve üzeri dozlarda gerçekleştiği görülmektedir [Ding *et al.*, 2000]. Bu açıdan elde edilen veriler literatürle uyumludur. Genisteinin yüksek dozunda siRNA transfeksiyonuna rağmen yüksek miktarda p53 görülmesi genistein-IGF-1R ilişkisinin p53 açısından karşılaştırılmasını engellemektedir. 100 μ M'lık doz IGF-1R üzerinde inhibisyon etkisi göstermesi beklenen asıl dozdur. Yapılan deneyler genisteinin yüksek dozlarında p53 protein miktarlarında istenilen düşüşün sağlanmadığını göstermektedir (Tablo 5.4). Bu durumda inhibisyon etkisinin p53 miktarına bağlı değişimini belirlemek mümkün görülmemektedir. 100 μ M genistein uygulanması ve p53 yüksek miktarlarda üretilmesine rağmen IGF-1R üzerinde bir baskılanma görülmemesi, çalışılan hücre hattında IGF-1R üretimini uyaran ER- β dışında bir yolak olduğunu düşündürmektedir. p53 miktarındaki artış sonucunda beklenildiği gibi Sp1 inhibisyonunun gerçekleşmediği ya da *IGF-1R* aşırı ifadenemesinden Sp1 dışında bir transkripsiyon faktörünün sorumlu olduğu da düşünülebilir. A549 hücrelerinde p53 aktivasyonunun gerçekleşmediği bilindiğinden Sp1 inhibisyonunun gerçekleşmemiş olması daha olasıdır.

Tablo 5.4. A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin p53 mRNA ve protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.

	A549			A549 + p53 siRNA		
	G0	G1	G100	G0	G1	G100
p53 mRNA	C	↑	↓	↓	↓	↓
p53 protein	C	↑	↑	↓	↓	↑

A549 hücrelerinde yüksek dozda genistein uygulaması sonucu görülen artmış p53 protein miktarına rağmen hücrelerde neden apoptotik yolağın tercih edilmediği bilinmemektedir. Bu durumun A549 hücrelerinin p-p53 seviyeleriyle bağlantılı olduğu düşünülmüştür. Yapılan deneylerde elde edilen protein örnekleri kullanılarak A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinin p-p53 seviyeleri western blot yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuç olarak hücrelerin bazal p-p53 seviyelerinin çok düşük olduğu, 100 μ M genistein uygulamasının kontrol hücrelerine göre sırayla %50, siRNA uygulanan hücrelerde de %95 oranlarında artışa yol açtığı görülmüştür. Hücrelerde *CDKN2A* geninin delesyonu p-p53 seviyelerini Mdm2 aracılığıyla kontrol eden p14 proteininin üretilmemesine neden olmaktadır. A549 hücrelerinde p14 bulunmaması, Mdm2'nin p53'e bağlanarak çekirdeğe translokasyonunu ve transaktivasyonunu engellemesine yol açar. Bu durum A549 hücrelerinde p-p53 miktarlarının aşırı düşük olmasını açıklamaktadır. 100 μ M genistein uygulanan hücrelerde p53 miktarındaki artışla beraber p-p53 miktarlarında da artış görülmektedir. Bu durum p-p53 miktarında görülen artışın direk nicelikle bağlantılı olduğunu göstermez çünkü sadece 100 μ M genistein uygulanan hücrelerin p53 protein seviyeleri daha yüksekken, transfekte edilmiş ve 100 μ M genistein uygulanmış hücrelerde p-p53 seviyeleri daha yüksektir (Tablo 5.5). Ancak aradaki bu farklılığın sebebi bilinmemektedir.

Tablo 5.5. A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinde p-p53 protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.

		A549	A549+p53 siRNA
p-p53 (Protein)	G0	C	↑
	G1	*	↑
	G100	↑	↑

IGF-1R ve EGFR yollarının akciğer kanseri hücre hatlarında karsinogenez sürecini beraber çalışarak yönlendirdikleri bilinmektedir. Hem A549 hem de H1299 hücrelerinde p-shc seviyelerinin yüksek olduğu ve bu sayede bu hücrelerin bir by-pass yolağı oluşturarak IGF-1R 'nin PQIP ile inhibisyonunda EGFR miktarını arttırdığı gösterilmiştir. IGF-1R fosforilasyonu inhibe edildiğinde, Shc proteinin EGF üretimini arttırdığı ve EGFR yolağının aktivasyonu ile IGF-1R inhibisyonu sonucu oluşan açığı kapattığı belirlenmiştir. By-pass yolağı hücrelerin IGF-1R bağımlılığını büyük ölçüde ortadan kaldırmaktadır. IGF-1R inhibisyonu olmayan durumlarda p-Shc, EGF miktarını uyarıcı şekilde çalışmamaktadır. İnhibisyon sonucu ortaya çıkan bu yolak hücrelerin bölünmesi için gerekli olan büyüme sinyalinin devamlılığını sağlamaktadır. Yapılan deneylerde IGF-1R 'nin genisteinle regülasyonu sonucu *EGFR* ifadenmesinde de farklılık gerçekleşip gerçekleşmediği incelenmiştir. A549 hücre hatlarında EGFR mRNA seviyelerinin her iki genistein dozunda da azaldığı belirlenmiştir. 1 μ M genistein uygulaması %25 azalmaya, 100 μ M genistein uygulaması da %35 oranında azalmaya yol açmıştır. Transfekte edilen A549 hücrelerinde *EGFR* mRNA seviyelerinin kontrole oranla %40 azaldığı belirlenmiştir. 1 μ M genistein kullanılan hücrelerde inhibisyon miktarı %70'e yükselirken, 100 μ M genistein uygulanan hücrelerde inhibisyon seviyesi %40 olarak ölçülmüştür.

EGFR inhibisyon seviyelerinde p53 miktarına göre farklılık olduğu belirlenmiştir (Tablo 5.6). p53'ün %30 daha az olduğu 1 μ M genistein uygulamasında inhibisyon oranı %25'ten %70'e yükselmiştir. Aynı durum iki kontrol hücresi arasında da %40'lık fark olmasıyla görülebilir. P53 protein seviyelerinde azalma gerçekleşmesi *EGFR* ifadenmesinde baskılanmayı beraberinde getirmiş görülmektedir. 100 μ M genistein uygulamasıysa transfeksiyona bağlı olmaksızın

%40 baskılanmaya yol açmıştır. Aynı dozlarda aynı inhibisyon oranının görülmesi bu durumun siRNA transfeksiyonuyla değil yüksek dozda genistein kullanımıyla bağlantılı olduğunu düşündürmektedir. Zaten bu hücrelerde transfeksiyon gerçekleşmesine rağmen p53 protein miktarlarında azalma görülmemiştir.

H1299 hücrelerinde ise *EGFR* mRNA seviyeleri incelendiğinde doza bağlı olmaksızın %80 baskılanma gerçekleştiği görülmektedir. Her iki hücre hattında da *EGFR* mRNA seviyelerinde gerçekleşen azalmalarla IGF-1R mRNA veya protein seviyeleri açısından bir bağlantı bulunamamıştır (Tablo 5.6).

Tablo 5.6. H1299, A549 ve A549+p53 siRNA hücrelerinde *EGFR* mRNA seviyelerinin genistein uygulamasıyla değişimi.

	A549			A549 + p53 siRNA			H1299		
	G0	G1	G100	G0	G1	G100	G0	G1	G100
EGFR	C	↓	↓	↓	↓	↓	C	↓	↓
(mRNA)									
				*			*		

Akciğer kanseri hücrelerinde EGFR protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı olarak değişimini belirlemek amacıyla A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde western blot yapılarak EGFR protein miktarları belirlenmiştir. A549 hücrelerinde EGFR mRNA seviyeleri genistein uygulamasına bağlı olarak azalırken, EGFR protein seviyelerinde genel olarak artış gözlenmiştir. H1299 hücrelerinde ise mRNA sonuçlarıyla uyumlu olarak her iki dozda da EGFR protein miktarlarında azalma meydana gelmiştir.

A549 hücrelerinde 1 μ M genistein uygulamasıyla kontrol hücrelerinin EGFR seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. 100 μ M genistein uygulanan hücrelerin EGFR protein seviyelerinde %35'lik bir artış belirlenmiştir. Ancak AGS0 ve AGS1 hücreleri arasında EGFR protein seviyesi açısından yine anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. 100 μ M genistein uygulanan transfekte hücrelerde ise %70 oranında artış görülmüştür. Sonuçlar genel olarak incelenirse transfekte edilen her örneğin EGFR protein miktarında kendi kontrolüne oranla bir kat artış gerçekleştiği görülmektedir (Tablo 5.7). Bu durum p53 veya IGF-1R protein

miktarlarına veya genistein dozuna bağlı olarak gerçekleşmemektedir. Her örnekte görülen sabit artış oranının siRNA transfeksiyon işleminin doğrudan bir sonucu olduğu düşünülebilir. Ancak bu durumda transfeksiyon işlemi sonucunda EGFR'ın yıkımını yöneten bir proteinin hedefte olmasa da etkinliğinin engellenmiş olması gerekmektedir. P53 miktarlarındaki değişiklik uygulanan her genistein dozunda aynı olmadığından ve yüksek dozlarda protein miktarındaki artışa rağmen p53 fosforilasyonu gerçekleşmediğinden, bu durumun p53 miktarındaki artışla bağlantılı olduğu söylenemez.

Tablo 5.7. A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde EGFR protein seviyelerinin genistein uygulamasına bağlı değişimi.

		A549	A549+p53 siRNA	H1299
EGFR (Protein)	G0	C	↑	C
	G1	*	↑	↓
	G100	↑	↑	↓

Genisteinin *IGF-1R* ifadenme seviyelerini de düzenlediği bilinmektedir. Bu düzenlemenin IGF-1R promotörünün hangi bölgesinde gerçekleştiğini anlamak için A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerine plazmit aktarımı gerçekleştirilmiştir. Farklı IGF-1R promotör bölgelerinin genistein varlığında ifadenme seviyelerini belirlemek için tüm promotör dizisi (Sıçan full-length -476/+641 ve İnsan full-length -548/+570), sadece 5' flanking bölgesinin dizisi (Sıçan 5' flanking -476/+41) ve sadece 5' UTR bölgesinin dizisini (Sıçan 5' UTR +41/+641) içeren plazmitler kullanılarak hücre hatlarında transfeksiyon gerçekleştirilmiş, tüm genistein dozlarında ifadenme seviyeleri DLR yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

Yapılan deneylerde sıçan IGF-1R full-length (RF), insan IGF-1R full-length (HF) ve sadece sıçan IGF-1R 5' flanking (5F) veya sıçan IGF-1R 5'UTR (5U) bölgelerini içeren plazmitler kullanılmıştır. Her iki hücre hattında da genistein kullanılmadan bütün promotör bölgelerinin bazal ifadenme seviyeleri ölçülmüştür. Hem A549 hem de H1299 hücrelerinde sıçan ve insan full-length promotörleri beklenildiği gibi aynı seviyede ifadenmiştir (Tablo 5.8). Her iki hücre hattında da 5'F bölgesini içeren promotör kontrole göre %40 oranında daha az ifadenmektedir.

5'UTR promotör bölgesinin ifadenmesi ise A549 hücrelerinde kontrole oranla %55 artış gösterirken, H1299 hücrelerinde %75 oranında az ifadenmiştir. Bu durumda p53 tarafından üretimi uyarılan transkripsiyon faktörü Sp1'in hedef aldığı IGF-1R promotör bölgesinin 5'UTR bölgesi olduğu, 5'F bölgesinin ifadenmesinin ise p53'ten bağımsız bir şekilde düzenlendiği sonucuna varılabilir. Farklı IGF-1R promotör bölgelerinin ifadenme seviyelerini belirlemek için yapılan çalışmada elde edilen değerler daha önce prostat kanseri hücre hattı LNCaP hücrelerinde belirlenen değerlerle örtüşmektedir. Bu durum promotörlerin bazal ifadenme seviyelerinin hücre tipinden bağımsız olduğu anlamına gelebilir.

Tablo 5.8. A549 ve H1299 hücrelerinde farklı *IGF-1R* promotör bölgeleri içeren plazmitlerin ifadenme seviyeleri.

	IGF-1R RF	IGF-1R 5'F	IGF-1R 5' UTR	IGF-1R HF
A549	C	↓	↑	*
H1299	C	↓	↓	*

Sıçan promotörüyle transfeksiyon gerçekleştirilen hücrelere bakıldığında 1 μ M genistein uygulanan hücrelerde promotör ifadenme seviyelerinde belirgin artış görülmüştür (Tablo 5.9). Kontrol A549 hücrelerinde bu artış %90 seviyesindeyken, p53 siRNA'sıyla transfekte edilen hücrelerde kontrole göre 3 kat artış belirlenmiştir. Genisteinin düşük dozlarda IGF-1R üretimini uyardığı zaten bilinmekle beraber, bu hücrelerde p53 protein üretiminin gerçekten azaltılmasıyla (%30 baskılanma) üretimin artması önemlidir. Genistein uygulaması yapılmayan ancak p53 siRNA'sıyla transfekte edilen A549 hücrelerinde de IGF-1R miktarı, yalnızca 1 μ M genistein kullanımıyla benzer olarak, iki kat artmıştır. *IGF-1R* ifadenme seviyeleri arasındaki % 90'lık fark 1 μ M genistein uygulaması sonucudur. Bunun yanında p53 miktarındaki azalma da başlı başına gen ifadenmesini artırıcı etki göstermektedir.

Aynı profildeki hücrelere 100 μ M genistein uygulanması sonucunda, normal hücrelerde ifadenme seviyesinin yarıya düştüğü, p53 siRNA'sıyla transfekte edilen hücrelerde ise kontrole aynı kaldığı belirlenmiştir (Tablo 5.9). Daha önce yapılan deneylerde, 100 μ M genistein uygulanan hücrelerde mRNA seviyelerindeki düşüşe rağmen p53 protein seviyelerinin 6 kata kadar yükseldiği belirlenmiştir. SiRNA

transfeksiyonuyla gen ifadenmesi susturulan hücrelerde bu artış iki katla sınırlı kalmaktadır. Normal hücrelerde *IGF-1R* ifadenme seviyesindeki azalma p53 artışına bağlı olarak gerçekleşmiş görünse de, bu durum siRNA'yla transfekte edilen hücrelerin durumunu açıklamaz. Diğer bütün promotör bölgeleri incelendiğinde, p53 susturulmuş hücrelerde 100 μ M genistein uygulanması sonucunda belirgin baskılanma görülmesi, sıçan full-length plazmiti uygulamasında görülen bu durumun deneysel bir hatadan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Sıçan IGF-1R full-length promotörünü içeren plazmitten yeterli miktarda bulunmadığı için deney tekrarlanamamıştır.

P53 negatif H1299 hücreleri aynı koşullarda incelendiğinde 1 μ M genistein uygulamasının *IGF-1R* ifadenme seviyelerini azalttığı ancak bu azalmanın kontrolle arasında anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir (Tablo 5.9). P53 olmamasına rağmen genisteinin düşük dozdaki uyarıcı etkisinin görülmemesi, bu etkinlik için bazal miktarda p53 gereksinimi olabileceğini göstermektedir. 100 μ M genistein uygulamasında ise hücrede IGF-1R ifadenme seviyesi olması gerektiği gibi baskılanarak %90 oranında azalmıştır. Yüksek dozda genistein kullanımının inhibisyon etkisi açıkça görülmektedir.

Tablo 5.9. A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde sıçan full-length *IGF-1R* (RF) promotörünün ifadenme seviyelerinin incelenmesi.

		A549	A549 + p53 siRNA	H1299
IGF-1R RF	G0	C	↑	C
	G1	↑	↑	*
	G100	↓	*	↓

Farklı dozlarda genistein uygulanan hücrelerde *IGF-1R* insan full-length promotörünün ifadenme seviyeleri incelenmiştir. İnsan full-length promotörünün ifadenme profili olarak sıçan full-length promotörüne benzemesi beklenmektedir. A549 hücrelerinde bu durum doğrulanırken, H1299 hücrelerinde farklı hareket ettikleri belirlenmiştir (Tablo 5.10).

A549 hücrelerinde genistein dozuna bağlı olarak *IGF-1R* promotörünün davranışı incelendiğinde beklendiği gibi 1 μ M genistein kullanımıyla IGF-1R üretimi

artarken, 100 μ M genistein kullanımıyla baskılanmaktadır. Sıçan promotöründen farklı olarak artış daha düşük miktarda gerçekleşirken baskılanma yüzdesi artmıştır. Aynı durum *p53* siRNA'sıyla transfekte edilen A549 hücrelerinde de görülmektedir. 1 μ M genistein kullanımıyla sıçan promotörünün etkinliği 4 kat artarken insan promotörü 3 kat artış göstermiştir. Sıçan promotöründen farklı olarak insan promotöründe 100 μ M genistein kullanımına bağlı olarak belirgin baskılanma görülmektedir. Bu durum her iki promotörün genisteinle olan etkileşimlerinde farklılık olduğu şeklinde yorumlanabilir.

H1299 hücrelerinde promotör ifadenme seviyeleri sıçan full-length promotörüyle benzerlik göstermemekle beraber sıçan 5'UTR promotörüyle benzer profil çizmektedir. Düşük dozda genistein uygulamasına bağlı olarak ifadenme seviyesi yaklaşık 2.5 katına çıkmıştır. Yüksek doz genistein kullanımıyla IGF-1R promotör etkinliğinde azalma görülmekle beraber, bu azalma oranı sıçan promotörüne oranla belirgin ölçüde daha düşüktür. Bu durum A549 hücrelerinde görülen farklılığın tam tersine işaret etmektedir. Bu durumda *p53* pozitif hücrelerde genisteinin inhibe etme gücü insan promotöründe daha yüksekken, *p53* negatif hücrelerde sıçan promotöründe daha yüksek olduğu söylenebilir. Diğer promotörler de bu duruma uygun davranış göstermektedir. İfadenme seviyeleri açısından karşılaştırma yapıldığında 5'flanking promotörünün sıçan full-length promotörüyle, 5' UTR promotörünün insan full-length promotörüyle aynı ifadenme profiline sahip olduğu görülmektedir. Aynı şekilde *p53* pozitif hücrelerde yüksek dozda genistein uygulanması sonucunda 5' UTR daha fazla baskılanırken, *p53* negatif hücre hattında 5' flanking promotörünün baskılanma seviyesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 5.10. A549, A549+*p53* siRNA ve H1299 hücrelerinde insan full-length *IGF-1R* (HF) promotörünün ifadenme seviyelerinin incelenmesi.

		A549	A549 + <i>p53</i> siRNA	H1299
IGF-1R HF	G0	C	↑	C
	G1	↑	↑	↑
	G100	↓	↓	↓

Genisteinin düşük ve yüksek dozlarında *IGF-1R* promotörünü farklı yönlerde

etkilediği gösterilmiştir. *IGF-1R* promotörü oldukça uzun bir nükleotid dizisinden oluşmaktadır ve hem 5' flanking, hem de 5' UTR bölgelerinde genisteinin hedef alabileceği çok sayıda bağlanma bölgesi yer almaktadır. Genisteinin inhibisyon etkisini *IGF-1R* promotörünün hangi kısmıyla etkileşime girerek gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla sadece sıçan 5' flanking ve sadece sıçan 5' UTR promotör bölgelerini içeren plazmitlerle A549 ve H1299 hücreleri transfekte edilmişlerdir.

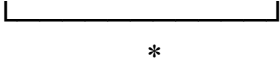
5' flanking promotör bölgesini içeren plazmitle transfekte edilen A549 hücrelerine 1 µM genistein kullanımı sonrası ifadenme seviyelerinde %10 oranında azalma gözlenmiştir. Genistein dozundaki artışa bağlı olarak bu azalmanın oranı %80'e yükselmiştir. *P53* siRNA'sıyla transfekte edilen hücrelerde ise kontrol hücrelerinde baskılanma oranı %35 olarak belirlenmiştir. Bu oran 1 µM genistein uygulamasıyla %45'e, 100 µM genistein uygulamasıyla %85'e yükselmiştir. *P53* ün gerçekten baskılandığı hücrelerde (GS0 ve GS1) baskılanma oranının %35 arttığı görülmektedir. Bu hücrelerde *p53* baskılanma oranları arasında protein ve mRNA seviyelerinde farklılık bulunmamaktadır (Tablo 5.11). Ortamda *p53* azalmasının 5' flanking bölgede baskılanmayı arttırdığı görülmektedir. Ayrıca diğer promotör bölgelerinden farklı olarak 5' flanking promotör bölgesinin ifadenme seviyesi düşük dozlarda genistein uygulanmasıyla da baskılanabilmektedir.

Yüksek doz genistein uygulanmasında ise baskılanma oranları arasında AG100 ve AGS100 hücreleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Bu hücrelerin her ikisinde de farklı oranlarda olmasına rağmen kontrole göre belirgin bir şekilde artmış *p53* proteini bulunmaktadır. Normal hücrelerde *p53* miktarı kontrolün altı katyken transfekte edilen hücrelerde iki katı olarak belirlenmiştir. Bu belirgin farklılığa rağmen baskılanmanın aynı seviyede gerçekleşmesi, baskılanmadan yüksek dozda genistein uygulamasının sorumlu olduğunu göstermektedir. Benzer durum sıçan full-length promotörü dışında tüm diğer promotörlerde görünmekte ve 100 µM genisteinin promotörü baskılama seviyesi %80-95 aralığında değişmektedir.

H1299 hücrelerinde 100 µM genistein kullanımına bağlı olarak 5'F promotör bölgesinin baskılanma miktarının %95 seviyesinde olduğu görülmüştür. Bu durum 100 µM genisteinin etkisinin *p53* seviyesinden bağımsız gerçekleştiği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. 1 µM genistein kullanımında yine baskılanma gerçekleşmesi ve baskılanma seviyesinin *p53* susturulan hücrelerden daha düşük olması genisteinin

en azından bu promotör bölgesinde p53 bağımsız işlev gördüğüne işaret etmektedir (Tablo 5.11).

Tablo 5.11. A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde sıçan *IGF-1R* 5' flanking (5F) bölgesini içeren promotörün ifadenme seviyelerinin incelenmesi.

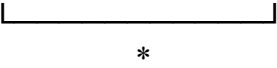
		A549	A549+p53 siRNA	H1299
IGF-1R 5'F	G0	C	↓	C
	G1	↓	↓	↓
	G100	↓	↓	↓
				

5'UTR promotör bölgesini içeren plazmitlerle transfekte edilen hücreler incelendiğinde promotör davranışının genel olarak insan full-length promotörüyle benzerlik gösterdiği görülmektedir (Tablo 5.12). Bu benzerlik özellikle H1299 hücrelerinde göze çarpmaktadır. 1 μ M genistein uygulaması sonucu H1299 hücrelerinde 5'UTR ifadenme seviyesi 2 kat artış göstermiştir. İnsan full-length promotörüyle artış miktarı açısından farklılık bulunmasına rağmen bu davranışı gösteren tek promotör bölgesi 5'UTR 'dir. 100 μ M genistein uygulanması sonucu diğer tüm promotör bölgelerinde olduğu gibi baskılanma gözlenmiş ve ifadenme düzeyinde %85 azalma görülmüştür. Bu oran A549 hücrelerinde daha yüksektir.

A549 hücrelerine 100 μ M genistein verilerek 5'UTR bölgesinin aktivitesi ölçüldüğünde, p53 siRNA transfeksiyonuna bağlı olmaksızın baskılanma gerçekleştiği görülmüştür. İki farklı hücre tipinde baskılanma oranları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

1 μ M genistein uygulanan A549 hücrelerinde 5'flanking bölgesine benzer şekilde baskılanma görülmekle beraber, A549+p53 siRNA hücrelerinde tam tersi bir durum yani promotör ifadenmesinde artış görülmüştür. Bu durumda 5' UTR promotör bölgesinin 5'flanking promotöründe görülenin tersine, düşük doz genistein uygulamalarında ortamdaki p53 miktarından etkilendiği söylenebilir. Özellikle siRNA transfeksiyonu yapılan kontrol hücrelerinin ifadenme seviyelerinin azalması bu durumu destekler niteliktedir.

Tablo 5.12. A549, A549+p53 siRNA ve H1299 hücrelerinde sıçan *IGF-1R* 5' UTR (5'UTR) bölgesini içeren promotörün ifadenenme seviyelerinin incelenmesi.

		A549	A549 + p53 siRNA	H1299
IGF-1R 5'UTR	G0	C	↓	C
	G1	↓	↑	↑
	G100	↓	↓	↓
				

Sonuç olarak genisteinin düşük dozlarda ortamda p53 varlığına ve miktarına bağlı olarak etki gösterdiği, ancak yüksek dozlarda p53 varlığı ve miktarının regülasyonda rol oynamadığı söylenebilir. P53 pozitif hücrelerde genistein – p53 ilişkisinin görüldüğü promotör bölgesi 5'UTR bölgesidir. Bu bölgede düşük doz genistein uygulamaları bile p53 miktarına bağlı olarak promotör ifadenmesini negatif düzenleyebilmektedir. 5'F bölgesi ise gensiteinin düşük dozlarda IGF-1R üretimini uyarıcı etkisini gösterdiği promotör bölgesi gibi görünmektedir. Hücrelerde p53 varlığından bağımsız olarak düşük genistein dozları bu promotör bölgesini uyarabilmektedir.

Genisteinin yüksek dozları ise tüm promotör bölgelerinde baskılanmaya yol açmıştır. Bu durum diğer deneylerden elde edilen IGF-1R mRNA miktarlarındaki azalmayla uyumlu görünmekle birlikte aynı etkinin neden protein seviyelerinde görülmediğini açıklamaz. IGF-1R yapısı gereği çok sayıda farklı tirozin kinaz reseptörüyle heterodimer oluşturabilmektedir. Bu durum IGF-1R'ın yıkımının engellenmesine yol açıyor olabilir. Hücre yüzeyindeki IGF-1R seviyelerinin düzenlenmesi IGF-I ligandına bağlı olarak gerçekleşmektedir. IGF-I bağlandıktan sonra IGF-1R'nin hücre içine veziküllerle translokasyonu gerçekleşmekte ve burada Mdm2 tarafından ubiquitinlenerek yıkıma uğratılmaktadır. Yapılan bir çalışmada bu durumun IGF-1R aktivasyonuna değil IGF-1R'a bağlanan liganda bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. IGF-I varlığı degradasyonu sağlarken, IGF-II de bu etkinin azaldığı, IGF-1R'nin yüksek afiniteyle bağlandığı insülinde ise bazal seviyeye düştüğü belirlenmiştir [Aleksic *et al.*, 2010]. Bu durum protein seviyelerinde azalma görülmemesine yol açabilir.

IGF-1R protein miktarlarında azalma görülmemesinin diğer bir sebebi de deney süresinin 24 saatle sınırlandırılmış olması olabilir. Hücrede zaten aşırı miktarda olan IGF-1R protein miktarında mRNA seviyelerine bağlı bir düşüş görebilmek için daha uzun süre beklenmesi gerekli olabilir. Farklı inhibitörler kullanılmış olsa da A549 hücreleriyle yapılan farklı çalışmalarda IGF-1R protein miktarındaki düşüşler 48. ve 72. saatlerde belirgin seviyede görülmektedir. Bu durumu test etmek adına daha sonra yapılacak çalışmalarda deneyler süre 48 ve 72 saatlere uzatılarak tekrarlanabilir.

Yapılan deneyler sırasında hücre ölümü görülmemesinin sebebi olarak da deney süresinin 24 saat gibi kısa bir süre olması düşünülmektedir. Temel olarak sinyal yolağının işleyişi incelenmek istendiğinden deneyler mRNA seviyelerinin transfeksiyonla değişiminin daha doğru belirlenebileceği 24 saatlik periyotla sınırlandırılmıştır. Hücreler daha uzun süreler genisteine maruz bırakıldığında hücre ölümü gerçekleştiği görülmüştür. A549 hücreleri 100 μ M genistein uygulamasından yaklaşık 60 saat sonra incelendiğinde %40 oranında hücre ölümü gerçekleştiği belirlenmiştir. H1299 hücrelerinde de 100 μ M genistein uygulaması sonucu 48 saat sonunda %60 oranında hücre ölümü gerçekleşmektedir. Hücre ölümüne sebep olan mekanizmanın belirlenmesi için daha uzun süreler genisteine maruz bırakılan hücrelerin de protein ve mRNA seviyeleri açısından incelenmesi daha sağlıklı sonuçlar elde etmeyi sağlayabilir.

Hücre ölümünün ve yolak inhibisyonunun gerçekleşmemesinin p-p53 kaynaklı olup olmadığını anlamak için hücrelerde ya Mdm2 inhibisyonu yoluyla veya p14 gen ifadenmesinin onarımıyla p-p53 seviyelerinde artış sağlanmalı ve deneyler tekrarlanmalıdır. A549 hücre hatları üzerinde farklı bir izoflavon kullanılarak yapılan bir çalışmada p53 protein miktarındaki artışla beraber Mdm2 gen ifadenmesi ve protein seviyeleri azaltıldığında p-p53 seviyeleri belirgin bir artış göstermiş ve A549 hücrelerinde büyük oranda ölüm gerçekleşmiştir [Fu *et al.*, 2017]. A549 hücreleriyle yapılan farklı bir çalışmada bu sefer p53 stabilizasyonunu sağlamak için ubiquitinasyonu engelleyen *WDR5* geninin ifadenmesi arttırılmış, bunun sonucunda p53 protein miktarlarının arttığı ve hücre bölünmesinin durdurulduğu belirlenmiştir. Ancak p-p53 seviyelerinde herhangi bir artış görülmemekte ve apoptoz gerçekleşmemektedir [Xie *et al.*, 2017]. Bu durum yapılan deneyler sonucu

oluşturulan hipotezi desteklemekte ve p53 miktarındaki artışın hücre ölümü için yeterli olmadığını p-p53 seviyelerinde artışın beraberinde gelmesi gerektiğini göstermektedir.

Sonuç olarak çalışılan akciğer kanseri hücrelerinde genisteinin yüksek dozları bile IGF-1R miktarını azaltmada 24 saatlik süre içerisinde yeterli gelmemektedir. Bu durumun hem hücrelerin *Ras* mutasyonu taşımasıyla, hem de hücrelerde IGF-1R ifadenmesini düzenlemede rol oynadığı düşünülen p53 proteininin aktif formda bulunmamasıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Promotör ifadenme seviyeleri ve IGF-1R mRNA seviyeleri dikkate alındığında genisteinin beklenildiği gibi ifadenmeyi baskıladığı görülmektedir. Bunun yanında genistein daha önceki çalışmalarda da gösterilen p53 protein miktarını artırma, hücre iskelet yapısına zarar verme ve hücre bölünmesini durdurma etkilerini de göstermektedir. Bu sonuçlar bize genistein-IGF-1R ilişkisinde beklenen etkinin görülmemesinin hücre özelliklerinden kaynaklandığını göstermektedir. Genistein-IGF-1R ilişkisinde p53'ün rolünü belirlemek için deneyler p-p53 mekanizmasında hasar bulunmayan ve *Ras* mutasyonu taşımayan, IGF-1R fazla ifadelenen farklı hücrelerde tekrarlanmalı veya A549 ve H1299 hücrelerinde *mutRas* ifadenmesi engellenerek deneyler tekrarlanmalıdır. Bunun dışında hücrelerin p14 ifadenmesi onarılarak veya Mdm2 ifadenmesi baskılanarak p-p53 seviyelerinde artış sağlanmalı ve genistein uygulamasıyla hücrelerin mRNA ve protein seviyelerindeki değişimler tekrar incelenmelidir. Hücre ölümü gözlemleyebilmek için ise deney süreleri uzatılarak apoptotik hücrelerin oranları belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

- Abbott A. M., Bueno R., Pedrini M.T., Murray J.M., Smith R.J., (1992), "IGF-1R gene structure", *Journal of Biology and Chemistry*, 267, 10759-10763.
- Adams T. E., Epa V. C., Garrett T. P., Ward C.W., (2000), "Structure and function of the IGF-1R", *Cell Molecular Life Science*, 57, 1050-1093.
- Adlercreutz H, Markkanen H, Watanabe S, (1993), "Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men", *Lancet*, 342, 1209-1210.
- Agarwal M. L., Taylor W. R., Chernov M. V., Chernova O. B., Stark G. R., (1998), "The p53 network", *Journal of Biology and Chemistry*, 273, 1-4.
- Agullo-Ortuno M. T., Diaz-Garcia C. V., Agudo-Lopez A., Pérez C., Cortijo A., Paz-Ares L., Lopez-Rios F., Pozo F., Castro J., (2015), "Relevance of IGF-1R gene expression as a prognostic factor in NSCLC", *Journal of Cancer Research Clinic Oncology*, 141, 43-53.
- Ahmad I., Forman J., Sarkar F., Hillman G., Heath E., Vaishampayan U., (2010), "Soy isoflavones in conjunction with radiation therapy in patients with prostate cancer", *Nutrition Cancer*, 62, 996-1000.
- Aleksic T., Chitnis M. M., Perestenko O. V., (2010), "IGF-1R translocates to the nucleus of human tumor cells", *Cancer Research*, 70, 6412-9.
- Ali S., Varghese L., Pereira L., Tulunay-Ugur O. E., Kucuk O., Carey T. E., Wolf G. T., Sarkar F. H., (2009), "Sensitization of squamous cell carcinoma to cisplatin induced killing by natural agents", *Cancer Letters*, 278, 201-209.
- Allred C. D., Allred K. F., Ju Y. H., Virant S. M., Helferich W. G., (2001) "Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent tumors in a dose-dependent manner", *Cancer Research*, 61, 5045-5050.
- Ando K., Hirao S., Kabe Y., Ogura Y., Sato I., Yamaguchi Y., (2008) "A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA binding activity", *Nucleic Acids Research*, 36, 4327-4336.
- Andreescu S., Sadik O. A., McGee D. W., (2005), "Effect of Natural and Synthetic Estrogens on A549 Lung Cancer Cells: Correlation of Chemical Structures with Cytotoxic Effects", *Chemical Toxicology*, 18, 466-474.
- Asmane I., Watkin E., Alberti L., (2012), "IGF-1R exclusive nuclear staining: a predictive biomarker for IGF-1R monoclonal antibody therapy in sarcomas",

European Journal of Cancer, 48, 3027-35.

Balabhadrapathruni S., Thomas T. J., Yurkow E. J., Amenta P. S., Thomas T., (2000), "Effect of genistein and structurally related phytoestrogens on cells cycle kinetics and apoptosis in MDA-MB-468 breast cancer cells", *Oncology Reports*, 7, 3-12.

Banerjee S. Y., Li S., Wang Z., Sarkar F. H., (2008) "Multi-targeted therapy of cancer by genistein", *Cancer Letters*, 269(2), 226-242.

Banerjee S., Zhang Y., Ali S., Bhuiyan M., Wang Z., Chiao P. J., Philip P. A., Abbruzzese J., Sarkar F. H., (2005), "Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine by genistein in vitro and in vivo using an orthotopic model of pancreatic cancer", *Cancer Research*, 65, 9064-9072.

Barnes C. J., Ohshiro K., Rayala S. K., El-Naggar A. K., Kumar R., (2007), "IGF-1R as a Therapeutic Target in Head and Neck Cancer", *Clinic Cancer Research*, 13(14), 4291-4299.

Barnes S., (1997), "The chemopreventive properties of soy isoflavonoids in animal models of breast cancer", *Breast Cancer Research*, 46, 169-179.

Baserga R., Hongo A., Rubini M., Valentinis B., (1997), "The IGF-1R in cell growth, transformation and apoptosis", *Biophysics*, 1332, F105-F126.

Baserga R., (2009), "Customizing the targeting of IGF-1R", *Future Oncogenetics*, 5, 43-50.

Baud V., Karin M., (2001), "Signal transduction by TNF and its relatives", *T Cell Biology*, 11, 372-377.

Beitner-Johnson D., Werner H., Roberts C. T., LeRoith D., (1995), "Regulation of IGF-1R gene expression by Sp1", *Molecular Endocrinology*, 9, 1147-1156.

Belfiore A., (2007), "The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer", *Current Pharmacology*, 13, 671-686.

Bergmann U., Funatomi H., Yokoyama M., Beger H. G., Korc M., (1995), "IGF-I overexpression in human pancreatic cancer: autocrine and paracrine roles", *Cancer Research*, 55(10), 2007-2011.

Bermont L., Lamielle F., Fauconnet S., Esumi H., Weisz A., Adessi G. L., (2000), "Regulation of VEGF expression by IGF-I in endometrial adenocarcinoma cells", *International Journal of Cancer*, 85, 117-123.

Bhalla N., (2003), "Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis", *Oncogene*, 22, 9075-9086.

Bhanot A., Sharma R., Noolvi M. N., (2011), "Natural sources as potential anti-

cancer agents: a review”, *International Journal of Phytomedicine*, 3(1), 9-26.

Bid H. K., Zhan J., Phelps A., (2012), “Potent inhibition of angiogenesis by the IGF-1R targeting ab SCH717454 is reversed by IGF-2”, *Cancer Therapy*, 11, 649-59.

Blakesley V. A., Scrimgeour A., Esposito D., Le Roith D., (1996), “Signaling via the IGF-1R: does it differ from insulin receptor signaling”, *Cytokine Growth Factor Review*, 7, 153-159.

Boccardo F., Rubagotti A., Battaglia M., Bertaccini A., Romagnoli A., (2006), “Influence of bicalutamide with or without tamoxifen or anastrozole on IGF1 and binding proteins in prostate cancer patients”, *International Journal of Biological Markers*, 21(2), 123-6.

Bodzin A. S., Wei Z., Hurtt R., (2012), “Gefitinib resistance in HCC mahlavu cells: upregulation of CD133 expression, activation of IGF-1R signaling pathway, and enhancement of IGF-1R nuclear translocation”, *Journal of Cell Physiology*, 227, 2947-52.

Borellini F., Glazer R. I., (1993), “Induction of Sp1-p53 DNA-binding heterocomplexes during granulocyte/macrophage colony stimulating factor dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1”, *Journal of Biology and Chemistry*, 268, 7923-7928.

Brahmkhatri V. P., Prasanna C., Atreya1 H. S., (2015), “Insulin-Like Growth Factor System in Cancer: Novel Targeted Therapies”, *BioMed Research*, 538019.

Brazil D. P., Yang Z. Z., Hemmings B. A., (2004), “Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts”, *Trends Biochemistry Science*, 29, 233-42.

Brown E. N., Papadimitrakopoulou V. A., Liu D. D., (2006), “The prognostic role of loss of IGFBP3 expression in head and neck carcinogenesis”, *Cancer Letters*, 239(1), 136-143.

Buck E., Eyzaguirre A., Rosenfeld M., (2008), “Feedback mechanisms promote cooperativity for small molecule inhibitors of epidermal and IGFRs”, *Cancer Research*, 68(20), 8322-8332.

Burgaud J. L., Resnicoff M., Rotman H. L., Abraham D., Baserga R., (1995), “Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of IGF-1R”, *Cancer Research*, 55, 3739-3741.

Busso C. S., Iwakuma T., Izumi T., (2009), “Ubiquitination of mammalian AP endonuclease (APE1) regulated by the p53-MDM2 signaling pathway”, *Oncogene*, 28, 1616-1625.

Canonici A., Steelant W., Rigot V., Khomitch-Baud A., Boutaghou-Cherid H.,

Bruyneel E., Van Roy F., Andre F., (2008), "IGF-1R, E-cadherin and α v integrin form a dynamic complex under the control of α -catenin", *International Journal of Cancer.*, 122, 572-582.

Cappelletti V., Fioravanti L., Miodini P., Di Fronzo G., (2000), "Genistein blocks breast cancer cells in the G2/M phase of the cell cycle", *Journal of Biology and Chemistry*, 79, 594-600.

Carboni J. M., Wittman M., Yang Z., (2009), "BMS-754807, a small molecule inhibitor of insulin-like growth factor-1R/IR", *Molecular Cancer Therapy*, 8, 3341-9.

Carden C. P., Kim E. S., Jones R. L., Alam S. M., Johnson F. M., (2010), "Phase I study of intermittent dosing of OSI-906, a dual tyrosine kinase inhibitor of IGF-1R and IR in patients with advanced solid tumors", *Journal of Clinic Oncology.*, 28, 2530.

Cerfolio R. J., Bryant A. S., Scott E., (2006), "Women with pathologic stage I, II, and III NSCLC have better survival than men", *Chest*, 130, 1796-1802.

Chakravarti A., Loeffler J., Dyson N., (2002), "IGF-1R mediates resistance to anti-EGFR therapy in human glioblastoma cells through continued activation of PI3K signaling", *Cancer Research*, 62, 200-207.

Chan J. M., Stampfer M. J., Giovannucci E., (1998), "Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk", *Science*, 279(5350), 563-566.

Chang Y. S., Wang L., Suh Y. A., (2004), "Mechanisms underlying lack of IGFBP-3 expression in nonsmall- cell lung cancer", *Oncogene*, 23(39), 6569-6580.

Changhui M., Tianzhong M., Zhongjing S., Ling C., Ning W., Ningxia Z., Xiancai C., Haibin C., (2009), "Silencing of TNFR1 by siRNA in EC109 cells affects cell proliferation and apoptosis", *Journal of Biomedical Biotechnology*, 760540.

Chen H. W., Márquez-Garbán D. C., Goodglick L., Pietras R. J., (2007), "Estrogen receptor signaling pathways in human NSCLC", *Steroids*, 72(2), 135-143.

Chen R., Sweet-Cordero E. A., (2013), "Combining IGF1R and MEK blockade as a promising novel treatment strategy against KRAS-mutant lung cancer", *Cancer Discovery*, 3, 491-3.

Chun K. H., Kosmeder J. W., Sun S., (2003), "Effects of deguelin on the PI3K/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells", *Journal of National Cancer Institue*, 95(4), 291–302.

Clemmons D. R., (2007), "Modifying IGF-1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer", *National Drug Discovery*, 6, 821-33.

Cohn A. L., Tabernero J., Maurel J., (2013), “A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab or conatumumab in combination with FOLFIRI for second-line treatment of mutant KRAS metastatic colorectal cancer”, *Oncology*, 24, 1777-85.

Coleman M. E., Demayo F., Geske R., Montgomery C., Schwartz R. J., (1995), “Myogenic vector expression of IGFI stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice”, *Journal of Biology and Chemistry*, 270(20), 12109–12116.

Condorelli G., Bueno R., Smith R. J., (1994), “Two alternatively spliced forms of the human IGF-1R have distinct biological activities and internalization kinetics”, *Journal of Biology and Chemistry*, 269, 8510-8516.

Constantinou A. I., Kamath N., Murley J. S., (1998), “Genistein inactivates bcl-2, delays the G2/M phase of the cell cycle, and induces apoptosis of human breast adeno-carcinoma MCF-7 cells”, *European Journal of Cancer*, 34, 1927-1934.

Cooper W. A., Lam D. C., O’Toole S. A., Minna J. D., (2013), “Molecular biology of lung cancer”, *Journal of Thorac Disease*, 5, S479-S490.

Cosaceanu D., Carapancea M., Alexandru O., Budiu R., Martinsson H. S., Starborg M., Vrabete M., Kanter L., Lewensohn R., Dricu A., (2007), “Comparison of three approaches for inhibiting IGF-1R and their effects on NSCLC cell lines in vitro”, *Growth Factors*, 25, 1-8.

Costello M., Baxter R. C., Scott C. D., (1999), “Regulation of soluble IGF II mannose 6-phosphate receptor in human serum: measurement by enzyme-linked immunosorbent assay”, *The Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(2), 611-617.

Craddock B. P., Miller W. T., (2012), “Effects of somatic mutations in the C-terminus of IGF-1R on activity and signaling”, *Journal Signal Transduction*, 804801.

Craparo A., O'Neill T. J., Gustafson T. A., (1995), “Non-SH2 domains within IRS1 and SHC mediate their phosphotyrosine-dependent interaction with the NPEY motif of the insulin-like growth factor I receptor”, *Journal of Biology and Chemistry*, 270, 15639-15643.

Cui H., Cruz-Correa M., Giardiello F. M., (2003), “Loss of IGF-II imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk,” *Science*, 299(5613), 1753-1755.

Cun Y., Dai N., Li M., Xiong C., Zhang Q., Sui J., Qian C., Wang D., (2014), “APE1/Ref-1 enhances DNA binding activity of mutant p53 in a redox-dependent manner”, *Oncology reports*, 31, 901-909.

Davis J. N., Kucuk O., Sarkar F. H., (2002), “Expression of prostate-specific antigen

is transcriptionally regulated by genistein in prostate cancer cells”, *Molecular Carcinogenesis*, 34, 91-101.

Davis J., Singh B., Bhuiyan M., Sarkar F., (1998), “Genistein-induced upregulation of p21, downregulation of cyclin B, induction of apoptosis in prostate cancer cells”, *National Cancer*, 32, 123-131.

DiGiovanni J., Bol D. K., Wilker E., Beltran L., Ramirez A., Jorcano J., Kiguchi K., (2000), “Constitutive expression of IGF-1 in epidermal basal cells of transgenic mice leads to spontaneous tumor promotion”, *Cancer Research*, 60, 1561-1570.

Ding H., Duan W., Zhu G., (2003), “p21 response to DNA damage induced by genistein and etoposide in NSCLC”, *Biochemistry Biophysics Community*, 305, 9506.

Duffy C., Perez K., Partridge A., (2007), “Implications of phytoestrogen intake for breast cancer”, *Cancer Journal Clinic*, 57, 260-77.

Dupont J., Holzenberger M., (2003), “IGF type 1 receptor: a cell cycle progression factor that regulates aging”, *Cell Cycle*, 2, 270-272.

El Touny L. H., Banerjee P. P., (2009), “Identification of a biphasic role for genistein in the regulation of prostate cancer growth and metastasis”, *Cancer Research*, 69, 3695-3703.

Escande A., Pillon A., Servant N., Cravedi J. P., Larrea F., Muhn P., Nicolas J. C., Cavailles V., Balaguer P., (2006), “Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing ER α or β ”, *Biochemical Pharmacology*, 71(10), 1459-1469.

Evans T. L., Lynch T. J., (2001), “Lung cancer”, *Oncologist*, 6, 407-414.

Favelyukis S., Till J. H., Hubbard S. R., Miller W. T., (2001), “Structure and autoregulation of the IGF-1R kinase”, *National Structure Biology*, 8, 1058-1063.

Feldman D., Jogie-Brahim S., Oh Y., (2009), “Unraveling IGFBP3 actions in human disease”, *Endocrinology Review*, 30, 417-437.

Ferber A., D’Ambrosio C., Resnicoff M., Baserga R., (1996), “A soluble IGF-1R that induces apoptosis of tumor cells in vivo and inhibits tumorigenesis”, *Cancer Research*, 56, 4013-4020

Fidler M., Gimelfarb A., Basu S., Fhied C., Kaiser K., (2009), “IGFBPs and response in advanced NSCLC patients treated with erlotinib”, *Journal of Thorac Oncology*, 7.

Firth S. M., Baxter R. C., (2002), “Cellular actions of the IGFBPs”, *Endocrinology Review*, 23, 824-54.

Frattali A. L., Pessin J. E., (1993), "Relationship between α subunit ligand occupancy and β subunit autophosphorylation in insulin/IGF-I hybrid receptors", *Journal of Biology and Chemistry*, 268, 7393-7400.

Freeman D. J., Li A. G., Wei G., Li H. H., Kertesz N., Lesche R., (2002), "PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms", *Cancer Cell*, 3, 117-30.

Friedbichler K., Hofmann M., Kroeze M., (2013), "Pharmacodynamic and antineoplastic activity of BI 836845, a fully human IGF ligand neutralizing ab, and mechanistic rationale for combination with rapamycin", *Cancer Therapy*, 13, 399-409.

Fritz W. A., Wang J., Eltoum I. E., Lamartiniere C. A., (2002), "Dietary genistein down-regulates androgen and estrogen receptor expression in the rat prostate", *Molecular Cell Endocrinology*, 186, 89-99.

Fu S., Yang Y., Liu D., Luo Y., (2017), "Flavonoids and Tannins from Smilax china L. Rhizome Induce Apoptosis Via Mitochondrial Pathway and MDM2-p53 Signaling in Human Lung Adenocarcinoma Cells", *The American Journal of Chinese Medicine*, Vol. 45, No. 2, 1-16

Gadgeel S., Ali S., Philip P. A., Wozniak A., Sarkar F. H., (2009), "Genistein enhances the effect of EGFR tyrosine kinase inhibitors and inhibits NF- κ B in NSCLC cell lines", *Cancer*, 115, 2165-2176.

Gao Y., Katki H., Graubard B., Pollak M., Martin M., Tao Y., Schoen R. E., Church T., Hayes R. B., Greene M. H., Berndt S. I., (2012), "Serum IGF1, IGF2 and IGFBP3 and risk of advanced colorectal adenoma", *International Journal of Cancer*, 131, E105-E113.

Garcia J. A., Elson P., Cooney M. M., (2013), "Inhibition of the IGF pathway in metastatic CRPC: results from a phase II study of OSI-906 (linsitinib)", *Journal Clinic Oncology*, 31, E16022.

Garrouste F., Remacle-Bonnet M., Heller S., Pommier G. J., (2000), "IGF-I protects colon cancer cells from death factor-induced apoptosis by potentiating TNF α -induced MAPK and NF- κ B signaling pathways", *Cancer Research*, 60, 2007-2017.

Giaccia A. J., Kastan M. B., (1998), "The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals", *Genes*, 12, 2973-2983.

Goel H. L., Fornaro M., Moro L., Teider N., Rhim J. S., King M., Languino L., (2004), "Selective modulation of IGF-1R signaling and functions by β 1 integrins", *Journal Cell Biology*, 166, 407-418.

Goetsch L., Gonzalez A., Leger O., Beck A., Pauwels P. J., Haeuw J. F., Corvaia N., (2005), "A recombinant humanized anti-IGF-1R antibody (h7C10) enhances the antitumor activity of vinorelbine and anti-EGFR therapy against human cancer xenografts", *International Journal Cancer*, 113, 316-328.

Gong L., Li Y., Nedeljkovic-Kurepa A., Sarkar F. H., (2003), "Inactivation of NF- κ B by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells", *Oncogene*, 22, 4702-4709.

Gong Y., Yao E., Shen R., (2009), "High expression levels of total IGF-1R and sensitivity of NSCLC cells in vitro to an anti-IGF-1R ab", *PLoS One*, 4(10), e7273.

Gong H. C., Wang S., Mayer G., Chen G., Leesman G., Singh S., Beer D. G., (2011) "Signatures of Drug Sensitivity in NSCLC", *International Journal of Proteomics*, 215496.

Gottesman M. M., (2002), "Mechanisms of cancer drug resistance", *Review of Medicine*, 53, 615-627.

Greenlee R., Murray T., Bolden S., Wingo P., (2000), "Cancer statistics", *Cancer Journal Clinic*, 50, 7-33.

Haase M. G., Klawitter A., Geyer P., Alheit H., Baumann M., Kriegel T. M., (2003), "Sustained elevation of NF- κ B DNA binding activity in radiation-induced lung damage in rats", *International Journal of Radiation Biology*, 79, 863-877.

Haluska P., Menefee M., Plimack E., Rosenberg J., Northfelt D., LaVallee T., (2012), "Safety, pharmacokinetics and antitumor activity of MEDI-573, an investigational monoclonal antibody that targets IGF-I and IGF-II, in adult patients with advanced solid tumors", *Journal Clinic Oncology*, 30, 2618.

Haluska P., Shaw H., Batzel G., Yin D., Molina J., Molife L., Roberts M., Bono J., (2007), "Phase I dose escalation study of the anti IGF-1R monoclonal antibody CP-751,871 in patients with refractory solid tumors", *Clinic Cancer Research*, 13, 5834-5840.

Haluska P., Carboni J. M., TenEyck C., Attar R. M., Hou X., Yu C., Sagar M., Wong T. W., Erlichman C., (2008), "HER receptor signaling confers resistance to the IGF-1R inhibitor BMS-536924", *Mol.ecular Cancer Therapy*, 7, 2589-2598.

Han R. N., Post M., Lye S. J., (2003), "IGF-1R mediated vasculogenesis, angiogenesis in human lung development", *Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*, 28, 159-169.

Han D. H., Tachibana H., Yamada K., (2001), "Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by isoflavonoids", *In Vitro Cell Biology*, 37, 275-282.

Hankinson S. E., Willett W. C., Colditz G. A., (1998), "Circulating concentrations of IGF-I and risk of breast cancer", *Lancet*, 351(9113), 1393-1396.

Hansen H. H., (2002), "Treatment of advanced NSCLC", *BMJ*, 325, 452-453.

Heim K. E., Tagliaferro R., (2002), "Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationship", *Journal Nutrition Biochemistry*, 13, 572-584.

Hermann R. M., Fest J., Christiansen H., Hille A., Rave M., Nitsche M., Jarry H., (2007), "Radiosensitization dependent on p53 function in bronchial carcinoma cells by the isoflavone genistein and estradiol in vitro", *Strahl Onkology*, 183, 195-202.

Hershberger P. A., Vasquez A. C., Kanterewicz B., Land S., Siegfried J.M., Nichols M., (2005), "Regulation of endogenous gene expression in human NSCLC cells by ER ligands", *Cancer Research*, 65(4), 1598-1605.

Hewish M., Chau I., Cunningham D., (2009), "IGF-1R Targeted Therapeutics: Novel Compounds and Novel Treatment Strategies for Cancer Medicine", *Anti-Cancer Drug Discovery*, 4, 54-72.

Hillman G. G., Singh-Gupta V., (2011), "Soy Isoflavones Sensitize Cancer Cells to Radiotherapy: From Bench to Clinic", *Radical Biology and Medicine*, 51, 289-98.

Hirsch F. R., Bunn P. A., Di Maria V., Veve R., Bremmes M., Baron E., Zeng C., Franklin A., (2003), "EGFR in NSCLC: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis", *Journal of Clinic Oncology*, 21, 3798-3807.

Hou X., Huang F., Macedo F., (2011), "Dual IGF-1R/InsR inhibitor BMS-754807 synergizes with hormonal agents in treatment of estrogen-dependent breast cancer", *Cancer Research*, 71, 7597- 607.

Huang F., Hurlburt W., Greer A., (2010), "Differential mechanisms of acquired resistance to IGF-1R antibody therapy or to a small-molecule inhibitor, BMS-754807, in a human rhabdomyosarcoma model", *Cancer Research*, 70, 7221-31.

Idelman G., Glaser T., Roberts C. T., Werner H., (2003), "WT1-p53 interactions in IGF-1R gene regulation", *Journal of Biology and Chemistry*, 278, 3474-3482.

Jameson M. J., Taniguchi L. E., Vankoeving K. K., (2012), "Activation of the IGF-1R alters p27 regulation by the EGFR in oral squamous carcinoma cells", *Journal of Oral Pathology Medicine*, 42, 332-8.

Jaramillo M., Banville M., Collins C., Paul B., Bourget L., O'Connor M., (2008), "Differential sensitivity of A549 NSCLC responses to EGFR pathway inhibitors",

Cancer Biology Therapy, 7, 557-568.

Jarzynka M. J., Guo P., Bar-Joseph I., Hu B., Cheng S., (2006), "Estradiol and nicotine exposure enhances A549 bronchioloalveolar carcinoma xenograft growth in mice through the stimulation of angiogenesis", *International Journal of Oncology*, 28(2), 337-344.

Ji Q. S., Mulvihill M. J., Rosenfeld-Franklin M., (2007), "A novel, potent, and selective IGF-1R kinase inhibitor blocks IGF-1R signaling in vitro and inhibits IGF-1R dependent tumor growth in vivo", *Molecular Cancer Therapy*, 6, 2158-67.

Jin H., Tucker S., Liu H., Wei X., Yom S., Wang S., (2009), "Dose-volume thresholds and smoking status for the risk of treatment-related pneumonitis in inoperable NSCLC treated with definitive radiotherapy", *Radiation Oncology*, 91, 427-32.

Jones J. I., Clemmons D. R., (1995), "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions", *Endocrine Review*, 16, 3-34.

Jones R. A., Campbell C. I., Gunther E. J., Chodosh L. A., Petrik J. J., Khokha R., Moorehead A., (2007), "Transgenic overexpression of IGF-IR disrupts mammary ductal morphogenesis and induces tumor formation", *Oncogene*, 26, 1636-1644.

Jones E., Goddard L., Hiscox S., Rubini M., Barrow D., Knowlden J., Williams S., Wakeling E., (2004), "IGF-1R signalling and acquired resistance to gefitinib in human breast and prostate cancer cells", *Endocrine Related Cancer*, 11, 793-814.

Kaleko M., Rutter W. J., Miller A.D., (1990), "Overexpression of the IGF-1R promotes ligand-dependent neoplastic transformation", *Molecular Cell Biology*, 10, 464-473.

Karmali R., Fidler M. J., Cela I., Olmsted G., Rouhi O., Basu S., (2010), "IGFBPs related to progression free survival and overall survival in advanced NSCLC patients treated with chemotherapy", *Journal of Clinical Oncology*, 28, 7553.

Karp D., Paz-Ares L. G., Blakely L. J., Kreisman H., Eisenberg P. D., (2007), "Efficacy of the anti-IGF-IR antibody CP-751871 in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment for advanced NSCLC", *Journal of Clinical Oncology*, 25, 7506.

Kawai H., Ishii A., Washiya K., (2005), "ER α / β are prognostic factors in NSCLC", *Clinical Cancer Research*, 11(14), 5084-5089.

Kern E., Pieterpol A., Kinzler K., Vogelstein B., (1992), "Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression", *Science*, 256, 827-830.

Kiely P. A., O'Gorman D., Luong K., Ron D., O'Connor R., (2006), "IGF I controls a

mutually exclusive association of RACK1 with protein phosphatase 2A and β 1 integrin to promote cell migration”, *Molecular Cell Biology*, 26, 4041-4051.

Kim B, Cheng H. L., Margolis B., Feldman E. L., (1998), “IRS2 and Shc play different roles in IGF I signaling”, *Journal of Biology and Chemistry*, 273, 34543-34550.

Kim H., Lin X., Lewis M., Wong T., Attar R., Lee A., (2007), “Constitutively active IGF-1R causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF- κ B and snail”, *Molecular Cell Biology*, 27, 3165-3175.

Kim W. Y., Jin Q., Oh S. H., Kim E. S., Yang Y. J., Lee D. H., (2009), “Elevated epithelial IGF expression is a risk factor for lung cancer development”, *Cancer Research*, 69, 7439-48.

Kim Y., Prudkin L., Feng L., Kim S., Hennessy B., Lee J. S., (2012), “EGFR and K-Ras mutations and resistance of lung cancer to IGF-1R tyrosine kinase inhibitors”, *Cancer*, 118, 3993-4003.

Kohda M., Hoshiya H., Katoh M., Tanaka I., Masuda R., Takemura T., Fujiwara M., Oshimura M., (2001), “Frequent loss of imprinting of IGF-II and MEST in lung adenocarcinoma”, *Molecular Carcinogenesis*, 31, 184-191.

Kong M., Hayman A., Griffith A., Arenberg D., Lyons S., (2006), “Final toxicity results of a radiation-dose escalation study in patients with NSCLC: predictors for radiation pneumonitis and fibrosis”, *International Journal of Radiation Oncology Biology*, 65, 1075-86.

Kousidou O. C., Tzanakakis G. N., Karamanos N. K., (2006), “Effects of the natural isoflavonoid genistein on growth, signaling pathways and gene expression of matrix macromolecules by breast cancer cells”, *Medical Chemistry*, 6, 331-337.

Kuiper G., Lemmen G., Barlsson B., (1998), “Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with ER β ”, *Endocrinology*, 139, 4252-63.

Kuribayashi A., Kataoka K., Kurabayashi T., Miura M., (2004), “Evidence that basal activity, but not transactivation, of the EGFR tyrosine kinase is required for IGF-I induced activation of extracellular signal-regulated kinase in oral carcinoma cells”, *Endocrinology*, 145(11), 4976-4984.

Lattrich C., Lubig J., Ortmann O., Treeck O., (2011), “Additive effects of trastuzumab and genistein on human breast cancer cells”, *Anti Cancer Drugs*, 22, 253-261.

Lee C., Jeon J., Kim H., Shin D., Roh T., Ahn C., Chang Y., (2008), “Clinical significance of IGF-1R expression in stage I NSCLC: immunohistochemical

analysis”, Korean Journal of Medicine, 23, 116-120.

Lee Y., Moon H., Chun H., Chang S., Hassan K., Ji L., Lotan R., Khuri R., Hong K., (2004), “Effects of IGFBP3 and farnesyltransferase inhibitor SCH66336 on Akt expression and apoptosis in NSCLC cells”, Journal of National Cancer Institution, 96, 1536-1548.

Lee M. M., Gomez S. L., Chang J. S., Wey M., Wang R. T., Hsing A. W., (2003), “Soy and isoflavone consumption in relation to prostate cancer risk in China”, Cancer Epidemiologic Biology, 12, 665-668.

Lee S. A., Shu X. O., Li H., Yang G., Cai H., Wen W., (2009), “Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk”, Journal of Clinic Nutrition, 89, 1920-1926.

Lee J., Imsumran A., Park Y., Kwon Y., Han K., Shim S., Piao W., Lee T., (2007), “Adenovirus expressing shRNA to IGF-1R enhances the chemosensitivity of lung cancer cell lines by blocking IGF-1 pathway”, Lung Cancer, 55, 279-286.

LeRoith D., Werner H., Beitner-Johnson D., (1995), “Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor”, Endocrinology Review, 16, 143-63.

LeRoith D., Werner H., Neuenschwander S., Kalebic T., Helman L. J., (1995), “The role of the IGF-1R in cancer”, Academic Science, 766, 402-408.

Li Y., Ahmed F., Ali S., Kucuk O., Sarkar F. H., (2005), “Inactivation of NF- κ B by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells”, Cancer Research, 65, 6934-6942.

Li Y., Sarkar F. H., (2002), “Gene expression profiles of genistein-treated PC3 prostate cancer cells”, Journal of Nutrition, 132, 3623-3631.

Li Y., Wang Z., Kong D., Li R., Sarkar S. H., Sarkar F. H., (2008), “Regulation of Akt/FOXO3a/GSK-3 β /AR signaling network by isoflavone in prostate cancer cells”, Journal of Biology and Chemistry, 283, 27707-27716.

Li Q., Chen H., (2011), “Epigenetic modifications of metastasis suppressor genes in colon cancer metastasis”, Epigenetics, 6, 849-852.

Li Y., Kong D., Wang Z., Sarkar F. H., (2010), “Regulation of microRNAs by natural agents: an emerging field in chemoprevention and chemotherapy research”, Pharmacology Research, 27(6), 1027-1041.

Li Y., Upadhyay S., Bhuiyan M., Sarkar F. H., (1999), “Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein”, Oncogene, 18, 3166-3172.

Lin H., Kuo L., Chuu C., (2012), “Combined Treatment of Curcumin and Small Molecule Inhibitors Suppresses Proliferation of A549 and H1299 Human NSCLC”,

Phytotherapy Research, 26, 122-126.

Linard C., Marquette C., Mathieu J., Pennequin A., Clarencon D., Mathe D., (2004), "Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: Effect of an NF- κ B inhibitor", *International Journal of Radiation Oncology*, 58, 427-434.

Liu J. P., Baker J., Perkins A. S., Robertson E. J., Efstratiadis A., (1993), "Mice carrying null mutations of the genes encoding IGF I and IGF-1R", *Cell*, 75, 59-72.

Liu M., Yang S. C., Sharma S., (2007), "EGFR signaling is required for TGF- β 1 mediated COX-2 induction in human bronchial epithelial cells", *Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*, 37, 578-588.

Liu G., Xia L., Zhu J., Ou S., Li M., He Y., Luo W., Li J., Zhou Q., Yang Z., (2014), "Genistein alleviates radiation-induced pneumonitis by depressing Ape1/Ref-1 expression to downregulate inflammatory cytokines", *Cell Biology Biophysics*, 69, 725-733.

London J., Yuan M., Wilson E., Ross K., Yu C., (2002), "IGFI, IGFBP3, and lung cancer risk in a prospective study of men in China", *Journal of Cancer Institution.*, 94, 749-754.

Long L., Rubin R., Brodt P., (1998), "Enhanced invasion and liver colonization by lung carcinoma cells overexpressing the IGF-1R", *Cell Research*, 238, 116-121.

Lothar A., Harding A., Musto G., Pitz W., (2013), "Antiestrogen use and survival of women with NSCLC in Manitoba, Canada", *Hormone Cancer*, 4(5), 270-276.

Ludovini V., Bellezza G., Pistola L., Bianconi F., DiCarlo L., Sidoni A., Sordo R., (2009), "High coexpression of both IGFR-1 and EGFR is associated with shorter disease-free survival in resected NSCLC patients", *Oncology*, 20, 842-849.

Lynch J., Bell D. W., Sordella R., (2004), "Activating mutations in the EGFR underlying responsiveness of NSCLC to gefitinib", *National England Journal of Medicine*, 350, 2129-2139.

Ma J., Pollak N., (1999), "Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of IGF-I and IGFBP3", *Journal of Cancer Institution*, 91(7), 620-625.

Ma Z., Dong A., Kong M., Qian J., (2007), "Silencing of the IGF-1R increases the sensitivity to apoptosis and inhibits invasion in human lung adenocarcinoma A549 cells", *Cell Molecular Biology Letters*, 12, 556-572.

Mack H., Pipas M., Laimins A., (1993) "Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53", *Nature*, 363, 281-283.

Mahmoud M., Yang W., Bosland C., (2014), "Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms", *Journal of Steroid Biochemistry*, 140, 116-132.

Mai Z., Blackburn G. L., Zhou J. R., (2007), "Soy phytochemicals synergistically enhance the preventive effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast carcinoma in mice", *Carcinogenesis*, 28, 1217-1223.

Maile A., Imai Y., Clarke J. B., Clemmons D. R., (2002), "IGF I increases α V β 3 affinity by increasing the amount of integrin-associated protein that is associated with non-raft domains of the cellular membrane", *Journal of Clinic Oncology*, 27, 1800-1805.

Marquez-Garban C., Alavi M., Maresh L., Chen H., Bagryanova L., Horvath S., Chia D., Garon E., Goodglick L., Pietras J., (2011), "Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human NSCLC", *Steroids*, 76(9), 910-920.

Martinez-Montemayor M., Otero-Franqui E., Martinez J., Mota-Peynado A., Cubano A., (2010), "Individual and combined soy isoflavones exert differential effects on metastatic cancer progression", *Clinical Metastasis*, 27, 465-480.

Masago K., Fujita S., Togashi Y., Kim H., Hatachi Y., Fukuhara A., Nagai H., Irisa K., (2011), "Clinical significance of EGFR mutations and IGF-I and its binding protein 3 in advanced non-squamous NSCLC", *Oncology Reports*, 26, 795-803.

Matthews J., Gustafsson J. A., (2003), "Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and ER β ", *Molecular Interview*, 3(5), 281-292.

Mayo L. D., Donner D. B., (2001), "PI3K/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus", *National Academy of Science*, 98, 11598-603.

Mazieres J., Lepage B., (2013), "Specificities of lung adenocarcinoma in women who have never smoked", *Journal of Thorac Oncology*, 8(7), 923-929.

Mense M., Hei K., Ganju K., Bhat K., (2008), "Phytoestrogens and breast cancer prevention: possible mechanisms of action", *Health Perspective*, 116, 426-33.

Miller J., Rice-Evans A., Panaga G., (1996), "Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids", *Radical Biology Medicine*, 20(7), 933-965.

Miltyk W., Craciunescu C. N., Fischer L., Jeffcoat R. A., Koch M. A., (2003), "Lack of significant genotoxicity of purified soy isoflavones (genistein, daidzein, and glycitein) in 20 patients with prostate cancer", *Journal of Clinic Nutrition*, 77, 875-882.

Min H., Yun H., Lee J., Cho J., Jang H., Lee H., (2015), "Targeting the IGF-1R and

Src signaling network for the treatment of NSCLC”, *Molecular Cancer*, 14, 113.

Mohammad R. M., Banerjee S., Li Y., (2006), “Cisplatin-induced antitumor activity is potentiated by the soy isoflavone genistein in BxPC-3 pancreatic tumor xenografts”, *Cancer*, 106, 1260-1268.

Molina-Arcas M., Hancock D. C., Sheridan C., Kumar M. S., Downward J., (2013), “Coordinate Direct Input of Both KRAS and IGF1 Receptor to Activation of PI3 kinase in KRAS-Mutant Lung Cancer”, *Cancer discovery*, 3(5), 548-563.

Moorehead R. A., Sanchez O. H., Baldwin R. M., Khokha R., (2003), “Transgenic overexpression of IGF-II induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma”, *Oncogene*, 22, 853-857.

Morani A., Barros R., Imamov O., Hultenby K., Arner A., Warner M., Gustafsson J., (2006), “Lung dysfunction causes systemic hypoxia in ER β knockout mice”, *National Academy of Science*, 103(18), 7165-7169.

Morgillo F., Kim W. Y., Kim E. S., Ciardiello F., Hong W. K., Lee H. Y., (2007), “Implication of the IGF-IR pathway in the resistance of NSCLC cells to treatment with gefitinib.”, *Clinic Cancer Research*, 13(9), 2795-2803.

Morgillo F., Woo J. K., Kim E. S., Hong W. K., Lee H. Y., (2006), “Heterodimerization of IGFR/EGFR and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib”, *Cancer Research*, 66, 10100-10111.

Mukherjee S., Acharya R., Chakrabarti G., (2010), “Genistein Arrests Cell Cycle Progression of A549 Cells at the G2/M Phase and Depolymerizes Interphase Microtubules through Binding to Unique Site of Tubulin”, *Biochemistry*, 49, 1702-1712.

Nagata Y., Sonoda T., Okumura K., Goto K., Naito S., Fujimoto K., Hirao Y., Takahashi A., Tsukamoto T., Akaza H., (2007), “Dietary isoflavones may protect against prostate cancer in Japanese men”, *Journal of Nutrition*, 137, 1974-1979.

Nahor I., Abramovitch S., Engeland K., Werner H., (2005), “The p53-family members p63 and p73 inhibit IGF-1R gene expression in colon cancer cells”, *Growth Hormon IGF Research*, 15, 388-396.

Nguyen K. S., Kobayashi S., Costa D. B., (2009), “Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC dependent on the EGFR pathway”, *Clinical Lung Cancer*, 10, 281-289.

Nickerson T., Pollak M., (1999), “Bicalutamide (Casodex)-induced prostate regression involves increased expression of genes encoding IGFBPs”, *Urology*, 154(6), 1120-1125.

Oates J., Schumaker M., Jenks B., (1998), "The mannose 6-phosphate/IGF2R, a putative breast tumor suppressor gene", *Cancer Research and Treatment*, 47(3), 269-281.

Ogawa O., Becroft D. M., Morison I. M., (1993), "Constitutional relaxation of IGF-II gene imprinting associated with Wilms' tumour and gigantism", *Nature Genetics*, 5(4), 408-412.

Ohlsson C., Kley N., Werner H., LeRoith D., (1998), "p53 regulates IGF-1R expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1", *Endocrinology*, 139, 1101-1107.

Onozawa M., Fukuda K., Ohtani M., Akaza H., Sugimura T., Wakabayashi K., (1998), "Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP", *Journal of Clinic Oncology*, 28, 360-363.

Oton B., Belani C., Cai C., Owonikoko T., Gooding W., Siegfried J., (2006), "Comparison of survival for NSCLC between premenopausal and postmenopausal women: SEER Database", *Journal of Clinic Oncology*, 24, 7038.

Pao W., Chmielecki J., (2010), "Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer", *National Cancer*, 10, 760-774.

Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P., (2005), "Global cancer statistics, 2002", *Cancer Journal*, 55(2), 74-108.

Patel J. D., Bach P. B., Kris M. G., (2004), "Lung cancer in US women: a contemporary epidemic", *JAMA*, 291, 1763-1768.

Patrone C., Cassel N., Pettersson K., Piao S., Cheng G., Ciana P., Maggi A., Warner M., Gustafsson A., Nord M., (2003), "Regulation of Postnatal Lung Development and Homeostasis by ER β ", *Molecular Cell Biology*, 23, 8542-8552.

Pavelic J., Krizanac S., Kapitanovic S., Pavelic L., Samarzija M., Pavicic F., Spaventi S., Jakopovic M., (2005), "The consequences of insulin-like growth factors/receptors dysfunction in lung cancer", *Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*, 32, 65-71.

Pawlik T. M., Keyomarsi K., (2004), "Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy", *International Journal of Radiation Oncology*, 59, 928-42.

Pedrini M. T., Giorgino F., Smith R. J., (1994), "cDNA cloning of the rat IGF-I receptor: structural analysis of rat and human IGF-I and insulin receptors reveals differences in alternative splicing and receptor-specific domain conservation", *Biochemistry Biophysics Research Community*, 202, 1038-1046.

Pendleton J. M., Tan W. W., Anai S., Change M., Hou H., Shiverick K. T., Rosser C.

J., (2008), "Phase II trial of isoflavone in prostate-specific antigen recurrent prostate cancer after previous local therapy", *BMC Cancer*, 8(132), 1-10.

Peng B., Cao J., Yi S., Wang C., Zheng G., He Z., (2013), "Inhibition of proliferation and induction of G1-phase cell-cycle arrest by dFMGEN, a novel genistein derivative, in A549 cells", *Drug Chemistry Toxicology*, 36(2), 196-204.

Pietras R. J., Márquez D. C., Chen H. W., Tsai E., Weinberg O., Fishbein M., (2005), "Estrogen and growth factor receptor interactions in human breast and NSCLC cells", *Steroids*, 70(5-7), 372-381.

Pietta P. G., (2000), "Flavonoids as antioxidants", *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.

Playford M. P., Bicknell D., Bodmer W. F., Macaulay V. M., (2000), "IGF-I regulates the location, stability, and transcriptional activity of β -catenin", *National. Academy of Science*, 97, 12103-12108.

Pollak M., (2008), "Insulin and IGF signalling in neoplasia", *National Cancer*, 8(12), 915-28.

Prudkin L., Kim W., Feng L., Kim E., Hennessy B., Lee J. S., (2012), "EGFR and K-Ras mutations and resistance of lung cancer to IGF-1R tyrosine kinase inhibitors", *Cancer*, 118, 3993-4003.

Qian J., Dong A., Kong M., Ma Z., Fan J., Jiang G., (2007), "Suppression of IGF-1R expression by small interfering RNA inhibits A549 human lung cancer cell invasion in vitro and metastasis in xenograft nude mice", *Biophysics*, 39, 137-147.

Quinn K., Treston A., Unsworth E. J., Miller M. J., Vos M., Grimley C., Battey J., Mulshine J. L., Cuttitta F., (1996), "IGF expression in human cancer cell lines", *Journal of Biology and Chemistry*, 271, 11477-11483.

Raffoul J. J., Wang Y., Kucuk O., Forman J. D., Sarkar F. H., Hillman G. G., (2006), "Genistein inhibits radiation-induced activation of NF- κ B in prostate cancer cells promoting apoptosis and G2/M cell cycle arrest", *BMC Cancer*, 6, 107.

Raffoul J. J., Banerjee S., Singh-Gupta V., Knoll Z. E., Fite A., Zhang H., (2007), "Down-regulation of APE1/Ref1 expression by soy isoflavones enhances prostate cancer radiotherapy in vitro and in vivo", *Cancer Research*, 67, 2141-2149.

Ramalingam S., Spigel R., Chen D., Schneider P., (2011), "Randomized Phase II Study of Erlotinib in Combination With Placebo or R1507, a Monoclonal Antibody to IGF-1R, for Advanced-Stage NSCLC", *Journal of Clinic Oncology*, 29, 4574-80.

Raso M. G., Behrens C., Herynk M. H., (2009), "Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates

with EGFR mutation”, *Clinic Cancer Research*, 15(17), 5359-5368.

Reeve J., Brinkman A., Hughes S., Mitchell J., Schwander J., Bleeche N. M., (1992), “Expression of IGF and IGFBP genes in human lung tumor cell lines”, *Journal of Natinal Cancer Institiion*, 84, 628-634.

Reidy D. L., Vakiani E., Fakih M. G., Saif M. W., Hecht J. R., Goodman-Davis N., (2010), “Randomized, phase II study of the IGF-1R inhibitor IMC-A12, w/wo cetuximab, in patients with cetuximab or panitumumab-refractory metastatic colorectal cancer”, *Journal of Clinic Oncology*, 28, 4240-6.

Reinmuth N., Liu W., Fan F., Jung Y. D., Ahmad S. A., Stoeltzing O., Bucana C. D., Radinsky R., Ellis L. M., (2002), “Blockade of IGF-1R function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer”, *Clinic Cancer Research*, 8, 3259-3269.

Reiss K., Cheng A., Ferber W., (1996), “Overexpression of IGF-I in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice”, *National Academy of Science*, 93(16), 8630-8635.

Renehan A. G., Zwahlen M., Minder C., O'Dwyer S. T., Shalet S. M., Egger M., (2004), “IGF-I, IGFBP3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis”, *Lancet*, 363, 1346-1353.

Rice S., Whitehead S. A., (2006), “Phytoestrogens and breast cancer-promoters or protectors”, *Endocrinology Related Cancer*, 13, 995-1015.

Rodon J., DeSantos V., Ferry R. J., Kurzrock R., (2008), “Early drug development of inhibitors of the IGF-1R pathway: lessons from the first clinical trials”, *Molecular Cancer Therapy*, 7, 2575-2588.

Romanelli R., LeBeau A., Fulmer C., Lazzarino D., Hochberg A., (2007), “IGF-1R internalization and recycling mediate the sustained phosphorylation of Akt”, *Journal of Biology and Chemistry*, 282, 22513-22524.

Rosell R., Bivona T. G., Karachaliou N., (2013), “Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment”, *Lancet*, 382, 720-731.

Rosenberg Z., Jenkins D. J., Diamandis E. P., (2002), “Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds”, *Breast Cancer Treatment*, 62, 35-49.

Rosenthal S. M., Brown E. J., Brunetti A., Goldfine I. D., (1991), “FGF inhibits IGF-II gene expression and increases IGF-IR abundance in BC3H-1 muscle cells”, *Molecular Endocrinology*, 5(5), 678-684.

Rosenzweig S. A., (2004), “What’s new in the IGFBPs”, *Growth Hormone Research*, 14, 329-36.

Ross H., Oldham B., Bandstra B., Sandalic L., Bianco J., Bonomi P., Singer J., (2007), "Serum-free estradiol (E2) levels are prognostic in men with chemotherapy-naive advanced NSCLC and performance status", *Journal Clinic Oncology*, 25, 7683.

Rowinsky E. K., Youssoufian H., Tonra J. R., Solomon P., Burtrum D., Ludwig D. L., (2007), "IMC-A12, a human IgG1 monoclonal antibody to the IGF-1R", *Clinical Cancer Research*, 13, 5549-5555.

Rowland I., Faughnan M., Hoey L., Wahala K., Williamson G., Cassidy A., (2003), "Bioavailability of phyto-oestrogens", *Journal of Nutrition*, 89(1), 45-58.

Rubin R., Baserga R., (1995), "Biology of disease, IGF-1R", *Laboratory Investigation*, 73, 311-331.

Rubini M., Werner H., Gandini E., Roberts C. T., Leroith D., Baserga D., (1994), "PDGF increases the activity of the promoter of the IGF-1R gene", *Experimental Cell Research*, 211(2), 374-379.

Sachdev D., Singh R., Fujita-Yamaguchi Y., (2006), "Downregulation of IR by antibodies against the IGF-1R: implications for anti-IGF therapy in breast cancer", *Cancer Research*, 66, 2391-402.

Sachdev D., Hartell J. S., Lee A. V., Zhang X., Yee D., (2004), "A dominant negative IGF-1R inhibits metastasis of human cancer cells", *Journal of Biology and Chemistry*, 279, 5017-5024.

Salti G. I., Grewal S., Mehta R. R., Das Gupta T. K., Boddie A.W., Constantinou A. I., (2000), "Genistein induces apoptosis and topoisomerase II-mediated DNA breakage in colon cancer cells", *European Journal of Cancer*, 36, 796-802.

Samani A. A., Chevet E., Fallavollita L., Galipeau J., Brodt P., (2004), "Loss of tumorigenicity and metastatic potential in carcinoma cells expressing the extracellular domain of the IGF-1R", *Cancer Research*, 64, 3380-3385.

Samani A., Fallavollita L., Jaalouk E., Brodt P., (2001), "Inhibition of carcinoma cell growth and metastasis by a vesicular stomatitis virus G-pseudotyped retrovector expressing IGF-1R antisense", *Human Gene Therapy*, 12, 1969-1977.

Sarfstein R., Maor S., Reizner N., Abramovitch S., Werner H., (2006), "Transcriptional regulation of the IGF-1R gene in breast cancer", *Molecular Cell Endocrinology*, 252, 241-246.

Sarfstein R., Pasmanik-Chor M., Yeheskel A., (2012), "IGF-1R translocates to nucleus and autoregulates IGF-1R gene expression in breast cancer cells", *Journal of Biology and Chemistry*, 287, 2766-76.

Sarkar F. H., Adsule S., Padhye S., Kulkarni S., Li Y., (2006), "The role of genistein

and synthetic derivatives of isoflavone in cancer prevention and therapy”, *Medical Chemistry*, 6, 401-407.

Scagliotti G. V., Novello S., (2012), “The role of IGF signaling pathway in NSCLC and other solid tumors”, *Cancer Treatment Review*, 38, 292-302.

Schabath M. B., Hernandez L. M., Wu X., Pillow P. C., Spitz M. R., (2005), “Dietary phytoestrogens and lung cancer risk”, *JAMA*, 294, 1493-1504.

Schmitz S., Kaminsky-Forrett M. C., Henry S., Zanetta S., Geoffrois L., Bompas E., (2012), “Phase II study of figitumumab in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical activity and molecular response ”, *Oncology*, 23, 2153-61.

Schuler M., Green D., (2001), “Mechanisms of p53-dependent apoptosis”, *Biology*, 29, 684-8.

Schwartz A. G., Prysak G. M., Murphy V., Lonardo F., Pass H., Schwartz J., Brooks S., (2005), “Nuclear ER β in lung cancer: expression and survival differences by sex”, *Clinical Cancer Research*, 11(20), 7280-7287.

Scotlandi K., Maini C., Benini S., Serra M., Cerisano V., Strammiello R., Baldini N., Nanni P., Nicoletti G., Picci P., (2002), “Effectiveness of IGF-1R antisense strategy against Ewing's sarcoma cells”, *Cancer Gene Therapy*, 9, 296-307.

Sell C., Rubini M., Rubin R., Liu J., (1993), “SV40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking IGF-1R”, *Proclinic National Academic Science*, 90, 11217-21.

Seo S., DeNardo G., Jacquot Y., Laios I., Vidal D. S., Zambrana C. R., (2006), “Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER α ”, *Breast Cancer Research Treatment*, 99, 121-34.

Seo H. S., Ju J. H., Jang K., Shin I., (2011), “Induction of apoptotic cell death by phytoestrogens by up-regulating the levels of phospho-p53 and p21 in normal and malignant ER α (-) breast cells”, *Nutrition Research*, 31, 139-146.

Sepp-Lorenzino L., (1998), “Structure and function of the IGF-1R”, *Research Treatment*, 47(3), 235-253.

Shao M., Alpaugh L., Fontana A., Barsky H., (1998), “Genistein inhibits proliferation similarly in ER-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by p21 induction, G2/M arrest and apoptosis”, *Journal of Biology and Chemistry*, 69, 44-54.

Sharma S. V., Lee D. Y., Li B., (2010), “A chromatin-mediated reversible drug-

tolerant state in cancer cell subpopulations”, *Cell*, 141, 69-80.

Shaw R. J., Cantley L. C., (2006), “Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth”, *Nature*, 441(7092), 424-430.

Shen J. C., Klein R. D., Wei Q., Guan Y., Contois J. H., (2000), “Low-dose genistein induces Cdk inhibitors and G1 cell-cycle arrest in human prostate cancer cells”, *Molecular Carcinogenesis*, 29, 92-102.

Shimazu T., Inoue M., Sasazuki S., Iwasaki M., Sawada N., Yamaji T., Tsugane S., (2011), “Plasma isoflavones and the risk of lung cancer in women: a nested case-control study in Japan”, *Cancer Epidemiologic Biomarkers*, 20, 419-427.

Shon H., Park D., Nam K. S., (2006), “Effective Chemopreventive Activity of Genistein against Human Breast Cancer Cell”, *Journal of Biochemistry Molecular Biology*, 39, 448-451.

Singh-Gupta V., Joiner C., Runyan L., Yunker K., Sarkar H., Miller S., (2011), “Soy Isoflavones Augment Radiation Effect by Inhibiting APE1/Ref-1 DNA Repair Activity in NSCLC”, *Journal of Thoracic Oncology*, 4, 688-98.

Singh P., (2000), “Insulin-like growth factor system in growth, development and carcinogenesis”, *Journal of Clinical Assay*, 23, 214-232.

Sirtori C R., Arnoldi A., Johnson S., (2005), “Phytoestrogens: end of a tale”, *Ann Medicine*, 37, 423-38.

Soria J. C., Massard C., Lazar V., (2013), “A dose finding, safety and pharmacokinetic study of AVE1642, an anti-IGF-1R monoclonal antibody, administered as a single agent and in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumours”, *European Journal of Cancer*, 49, 1799-807.

Stabile L. P., Dacic S., Land S. R., (2011), “Combined analysis of ER β -1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome”, *Clinic Cancer Research*, 17(1), 154-164.

Stabile P., Davis L., Gubish T., (2006), “Human NSCLC and cells derived from normal lung express both ER α and β and show biological responses to estrogen”, *Cancer Research*, 62(7), 2141-2150.

Stabile P., Lyker S., Gubish T., Zhang W., Grandis R., Siegfried M., (2005), “Combined Targeting of the ER and the EGFR in NSCLC Shows Enhanced Anti-Proliferative Effects”, *Cancer Research*, 65, 1459-1470.

Stewart E., Rotwein P., (1996), “Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for IGFs”, *Physiological Reviews*, 76(4), 1005-1026.

Stoeltzing O., Liu W., Reinmuth N., Fan F., Parikh A., Bucana D., Evans B., Semenza L., Ellis M., (2003), "Regulation of HIF-1 α , VEGF, and angiogenesis by an IGF-1R autocrine loop in human pancreatic cancer", *Journal of Pathology*, 163, 1001-1011.

Stuschke M., Sack A., Wurm R., (2002), "Radiation-induced apoptosis in human NSCLC cell lines is secondary to cell-cycle progression beyond the G2-phase checkpoint", *International Journal of Radiology*, 78, 807-19.

Subramanian J., Govindan R., (2007), "Lung cancer in never smokers", *Journal of Clinic Oncology*, 25, 561- 570.

Tang H., Liao Y., Chen G., (2012), "Estrogen upregulates the IGF-1 signaling pathway in lung cancer through estrogen receptor-B", *Medical Oncology*, 29, 2640-8.

Tao Y., Pinzi V., Bourhis J., Deutsch E., (2007), "Mechanisms of disease: Signaling of the IGF-1R pathway-therapeutic perspectives in cancer", *National Clinic Practical Oncology*, 4(10), 591-602.

Teas J., Irhimeh R., Druker S., Hurley G., Hébert R., Savarese M., Kurzer M. S., (2011), "Serum IGF-1 concentrations change with soy and seaweed supplements in healthy postmenopausal American women", *Nutrition Cancer*, 63, 743-748.

Thun M. J., Hannan L. M., Adams-Campbell L. L., (2008), "Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies", *PLoS Medicine*, 5(9), e185.

Tokalov S. V., Henker Y., Schwab P., Metz P., Gutzeit H. O., (2004), "Toxicity and cell cycle effects of synthetic 8-prenylnaringenin and derivatives in human cells", *Pharmacology*, 71, 46-56.

Tokalov, S. V., Abramyuk A. M., Abolmaali N. D., (2010), "Protection of p53 wt Cells From Taxol by Genistein in the Combined Treatment of Lung Cancer", *Nutrition and Cancer*, 62(6), 795-801.

Trotman L. C., Pandolfi P. P., (2003), "PTEN and p53", *Cancer Cell*, 3, 97-9.

Turner C., Haffty B., Havre A., Gumbs A., Kaplan L., Baserga R., Glazer P., (1997), "IGF-1R overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation", *Cancer Research*, 57, 3079-3083.

Van den Belt K., Berckmans P., Vangenechten C., (2004), "Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol", *Aquat Toxicology*, 66, 183-95.

Vaporciyan A. A., Nesbitt J. C., Lee J. S., (2000), "Cancer Medicine", 5th edition, BC Decker.

Velentzis L., Woodside J., Cantwell M., Leathem A. J., Keshtgar M. R., (2008), "Do phytoestrogens reduce the risk of breast cancer and breast cancer recurrence", *European Journal of Cancer*, 44, 1799-806.

Vorwerk P. H., Wex C., Bessert B., Hohmann U., Mittler U., (2003), "Loss of imprinting of IGF-II gene in children with acute lymphoblastic leukemia", *Leukemia Research*, 27(9), 807-812.

Wakelee H. A., Chang E. T., Gomez S. L., (2007), "Lung cancer incidence in never smokers", *Journal of Clinic Oncology*, 25(5), 472-478.

Wang K., Liu N., Radulovich N., Minden M., Tsao M., (2002), "Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma", *Oncology*, 21, 7598-7604.

Wang Z., Zhang Y., Banerjee S., Liao J., Sarkar F., (2006), "Downregulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells", *Molecular Cancer Therapy*, 5, 483-493.

Wazer D. E., Tercilla O. F., Lin P. S., (1989), "Modulation in the radiosensitivity of MCF-7 human breast carcinoma cells by 17 β -estradiol and tamoxifen", *Journal of Radiology*, 62, 1079-83.

Werner H., Sukhatme P., Drummond A., Roberts T., LeRoith D., (1994), "Transcriptional repression of the IGFI sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site", *Journal of Biology and Chemistry*, 269, 12577-12582.

Werner H., Shen-Orr Z., Rauscher F. J., Morris J. F., Roberts C. T., LeRoith D., (1995), "Inhibition of cellular proliferation by the WT1 is associated with suppression of IGF-1R gene expression", *Molecular Cell Biology*, 15, 3516-3522..

Werner H., LeRoith D., (1997), "The IGF-1R signalling pathways are important for tumorigenesis tumorigenesis and inhibition of apoptosis", *Oncogenesis*, 8, 71-92.

Werner H., Karnieli E., Rauscher F. J., LeRoith D., (1996), "Wild type and mutant p53 differentially regulate transcription of the IGF-1R gene", *National Academic Science*, 93, 8318-8323.

Wietrzyk J., Boratynski J., Ryczynski A., Radzikowski C., Opolski A., (2001), "Antiangiogenic and antitumour effects in vivo of genistein applied alone or combined with cyclophosphamide", *Anticancer Research*, 21, 3893-3896.

Wiseman M., (2008), "The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective", *Nutrition Society*, 67, 253-256.

Wolters M., Hahn A., (2004), “Soy isoflavones a therapy for menopausal symptoms”, *Wien Medicine Wochenschr.*, 154, 334-41.

Wu T., Chang L., Shih Y., Lee C., (2005), “The significance of estrogen receptor β in 301 surgically treated NSCLC”, *Journal Cardiovascular Surgery*, 130(4), 979-986.

Wu W., O'Reilly M. S., Langley R. R., (2007), “Expression of EGF/TGF- α by human lung cancer cells determines their response to EGFR tyrosine kinase inhibition in the lungs of mice”, *Molecular Cancer Therapy*, 6, 2652-2663.

Wu X., Zhao H., Do K. A., (2004), “Serum levels of IGF-I and IGFBP predict risk of second primary tumors in patients with head and neck cancer”, *Clinic Cancer Research*, 10(12), 3988-3995.

Wu T., Yang Y. C., Huang P. R., Wen Y., Yeh S., (2012), “Genistein enhances the effect of trichostatin A on inhibition of A549 cell growth by increasing expression of TNF receptor-1”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 262, 247-254.

Wu Y., Tewari M., Cui S., Rubin R., (1996), “Activation of the IGF-1R inhibits tumor necrosis factor-induced cell death”, *Journal of Cell Physiology*, 168, 499-509.

Xie Y., Skytting B., Nilsson G., Brodin B., Larsson O., (1999), “Expression of IGF-1R in synovial sarcoma: Association with an aggressive phenotype”, *Cancer Research*, 59(15), 3588-3591.

Xie Q., Li Z., Chen J., (2017), “WDR5 positively regulates p53 stability by inhibiting p53 ubiquitination”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487 (2017) 333-338.

Xu J., Loo G., (2001), “Different effects of genistein on molecular markers related to apoptosis in two phenotypically dissimilar breast cancer cell lines”, *Journal of Cell. Biochemistry.*, 82, 78-88.

Xu Y., Papageorgiou A., Polychronakos C., (1998), “Developmental regulation of the soluble form of IGF-2R in human serum and amniotic fluid”, *Jour of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(2), 437-442.

Yang Y., Hoeflich A., Butenandt O., Kiess W., (1996), “Opposite regulation of IGF-I and IGF-I receptor mRNA and concomitant changes of GH receptor and IGF-II/M6P receptor mRNA in human IM-9 lymphoblasts”, *BBA Molecular Cell Research*, 1310(3), 317-324.

Yee D., (2012), “IGFR inhibitors”, *Journal of Nationall Cancer Instituion*, 104, 975-81.

Yin M., Guan X., Liao Z., Wei Q., (2009), “IGF-1R targeted therapy for NSCLC”, *Journal of Research*, 1, 101-114.

Yu H., Rohan T., (2000), "Role of the IGF family in cancer development and progression", *Journal of National Cancer Institution*, 92, 1472-1489.

Yu H, Spitz M. R., Mistry J., Gu J., Hong W. K., Wu X., (1999), "Plasma levels of IGF-I and lung cancer risk: a case-control analysis", *Journal Cancer Instution*, 91, 151-156.

Zaina S., Squire S., (1998), "The soluble type IGF-2R reduces organ size by IGF-II-mediated and IGF-II-independent mechanisms", *Journal of Biology and Chemistry*, 273(44), 28610-28616.

Zambetti G., Bargonetti J., Walker K., Prives C., Levine A., (1992), "Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element", *Genes*, 6, 1143-1152.

Zha J., O'Brien C., Savage H., (2009), "Molecular predictors of response to a humanized anti-IGF-1R monoclonal antibody in breast and colorectal cancer.", *Molecular Cancer*, 8, 2110-21.

Zhang Z., Wang C. Z., Du G. J., Qi L. W., Calway T., He T. C., Du W., Yuan C. S., (2013), "Genistein induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via ATM/p53-dependent pathway in human colon cancer cells", *International journal of oncology*, 43, 289-296.

Zhou S., Hu Y., Zhang B., Teng Z., Gan H., Yang Z., Wang Q., Huan M., Mei Q., (2008), "Dose-dependent absorption, metabolism, and excretion of genistein in rats", *Journal Agriculture Food Chemistry*, 56, 8354-8359.

Zhou J. R., Mukherjee P., Tanaka T., Blackburn L., Clinton K., (1998), "Inhibition of murine bladder tumorigenesis by soy isoflavones via alterations in the cell cycle, apoptosis, and angiogenesis", *Cancer Research*, 58, 5231-5238.

Zhou N., Yan Y., Li W., Wang Y., Zheng L., Han S., (2009), "Genistein inhibition of topoisomerase II α expression participated by Sp1 and Sp3 in HeLa cell", *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 3255-3268.

Zhou R., Yang X., Wang D., Zeng L., Wang G, Yang Z., (2012), "Anti-tumor effects of all-trans retinoic acid are enhanced by genistein", *Biophysics*, 62, 177-184.

Zhou Y., Mi M. T., (2005), "Genistein stimulates hematopoiesis and increases survival in irradiated mice", *Journal of Radiation Research*, 46, 425-433.

Zhu C. Q., Popova S. N., Brown E. R., Barsyte-Lovejoy D., Navab R., Shih W., Li M., Lu M., Jurisica I., Penn L. Z., Gullberg D., Tsao M. S., (2007), "Integrin $\alpha 11$ regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human NSCLCs", *National Academic Science*, 104, 11754-11759.

Zhu J., Zhang C., Qing Y., Cheng Y., Jiang X., Li M., Yang Z., Wang D., (2015), “Genistein induces apoptosis by stabilizing intracellular p53 protein through an APE1-mediated pathway”, *Free Radical Biology and Medicine*, 05.030.

ÖZGEÇMİŞ

Ekin KESTEVUR 2012 yılında Cumhuriyet Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini 2017 yılında tamamlamıştır. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü'nde araştırma görevliliği yapmaktadır.