

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

CL-387,785'İN MALİGNANT MEZOTELYOMA
HÜCRELERİNDE ANTİ-KARSİNOJENİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

FATMA SAĞIR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2014

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

CL-387,785'İN MALİGNANT
MEZOTELYOMA HÜCRELERİNDE ANTİ-
KARSİNOJENİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

FATMA SAĞIR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE

2014



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/01/2014 tarih ve 2014/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 21/01/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Fatma Sağır'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd Doç Dr Asuman D. Zergeroğlu

ÜYE

: Doç. Dr. Ferruh Özcan

ÜYE

: Yrd Doç Dr Tunahan Çakır

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Bu tez çalışmasında, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) inhibitörü olan CL-387,785 (CL) 'in mezotelyal ve malignant mezotelyoma (MM) hücreleri (Met5A, SPC212) proliferasyonuna, MAPK, PI3K/AKT yolları ve aşağı akımındaki moleküllere etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda, Epidermal büyüme faktörü (EGFR), ekstrasellüler düzenlenen protein kinaz (ERK), stres aktifleyici protein kinaz/ c-Jun N-terminal kinaz (SAPK/JNK) ile p38 protein kinaz (p38 MAPK) ve Protein kinase B (PKB/AKT) moleküllerinin protein; ELK-1, JUN, STAT1, STAT3 ve STAT5A moleküllerinin mRNA düzeyinde araştırılması planlanmıştır.

Bu araştırma sonucunda, CL her iki hücre üzerinde konsantrasyona ve zamana bağımlı anti-proliferatif etki göstermiştir. EGFR fosforilasyonunun 100 nM ve üzerindeki konsantrasyonlarda, tamamiyle inhibe edildiği belirlenmiştir. ERK ve AKT fosforilasyonu aynı konsantrasyon üzerinde engellenirken; toplam ERK ve AKT seviyelerinde değişim gözlenmemiştir. İlaven stresle aktif olan diğer MAPK moleküllerinden JNK ve p38 'in fosforilasyon ve toplam protein seviyelerinde de değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, Jun, ELK-1 ve STAT1 mRNA seviyelerinde 6 saat içinde azalma belirlenirken, STAT3 ve STAT5A gen ifadelerinde herhangi bir anlamlı değişim belirlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Mezotelyoma, EGFR, İnhibitör, CL 387,785, Sinyal İletimi.

SUMMARY

In this study, we aim to evaluate the effects of EGFR inhibitor, CL-387,785, in mesothelioma and malign mesothelioma cell lines Met5A and SPC212, respectively.

Firstly, alteration of cell proliferation was investigated. Then, protein profiles of EGFR, ERK, JNK, p38 MAPK and PKB/AKT and finally, gene profiles of transcription factors including ELK-1, JUN, STAT1, STAT3 ve STAT5A were analyzed. Our results showed that CL inhibited proliferation of both cell lines at concentration and time dependent manner. It also reduced EGFR, ERK and AKT phosphorylations at 100 ng>. However, CL did not affect JNK and p38 protein phosphorylations and expressions. mRNA analysis indicated that c-jun and ELK-1 and STAT1 levels were down regulated in 6 hours, although STAT3 and STAT5A levels remain unchanged.

Key Words: Cancer, Mesothelioma, EGFR, Inhibitor, CL 387,785, Signal Transduction Pathway.

TEŞEKKÜR

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

Kelimelerin bazı anlamlara gelmediği, cümlelerin kendilerine etmem gereken teşekkürü gölgede bıraktığı çok değerli dostlarım Gülşife Candemir, Ebru Turhanlar, Zeynep Yılmaz, NA, Onur Çalışkaner, Mehmet Sarıhan, Meryem Topçu, Şeyma Özen, Türkan Çakar, Veysel Süzerer, Ekin Kestevur, Özge Arslan, Tuğçe Keskiner, Furkan Alkan, Zeynep Özcan, Emrah Kırdök, Ahmet Özdilek ve Hüseyin Gül'e,

Duruşları ile hayatımı güzelleştirmeye devam eden, dosttan çok öte olan Sümeyra Bayır ve Emine Atıcı'ya,

Ve çalışmalarım süresince maddi, manevi her zaman desteklerini gördüğüm sevgili anneme, babama, kardeşlerime, özellikle Bucum'a gösterdikleri sabır ve anlayış için en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. KANSER	2
2.1. Malign Mezotelyoma	
2.2. Sinyal İleti Yolakları	5
2.2.1. EGFR Sinyal Yolağı	6
2.2.1.1 ERK MAPK Yolağı	8
2.2.1.2. JNK MAPK Yolağı	9
2.2.1.3. p38 MAPK Yolağı	9
2.2.1.4. JAK/STAT Yolağı	11
2.2.1.5. PDGFR Yolağı	12
2.2.1.6. VEGF Yolağı	12
2.2.1.7. c-MET Yolağı	12
2.3. Küçük Molekül Tirozin Kinaz İnhibitörleri	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1. MATERYAL	15
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	15
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	15
3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar	16
3.2. METOD	18
3.2.1. Hücre Kültürü ve Alt Kütürleme	18
3.2.2. Hücre Stoklama	18

3.2.3. Hücre Proliferasyon Testi	19
3.2.4. Protein İzolasyonu	19
3.2.5. Protein Miktar Tayini	19
3.2.6. SDS-PAGE ve Western Blotting	20
3.2.7. Total RNA İzolasyonu	22
3.2.8. cDNA Sentezi	23
3.2.9. RT-PCR	23
4. SONUÇLAR	25
4.1. CL 387,785' in Met5A ve SPC212 Hücre Proliferasyonuna Etkisi	25
4.2. CL 387,785 Molekülünün MAPK Sinyal Yolağındaki Bazı Anahtar Protein Düzeylerine Doz- ve Zaman- Bağımlı Etkisi	26
4.3. CL'nin PI3K/AKT Yolağı Üzerine Aktivitesinin Ölçülmesi	27
4.4. CL'nin Zamana Bağlı Etkisinin İncelenmesi	28
4.5. CL'nin Etkisinin Gen Analizleri Deneyinde İncelenmesi	28
5. TARTIŞMA	30
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	45

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
NF-κB	: Nükleer faktör-κB
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α
AP-1	: Aktive Edici protein 1
ATF2	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktör 2
BCA	: Bicinchoninic Acid
CL	: CL-387, 785
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
FDA	: Food Drug Administration
HB-EGF	: Heparin-Bağlayıcı EGF
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
JAK	: Janus Kinase
MAPK	: Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz
MM	: Malignant Mezotelyoma
MPM	: Malign Plevral Mezotelyoma
MTS	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium Salt
NSCL	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
38 MAPK	: p38 Mitojen Aktivasyonlu Protein Kinaz
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGFR	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
PP2A	: Protein Fosfataz 2A
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPM	: Rat Plevral Mezoyelyal
SAPK/JNK	: Stres Aktifleyici Protein Kinaz/ c-Jun N-terminal Kinaz
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	: SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
STAT	: Signal Transducers and Activators of Transcription

SV40	:	Simian Virüs 40
TBS	:	Tris buffered Saline
TRE	:	TPA Response Element
VEGF	:	Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Kanser oluşumunun genel yapısı	2
2.2: Asbest fiberlerinin patogenezi.	4
2.3: EGFR reseptör ve ligandları.	6
2.4: MAPK sinyal yolağı.	8
2.5: SAPK/JNK sinyal yolağı.	9
2.6: p38 MAPK yolağı.	9
2.7: Mitojen aktivasyonlu protein kinaz yolağının aktivasyonu.	10
2.8: EGFR inhibitörü olan mAB ve TKI için bağlanma bölgeleri ve sinyal yolaklarının şematize gösterimi.	13
2.9: CL 387, 785 ajanının moleküler yapısı.	13
2.10: ATP-kompetitif inhibitörlerinin erbB-1 üzerinde bağlandıkları bilinen amino asit bölgelerinin moleküler modeli.	14
4.1: CL' nin Met5a a) ve SPC212 b) hücre canlılığına etkisi.	25
4.2: CL' nin p-EGFR a), EGFR b), p-ERK c), ERK1 d) ve aktin e) proteinlerinde doza bağlı meydana getirdiği değişim.	26
4.3: CL'nin p-p38 a),p38 b), p-JNK c), JNK d) ve aktin e) proteinlerinde doza bağlı meydana getirdiği değişim.	27
4.4: CL'nin p-AKT a), AKT b) ve aktin c) proteinlerinde doza bağlı meydana getirdiği değişim.	27
4.5: 10, 100, 1000 nM CL zamana bağlı olarak p-EGFR, EGFR, p-ERK, ERK, p-AKT, AKT ve aktin proteinlerinde meydana getirdiği değişim.	28
4.6: CL'nin zamana bağlı olarak sırası ile c-jun a), STAT1 b), STAT3 c), STAT5A d) ve elk1 e) transkripsiyon faktörlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.	29

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: EGFR'ı aşırı ekspres eden tümörler, tümör tipine göre gösterilmesi.	7
2.2: FDA tarafından onaylı küçük molekül tirozin kinaz inhibitörleri.	16
3.1: %10'luk ayırma jeli ve %4.5'lik paketleme jeli hazırlamak için kullanılacak maddeler ve miktarları.	21
3.2.: Westen Blotting'de ilgili proteinlerin saptanması amacıyla kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile kullanılan seyreltme oranları.	22
3.3: RT-PCR sırasında kullanılan sıcaklık ve süreleri.	20

1. GİRİŞ

Kanser tedavisinde kullanılan kimyasal tedavi yöntemleri son yıllarda medikal alanda hızla gelişme göstermektedir. İlaç etkinliklerinin yetersizliği ve ilaçların yan etkileri nedeniyle hastalığın tedavisi yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda tirozin kinaz inhibitörleri büyümeyle ilişkili sinyalleri regüle edebilmesinden dolayı çeşitli kanserlerin tedavisinde önem kazanmaya başlamıştır. Bu moleküller, hedeflenmiş olmaları, düşük sitotoksik etki göstermeleri, ışın tedavisi ve diğer kimyasal tedavi yöntemleriyle kombine uygulanabilmeleri nedeniyle tedavide avantaj sağlamaktadır [Arora and Scholar, 2005]. Bu kapsamda hedeflenmiş Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) tedavisi, son yıllarda hızlı bir gelişme göstererek klinik olarak yaygın bir kullanım alanı kazanmıştır [Wykosky et al., 2011]. Çalışmamızda kullandığımız EGFR'ı dönüşümsüz olarak bağlayan CL-387, 785 (CL) molekülünün bazı kanser türlerinde EGFR'ı bloke ettiği belirtilmiştir [Kobayashi et al., 2005], [Mayer et al., 2009].

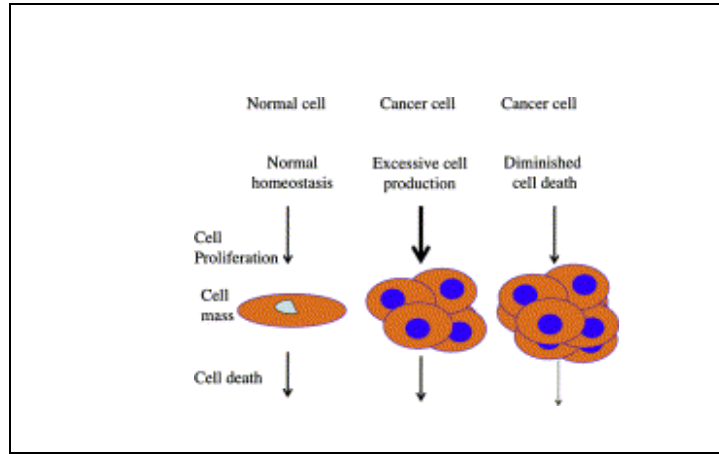
Malign mezotelyoma (MM) bölgesel olarak agresif olan ve pleural, peritoneal ve nadir olarak da perikardial mezoteliyal hücreleri köken alan yüksek oranda öldürücü bir kanser türüdür [Craighead JE, 1987]. EGFR ve/veya HER 2'nin epitel kökenli birçok kanser türünde (akciğer, göğüs, baş ve boyun, idrar kesesi) aşırı ekspres olduğu bildirilmiştir [Ono et al., 2004]. MM'da EGFR'ın aşırı ifade edilmesi hastalığın gelişimini hızlandırmaktadır bu nedenle de, EGFR'a yönelik tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir [Barbieri et al., 2011], [Kindler HL, 2008].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında EGFR inhibitörü olan CL'nin mezotelyoma (Met5A) ve malignant mezotelyoma (SPC212) hücrelerinin büyümesine, EGFR, MAPK/ERK, SAPK/JNK & p38 sinyal yolları ile PI3K/AKT ve EGFR sinyalleri sonucu aktive olan transkripsiyon faktörleri ELK-1, c- JUN, STAT1, STAT3 ve STAT5A mRNA ekspresyonlarına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda MM hastalarının tedavisinde kullanılmaya aday bir molekül olan CL-387,785' in MM hücrelerine olan etkisinin anlaşılmasına moleküler düzeyde açıklık getirmesi umulmaktadır.

2. KANSER

Kanser yüzden fazla çeşidi olan bir hastalık grubu olarak hücrede genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesiyle hücrelerin transformasyonu sonucu meydana gelir. Tüm kanserler birbirinden farklı olduğu halde artan hücre bölünmesi ve azalan hücre ölümü tüm kanser türlerinde görünen bir özelliktir (Şekil 2.1) [Levitzki and Klein, 2010].



Şekil 2.1: Kanser oluşumunun genel yapısı.

Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerden kararsız genomları ile ayrılırlar. Bu hücrelerde görülen kromozomal anomaliler polyploidy, aneuploidy ve translokasyonlar gibi kromozomal değişiklikleri içerir. Proto-onkogenleri dominant onkogenlere çeviren mutasyonların yanı sıra tümör baskılayıcı genlerde oluşan fonksiyon kayıplı mutasyonlar; epigenetik olarak DNA metilasyonunda ve histon asetilasyonunda meydana gelen değişiklikler kanserin temel nedenleri olarak gösterilebilir [Levitzki and Klein, 2010].

Kanser vücuttaki farklı tipte hücrelerden herhangi birinin anormal proliferasyonu ile oluşabileceğinden yüzlerce farklı çeşidi bulunmaktadır. Bu farklılık kanser hücrelerinin davranışında ve tedaviye verecekleri cevaplarda da değişikliklere neden olur. Kanser patolojisindeki en genel ayırım kanserin kötü huylu ya da iyi huylu olması şeklindedir. Benign tümörler (örneğin siğiller) çevresini saran normal dokuya ve/veya vücudun uzak kısmında bulunan herhangi bir dokuya metastaz yapmamaktadır. Malign tümörler ise kendisini çevreleyen dokuya sızma potansiyeline sahip, lenf ya da dolaşım sistemi aracılığı ile vücutta uzak bir dokuya

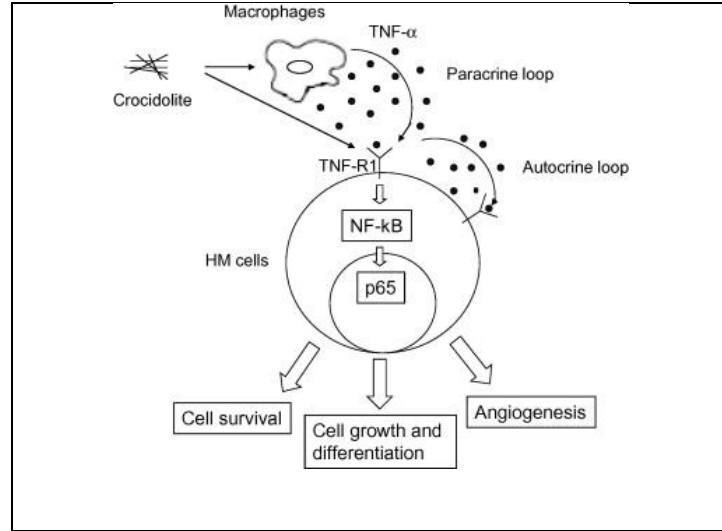
metastas yapabilmektedir. Kanser terimi genelde malign tümörler için kullanılmakta olup bu hücrelerin invazyon ve metastas yapma özellikleri hastalığı tehlikeli hale getirmektedir. Benign tümörler genellikle ameliyat ile uzaklaştırılabilmelerine rağmen malign tümörlerin vücudun farklı yerlerine dağılmaları nedeniyle lokal tedavilere cevap verememesi durumu söz konusudur.

Benign ve malign tümörlerin her ikisi de köken aldıkları hücre tipine göre adlandırılmaktadırlar. Birçok kanser türü üç ana grupta sınıflandırılmaktadırlar. İnsan kanserlerinin %90'ını oluşturan karsinomalar epitel hücrelerden oluşan kanser türlerini içerir. Sarkomalar; kas, kemik, kıkırdak gibi bağ doku hücrelerinde daha nadir görülen kanser türlerindendir. Kan-yapan ve immün sistemi oluşturan hücrelerden kaynaklanan lösemi ve lenfomalar %7 'lik görülme sıklığına sahip kanser türleridir. Çeşitli türleri olmasına rağmen bazı kanser türleri daha sık görülmektedir. Kanser vakalarının yarısından fazlasını prostat, göğüs, akciğer ve kolon kanserini de içeren dört kanser türü oluşturur. Akciğer kanseri, kanser ölümlerinin %30'unu oluşturan en ölümcül kanser türüdür [The Cell, Cooper G., 2006]. Tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen hastaların yaşama oranı hala çok zayıftır [Ebaugh et al., 2011], [Schmid et al., 2014], [Bojang et al., 2014]. Klinik olarak agresif ve fatal seyirli kanserlerden birisi de MM'dir.

2.1. Malign Mezotelyoma

Malign mezotelyoma (MM) serozal yüzeylerde görülen bir tümör türüdür. Bu hastaların yaklaşık %75'i asbeste maruz kalmışlardır [Jakobsen and Sorensen, 2011]. Asbest doğal olarak oluşan sulu mineral silikat fiberlerine verilen genel isim olup, asbest fiberlerinin mezotelyal hücre DNA'larını serozal yüzeyden geçerek direkt olarak ya da makrofajların ürettiği reaktif oksijen türleri (ROS) aracılığı ile etkilediği düşünülmektedir [Zucali et al., 2010], [Pasello and Favaretto, 2009]. İnsan mezotelyal hücreleri asbest sitotoksitesine duyarlıdır ve uzun süre asbeste maruz kalınması tümör oluşumu ile ilişkilendirilmiştir, bu süreç boyunca birçok patojenik olayın karsinogeneze sebep verdiği gözlemlenmiştir. Doku kültürlerinde gözlemlenen asbest fiberlerinin doza bağlı olarak hücrelerde toksisite oluşturmaya akla fiberlerin bunu hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği sorusunu getirmiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve nükleer faktör- κ B

(NF- κ B) sinyallerinin insan mezotelyal hücrelerinde asbeste yanıt oluşturduğunu göstermiştir. Asbest sonucu oluşan ROS, DNA hasarı ve anöploidiler meydana getirebilir [Xu et al., 2002], [Xu et al., 1999] (Şekil 2.2) [Zucali et al., 2010].



Şekil 2.2: Asbest fiberlerinin patogenezi.

Buna karşın bazı tümörlerin asbest etkisi olmadan da geliştiği görülmüştür [Nutt et al., 2009]. Simian Virüs 40 (SV40) MM ile ilişkilendirilen bir virüstür. SV40'ın mezotelyomadaki patogenezi tartışmalıdır, 50'nin üzerinde laboratuvar SV40 ile MM arasında pozitif bir ilişkiden söz ederken diğer çalışma grupları bağlantısının olmadığını düşünmektedir. Hayvan deneyleri SV40 ve Malign Plevral Mezotelyoma (MPM) arasındaki ilişkiyi açık bir şekilde göstermektedir. Karın yada kalbin içine SV40 enjekte edilen hamsterların 6 ay gibi bir sürede sıklıkla MPM geliştirdikleri gözlemlenmiştir [Izzi et al., 2012].

SV40 küçük t (tag) ve büyük T (Tag) antijeni olarak adlandırılan iki onkogenik protein üretmektedir. Nitekim bu tag' ler p53 ve pRb proteinlerine bağlanarak onların etkinliğini engellerler. Ayrıca IGF-I geninin promotor bölgesine bağlanarak IGF-I ekspresyonunu artırıp hücre büyümesini indüklemektedir. İlaven SV40 tag MAPK sinyalini ve birçok proteini defosforile eden protein fosfataz 2A (PP2A) 'yı inhibe ederek AP-1 aktivitesini değiştirdiği belirtilmiştir. Tüm bunlara ek olarak SV40'ın; HGF/Met reseptör, telomerez ve Notch-1 aktivitesini HM hücreleri ve MPM biyopsi örneklerinde değiştirdiği gözlemlenmiştir [Cacciotti et al., 2001], [Foddiss et al., 2002], [Bocchetta et al., 2003].

Çeşitli çalışmalarda SV40 ile asbestin birlikte güçlü karsinojenik etki yaptığı belirtilmiştir. Asbest ve SV40 varyantı olup tag ekpres etmeyen (SV40 dI883) ile yapılan hayvan deneylerinde MPM oluşumu gözlemlenmemiştir. SV40 dI883 hamsterlarda tek başına MPM oluşturmazken asbest çok az bir kısmında oluşturmaktadır. Ayrıca bu veri SV40 ile enfekte olan insanların az seviyelerde asbeste maruz kalmaları sonucu MPM geliştirdiğini göstermektedir. Bunun, SV40 kontamine aşı ile aşıl原因an milyonlarca insanın neden MPM geliştirmediği sorusuna cevap olduğu düşünölmektedir.

MPM'e sebep olan diğer kanserojenler düşünöldüğünde erionitinin MPM oluşturmada etkili mineral fiberi olduğu gözlemlenmiştir. Türkiye'nin Kapadokya bölgesinde erionit mineraline maruz kalan insanların mezotelyomaya genetik eğilimlilik gösterdiğı ve bu eğilimin yapılan mineralojik ve pedigree çalışmaları ile otozomal dominant özellik taşıdığı belirlenmiştir [Carbone et al., 2007].

MM genellikle epiteliyoid özellik göstermekle beraber bifazik ve sarkomatoyid türleri de tanımlanmıştır [Izzi et al., 2012]. Epitel köken gösteren türler yaklaşık %50-67 arasında iken, bifazik %24-35 ve sarkomatoyid olanlar %7-21 oranlarında görölmektedir [Pasello and Favaretto, 2009].

MM 'da cerrahi operasyon birçok hasta için uygun değildir. Radyasyon terapisi hastaların çoğunda ağrıyı azaltıcı etki yapmasına rağmen, semptomları kontrol süresi uzun olmadığından kemoterapi sıklıkla kullanılan tedavi seçeneğı olmaktadır [Nutt et al., 2009]. Yapılan çalışmalar sonucu kanserde etkin rol alan sinyal proteinlerinin tespiti bu proteinlerin sinyal iletiminde tedavi için hedef molekül olarak kullanılmasına olanak vermiştir [Levitzki and Klein, 2010].

2.2. Sinyal İleti Yolakları

Sinyal iletimi; hormonlar, büyüme faktörleri, nörotransmitterler, kemokinler, sitokinler hatta ATP gibi küçük moleküllerin ligand olarak kullanıldiğı ve ilgili reseptörler ile etkileşimleri sonucu çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarla hücrenin cevabına neden olan olaylar bütünüdür. Bu cevaplar metabolizma, gen ekspresyonu, hücre bölünmesi ve hücre ölümü gibi metabolik olayların gerçekleşmesine yol açarlar. Sinyal ileti yolakları birbiri ile etkileşim halinde olup bu etkileşim sonucu her bir hücrenin ve organizmanın fonksiyonu belirlenmiş olur. Birçok hastalık bu

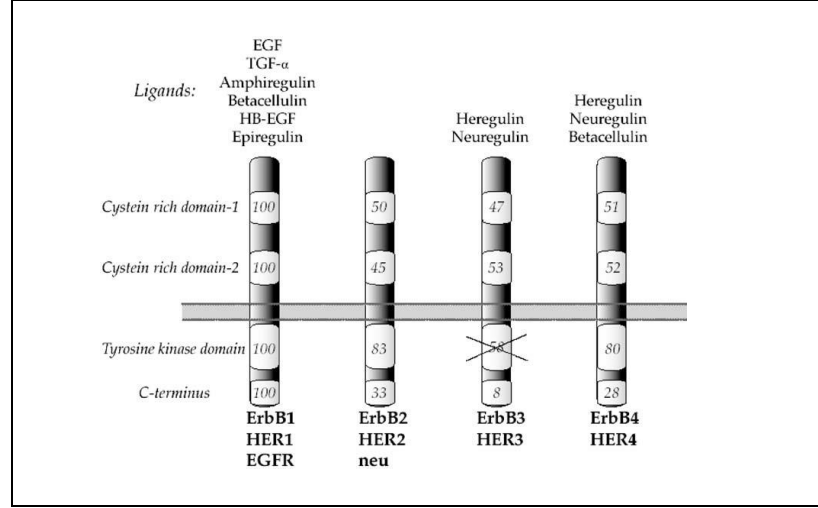
iletim sırasında meydana gelen anomalilerden kaynaklanmaktadır [Levitzki and Klein, 2010].

Tümöre spesifik olması nedeniyle moleküler hedefli çalışan kanser terapileri konvansiyonel kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerine göre daha avantajlı olabilmektedir. Bu hedef moleküllerden biri de birçok epitel kanser türünde aşırı ekpres edilmekte olan ya da regülasyonu bozulan EGFR'dır. Bu reseptörün aktivasyonu tümör oluşum ve gelişiminde oldukça önem arz etmektedir [Harari, 2004].

2.2.1. EGFR Sinyal Yolağı

EGFR; HER2, HER3 ve HER4 'ü de içeren EGF reseptör ailesinin bir üyesi olup; hücre dışı ligand bağlanma, membrandan geçen (transmembran) ve hücre içi tirozin kinaz olmak üzere üç temel bölümden oluşmaktadır. Ligand bağlanması ile oluşan dimerizasyon/oligomerizasyonlar tirozin kinaz kısmında konformasyonel değişikliğe yol açarak sonrasında alt yolakların aktive olmasına neden olur. Ras/Raf/MEK/ERK1/2, PI3K/AKT ve JAK/STAT sinyal yolakları EGFR molekülü ile aktive olan yolaklardandır. Bu aktifleşme durumu kanser hücrelerinde kanserin devamlılığı, büyümesi, invazyonu ve anjiyogenezini sağlar [Barbieri et al., 2011].

Genetik olarak birbirinden farklı yedi adet EGFR ligandı bulunmaktadır. Bu ligandlar epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α), heparin-bağlayıcı EGF (HB-EGF), amfiregülin, betaselülin, epiregülin ve nöroregülin (Şekil 2.3) [Levitzki and Klein, 2010].



Şekil 2.3: EGFR reseptör ve ligandları.

EGFR aktivasyonu ile birlikte proliferasyon, anjiyogenez, invazyon, metastaz ve/veya apoptozun inhibisyonu ile tumor büyüme ve gelişmesi stimüle edilir [Salomon et al., 1995], [Wells, 1999], [Woodburn, 1999]. Malignansilerde EGFR'ın aşırı ekspresyonu ve regülasyondan çıkması ile ilgili farklı rakamlar rapor edilmiştir. Örneğin bazı çalışmalar EGFR ekspresyonundaki bozulmuş regülasyon epitel tümörlerin en az %50'sinde görüldüğünü [Aaronson, 1991], [Earp et al., 2003] bazı çalışmalar epitel malignansilerin üçte birinde EGFR'ın aşırı ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir [Mendelsohn, 2001].

Baş ve boyun kanserlerinde EGFR pozitif tümörler çoğunluktadır [Mendelsohn, 2001]. Çalışmalar ayrıca idrar kesesi, beyin, göğüs, servikal, bağırsak, rahim, yemek borusu, glioma, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCL), yumurtalık, pankreas ve böbrek kanserlerinde de EGFR'ın aşırı ekspres edildiğini göstermektedir (Tablo 2.1) [Nicholson et al., 2001], [Herbst, 2002], [Mendelsohn and Baselga, 2003].

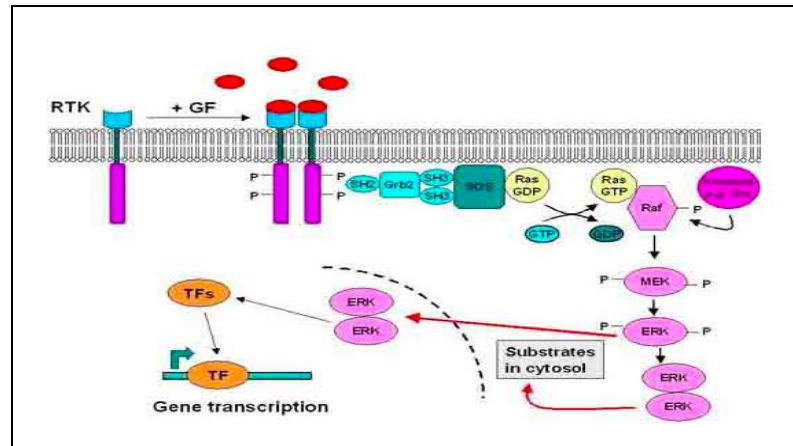
Tablo 2.1: EGFR'ı aşırı ekspres eden tümörler, tümör tipine göre gösterilmesi.

Tumor type	Percentage of tumors
Bladder	31–48
Breast	14–91
Cervix/uterus	90
Colon	25–77
Esophagael	43–89
Gastric	4–33
Glioma	40–63
Head and neck	80–100
Ovarian	35–70
Pancreatic	30–89
Prostate	40–80
Renal cell	50–90
Non-small-cell lung	40–80

2.2.1.1. ERK MAPK Yolağı

MAPK yolağının ERK üzerinden aktif olan kısmında en çok çalışılan kinazlar ERK1 ve ERK2'dir. Ayrıca asbest ile indüklenen epitel ve mezotelyal hücrelerde ERK5 ve BMK proteinleri karakterize edilmiştir [Ramos-Nino et al., 2004]. ERK1 ve ERK2 kinazları küçük G protein olan Ras'ın aktive edilmesi kısmında kesişir [Şekil 2.4] [Web1, 2013].

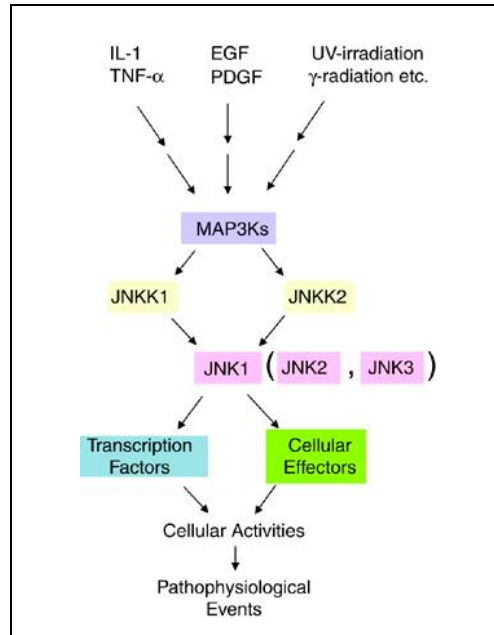
Fosforile olan ERK nükleusa geç ederek ELK-1 adlı transkripsiyon faktörünü fosforile eder, bu fosforilasyon sonucunda c-fos geninin transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleşmiş olur [Gille H. et al., 1992]; [Marais R. et al, 1993].



Şekil 2.4: MAPK sinyal yolağı.

2.2.1.2. JNK MAPK Yolağı

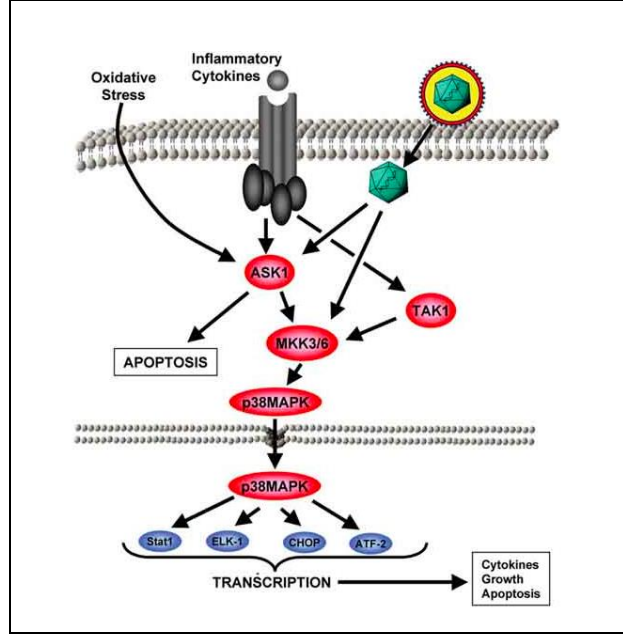
Sitokinler ve stres ile aktif olan diğer MAPK yolakları JNK ve p38 yolaklarıdır. JNK protein kinazlarını kodlayan 3 gen karakterize edilmiştir. Bunlardan JNK1 ve JNK2 tüm hücrelerde sentezlenirken JNK3 beyin ve testislerde sentezlenmektedir. JNK tarafından fosforile edilen c-jun'un transkripsiyonel aktivitesi artmaktadır. Elk-1 ve ATF2 (Aktive Edici Transkripsiyon Faktör 2) transkripsiyon faktörleri de JNK yolağı tarafından regüle edilmektedir [Ip YT et al., 1998], [Şekil 2.5], [Web 2 , 2013].



Şekil 2.5: SAPK/JNK sinyal yolağı.

2.2.1.3. p38 MAPK Yolağı

Çevresel stres, sitokinler ve endotoksinler ile aktive olan diğer bir stress yolağı ise p38'dir. p38 protein ailesi p38α, p38β, p38γ ve p38δ'dan oluşan 4 üye içerir. Elk-1 ve ATF2' nin yanı sıra MEF-2C, CHOP ve SAP-1 p38 ile aktif hale geçen transkripsiyon faktörlerindendir [Rincon M et al., 2000], [Şekil 2.6], [Web 3, 2013].

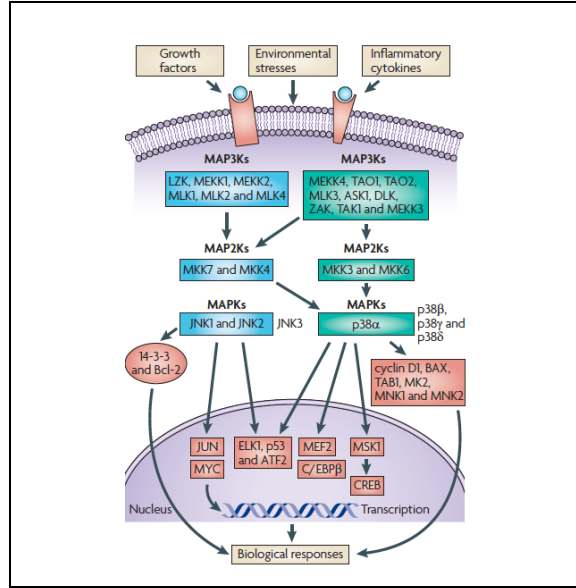


Şekil 2.6: p38 MAPK yolağı.

MAPK yolağının önemli fonksiyonlarından biri de AP-1 aile üyeleri gibi erken cevaplı proto-onkogenleri regüle etmesidir [Rincon M et al., 2000]. MAPK'lar transkripsiyon öncesi, transkripsiyonda ve transkripsiyon sonrası birçok basamakta düzenleme görevine sahiptir. MAPK'lar tarafından gen ekspresyonunun düzenlenmesi ayrıca protein degradasyonu yoluyla da yapılmaktadır. Örneğin, JNK tarafından fosforile edile c-jun'un ubiquitinleşmesi ve degradasyonu engellenerek yarı ömrü uzatılmaktadır [Fucsh S. et al., 1996]; [Musti A. et al., 1997]

Erken cevaplı onkogenler ya da AP-1 proto-onkogenleri fos (c-fos, fra-1, fra-2, fosB) ve jun (c-jun, junB, junD) ailelerinden oluşmaktadır. Fos ve jun genleri, transkripsiyon faktörü olan AP-1 ailesinin alt ünitelerini sentezlemektedirler [Reddy S. et al., 2002]. AP-1 kompleksi Jun-Jun homodimerleri, Fos-Jun heterodimerleri ve diğer bazik-lösin fermuarlı proteinlerden (ATF2) oluşmaktadır [Karin M. et al., 1997]. Bu kompleksler hücre proliferasyonu ve hücrelerin hayatta kalmasında (survival) görev alan bir çok genin promotör/hızlandırıcı (enhancer) bölgelerinde yer alan TRE (TPA response element) 'ye bağlanarak gen ekspresyonunu kontrol eder. Farklı dimer kombinasyonları farklı TRE'lerin transkripsiyonel aktivasyonunu ve DNA bağlanma afinitelerini belirler; AP-1 kompleksinin spesifitesi, kompleksi oluşturan alt ünitelere bağlı olarak değişir. MAPK'lar AP-1 transkripsiyon aktivitesini, AP-1 genlerini regüle ederek ya da özel bazı Fos ve Jun genlerinin alt

ünitelerini fosforile ederek düzenlerler [Karin M et al., 1997], [Şekil 2.7], [Wagner et al., 2009].



Şekil 2.7: Mitojen aktivasyonlu protein kinaz yolağının aktivasyonu.

Asbest ile indüklenen mezotelyal hücrelerde transformasyonun, AP-1 kompleksinin DNA'ya bağlanmasında artış ile orantılı olduğu görülmüştür. Ayrıca AP-1'in DNA'ya bağlanmasındaki artışın hasta ve normal rat mezotelyal hücreler kıyaslandığında, hasta olan örneklerde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Asbeste maruz bırakılan rat plevral mezoyelyal (RPM) hücrelerinde AP-1 komponenti olan c-Jun, JunB v Fra-1 ekspresyonlarında artış olduğu tespit edilmiştir [Ramos Nino et al., 2002].

2.2.1.4. JAK/STAT Yolağı

STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) proteinleri neredeyse tüm sitokin kaynaklı sinyallere aracılık etmektedir. Bu proteinler sitoplazmada inaktif halde bulunmaktadır. JAKs (Janus Kinase) ya da büyüme faktörü reseptör tirozin kinazlar aracılığı ile fosforile olup aktif hale geçerler. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda src ve abl gibi bazı reseptör olmayan tirozin kinazların da STAT proteinlerini fosforillediği bulunmuştur. Fosforillenme sonucu nükleusa göç eden STAT'lar diğer transkripsiyon faktörleri ile beraber gen ekspresyonu

düzenlerler [Horvath, 2000]. Normal hücrelerde liganda bağımlı STAT aktivasyonu geçici olup, dakikalarca ya da saatlerce sürmektedir. Transformasyonun temel nedeni sayılabilecek hücre büyüme regülasyonu bozukluğu oluşan kanser hücrelerinde ise STAT proteinler (özellikler STAT 1, 3 ve 5) kalıcı olarak fosforillenmekte ya da aktive olmaktadır [Bromberg and Darnell, 2000].

ERK1/2 fosforilasyonunun ve ERK2 aktivitesinin asbest fiberlerine maruz bırakılan rat plevral mezotelyoma hücrelerinde arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca EGF ve TGF- α ile indüklenen hücrelerde ERK'lerin aktivasyonu görülürken PDGF ve IGF-1 uygulanan hücrelerde değişiklik görülmemesi EGFR'nin kritik önemini göstermektedir [Zanella et al., 1999].

2.2.1.5. PDGFR Yolağı

EGFR dışında diğer reseptör tirozin kinaz molekülleri de MM'de aktive olmaktadır. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) bağ doku hücreleri ve mezotelyal hücreler için doza bağlı artan miktarlarda mitojenik özellik göstermektedir. PDGF reseptörlerinin de (PDGFR) malign mezotelyoma hücrelerde normal mezotelyal hücrelerle kıyaslandığında farklı ekspresyon özellikleri gösterdiği belirtilmiştir. Malign hücrelerde PDGFR- β ekprese olurken normal mezotelyal hücrelerde PDGFR- α sentezlenmektedir [Langerak et al., 1996].

2.2.1.6. VEGF Yolağı

Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF) MPM hücreleri tarafından sentezlenen diğer bir büyüme faktörü olup endoteliyal hücre reseptörlerine bağlanarak yeni damar oluşumunu indüklemektedir [Pasello and Favaretto, 2009]. VEGF ile MPM arasında büyük bir ilişki bulunmaktadır çünkü VEGF seviyesi bu kanser türünde diğer tüm solid tümörlerle kıyaslandığında fazlalık göstermektedir. Artan VEGF seviyesi ile hastaların yaşama süreleri ters orantı göstermektedir [Demirag et al., 2005].

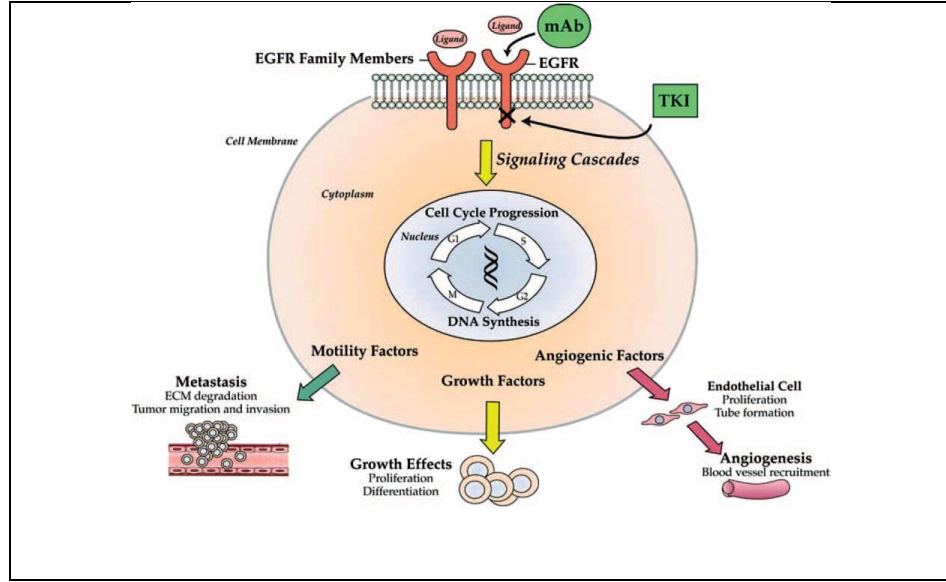
2.2.1.7. c-MET Yolağı

c-MET birçok malignanside rol oynayan bir tirozin kinaz reseptörü olup HGF (hepatosit büyüme faktörü) bu reseptörün bilinen tek ligandıdır [Zucali et al., 2010]. Bu yolağın aktif hale gelmesi ile hücre büyümesi, hareketliliği, invazyonu, metastazı ve anjiyogenezi gibi birçok hücresel faaliyet aktifleşmiş olur [Pasello and Favaretto, 2009]. c-MET ile aktif hale gelen yolaklardan bazıları Ras/Erk, PI3K/Akt ve c-Src yolaklarıdır [Mazzone and Comoglio, 2006], [Giaccone and Zucali, 2008]. Ayrıca HGF seviyesi normal hastalarla kıyaslandığında MPM hastalarında daha fazla olduğu için bu molekülün hastalığın tanı, teşhis ve tedavisinde biyomarker olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [Pasello and Favaretto, 2009].

2.3. Küçük Molekül Tirozin Kinaz İnhibitörleri

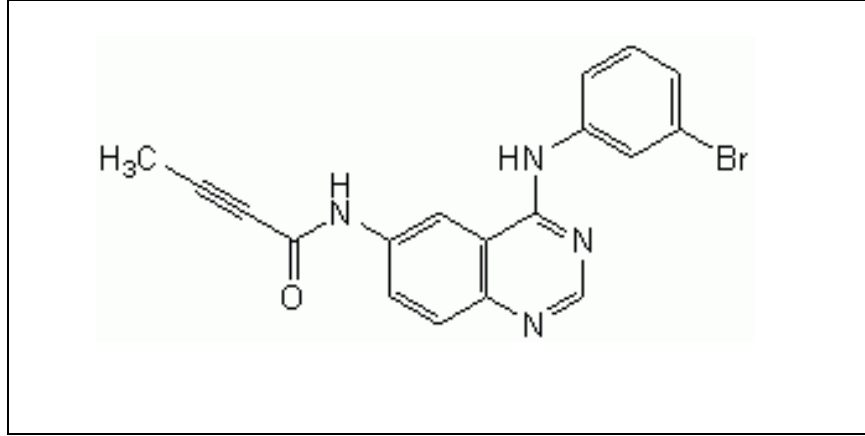
Protein kinazların üç boyutlu yapıları ile ilgili bilginin artması; elliden fazla protein kinazın X-ışın kristalografik yapılarının belirlenmesi; ATP bağlanma bölgesinin çeşitli kısımlarındaki (adenin bölgesi, şeker bölgesi, hidrofilik ve hidrofobik kanallar ve fosfat bağlanma bölgesi) moleküler etkileşimlerin anlaşılması ilaç geliştirilmesini hızlandırmıştır. ATP bağlanma bölgesini tirozin kinazlar arasında korunmuş olmasına karşın, küçük farklılıklar yüksek selektif inhibitörlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Klinik gelişme gösteren birçok küçük molekül hedefledikleri kinazların ATP bağlanma bölgesinin yakınına, yapı iskeletlerinin bir bölümünü ATP'deki adenini taklit ederek bağlanırlar. Bu ATP mimikleri katalitik bölgedeki substrat bağlanma bölgesinin rekabetçi (kompetitif) inhibitörleri olup endojen ATP ile (genellikle hücrede milimolar seviyesinde) bağlanmada yarışırırlar [Şekil 2.8]. İlk bileşikler zayıf çözünürlük ve optimum seviyede bir hedef inhibisyonu için yüksek dozda uygulanabilir moleküller olarak üretilmişler sonrasında çözünürlüklerinin arttığı fakat kinaz domaine afinitelerinin azaldığı yeni bileşikler üretilmiştir. Bu problemleri çözmek için dönüşümsüz (irreversible) inhibitörler geliştirilmeye başlamıştır. Bunlarda temel amaç seçici inhibitörün kinaz bölgesine kovalent bağ ile bağlanıp katalitik etkinin tamamen engellenerek bu inhibitörlerin potansiyel ilaç olarak kullanımı hedeflenmiştir. Bu mekanizma ile çalışıp sırası ile EGFR ve HER-2 reseptörlerine bağlanan CI-1033 (Pfizer) and EKB-569 (Wyeth) inhibitörlerine ek

olarak birden fazla tirozin kinazı hedefleyip birçok yolağı bloklayan ve gelişmiş anti-kanser etki gösteren inhibitörler de bulunmaktadır. PKI-166 EGFR ve HER-2'yi inhibe ederken, SU6668 ise VEGFR, PDGFR ve FGFR'ı inhibe etmektedir [Madhusudan and Ganesan, 2004], [Harari, 2004].



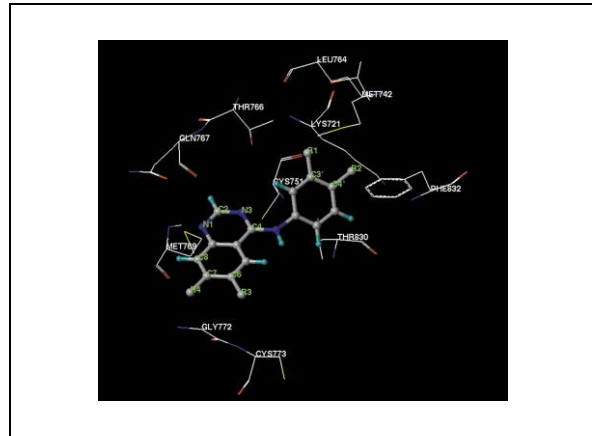
Şekil 2.8: EGFR inhibitörü olan mAB ve TKI için bağlanma bölgeleri ve sinyal yollarının şematize gösterimi.

Kolorektal kanserde kullanılan FDA onaylı cetuximab ve panitumumab; baş ve boyun yassı hücreli karsinomalarda kullanılan nimotuzumab monoklonal antikorlardan bazıları olup yine yakın zamanlı çalışmalarda kullanılan lapatinib göğüs kanserinde kullanılan küçük molekül tirozin kinaz inhibitörlerinden bazılarıdır [Wykosky et al., 2011] [Tablo 2.2][Web 4]. Küçük molekül tirozin kinaz inhibitörlerinden olan CL'nin (Şekil 2.9) [CalBiochem], EGFR ve Erb-2'ye kovalent olarak bağlanıp reseptörleri bloke ederek EGF ile stimüle edilen otofosforilasyonu dönüşümsüz olarak inhibe ettiği bildirilmiştir [Discafani C.M. et al., 1999].



Şekil 2.9: CL 387, 785 ajanının moleküler yapısı.

CL erbB-1'e C773 (sistein 773) bölgesinden bağlanır [Landau et al., 2008] (Şekil 2.10) [Fry, 2003] ve ATP bağlanma cebinin sistein kısmında gerçekleşen Michael tipi katılma reaksiyonlarını etkileyerek EGFR fosforilasyonunu engellemektedir. Bu kovalent bağlanma sayesinde ATP bağlanma bölgesi büyük oranda inhibitör tarafından tutulduğundan T790M etkisini görülmez [Ghosh et al., 2010]. 790. kodondaki treonin amino asitinin metionine dönmesi sonucu oluşan T790M mutasyonu kanser tedavisinde ilaca karşı direnç oluşumunun en temel nedenlerinden biridir [Nurwidya et al., 2013].



Şekil 2.10: ATP-kompetitif inhibitörlerinin erbB-1 üzerinde bağlandıkları bilinen amino asit bölgelerinin moleküler modeli.

Kinaz inhibitörlerini hedefleyerek yapılan kanser tedavilerinde en çok karşılaşılan problemlerden biri hücrelerin inhibitörlere karşı direnç kazanmasıdır.

EGFR’da meydana gelen mutasyonlar hücrelerin ilaca verecekleri tepkiyi etkileyen en önemli etkenlerdendir. Spesifik mutasyonlar yada mutasyonların kombinasyonları sonucu EGFR ve inhibitor arasındaki dinamik etkileşim değişmektedir. Bu da birçok tümörde ilaca karşı verilen tepkiyi değiştirmektedir. Bu durumlarda dönüşümsüz olarak bağlanan inhibitörler oluşan/oluşabilecek dirence karşı tek başına ya da diğer inhibitörlerle kombine halde kullanılmaktadır. En çok görülen mutasyonlardan olan 790. amino asitteki (ATP bağlanma bölgesi) treonin-metionin değişimi klinik vakaların %50’sinde EGFR’ ın EGFR TKI’ne karşı direnç göstermesine neden olmaktadır [Kosaka et al., 2006], [Pao et al., 2005], [Ma et al., 2011], [Remon et al., 2014].

Tablo 2.2: FDA tarafından onaylı küçük molekül tirozin kinaz inhibitörleri.

Inhibitor	Trade Name	Target	Cancer Type
Imatinib mesylate	Gleevec	ABL, c-KIT, PDGFR	Ph+ CML, GISTs, ALL
Dasatinib	Sprycel	SFK, ABL	CML, ALL
Nilotinib	Tasigna	ABL	CML
Bosutinib	Bosulif	SFK, ABL	CML
Gefitinib	Iressa	HER1	NSCLC
Erlotinib	Tarceva	HER1	Lung
Lapatinib	Tykerb	HER1, HER2	Breast, others
Vandetanib	Caprelsa	EGFR, VEGFR, RET	Medullary thyroid
Crizotinib	Xalkori	EML4-ALK	NSCLC
Sunitinib	Sutent	VEGFR, PDGFR, c-KIT, FLT-3	GIST, renal
Sorafenib	Nexavar	B-Raf, VEGFR, PDGFR	Renal, hepatocellular, prostate
Pazopanib	Votrient	VEGFR, c-KIT, PDGFR	Renal; soft tissue sarcoma
Regorafenib	Stivarga	VEGFR, TIE2, PDGFR, RET, c-KIT, RAF	Colorectal
Cabozantinib	Cometriq	VEGFR, RET, MET, TRKB, TIE2	Medullary thyroid

Abbreviations: ABL, Abelson kinase; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; SFK, Src family kinases; HER, human epidermal growth factor receptor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor family; Ph+ CML, Philadelphia chromosome + chronic myeloid lymphoma; GIST, gastrointestinal stromal tumor; NSCLC, non-small cell lung carcinoma.

EGFR ekzon 20’ de meydana gelen mutasyon sonucu hücrelerin gefitinib ve erlotinibe direnç kazandığı fakat CL 387,785’in bu hücrelerde koloni oluşumunu engellediği gözlemlenmiştir [Sasaki et al., 2007].

Ayrıca CL’nin yapılan diğer bir çalışmada ekzon 20’de görülen nokta mutasyonu (T790M) sonucu kazanılan dirence karşı EGFR’ ı bloke ederek sinyal iletim moleküllerini baskıladığı gözlemlenmiştir [Kobayashi et al., 2005].

Pasi et al. (2008) tarafından yapılan çalışmada NSCLC’de uygulanan ve gelecek vadede gefitinib ve erlotinib, EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinden ikisidir. Bu iki inhibitörden herhangi birisi ile tedavi edilen hastaların %10-20 oranında anlamlı bir cevap alınmaktadır. Çalışmaların devamında cevap alınan hastaların

EGFR geninde aktif mutasyon olduğu ve gen kopya sayısının arttığı tespit edilmiştir. Uzun süreli tedavi sonucunda hastalar inhibitörlere direnç kazanmaktadır ve tümör gelişimi sürmektedir. Direnç mekanizması ya EGFR genindeki T790M mutasyonundan ya da MET proto-onkogenindeki artıştan kaynaklanmaktadır. T790M mutasyonunun sterik engel (hindrance) yüzünden gefitinib/erlotinibin ATP bağlanma bölgesine bağlanmasına engel olduğu düşünülmektedir. T790M gibi direnç mekanizmasını aktif hale getiren mutasyonlara karşın geri dönüşümsüz TKI'leri geliştirilmektedir. Bu çalışmada; EGFR'ın mutasyonlu ve amplifiye olduğu H3255 hattına ve gefitinib dirençli (GRH3255) hücrelerine gefitinib ve CL-387,785 maddeleri uygulanmış; gefitinibe hassas hücrelerde (H3255) her iki maddede apoptozu indüklerken, GRH3255 hücrelerinde yalnızca CL' nin apoptozu indüklediği görülmüştür. Diğer bir çalışmada EGFR geninin 746-750 bölgeleri arası silinen ve sonucunda tirozin kinazın aktivasyon bölgesindeki ATP bağlanma kısmı açıkta kalan PC9 GR (delE746-750/T790M) NSCLC hücrelerine çeşitli tirozin kinaz inhibitörleri uygulanmıştır. CL-387, 785 inhibitörünün büyüme, bölünme, anjiyogenez gibi birçok temel hücresel faaliyette rol alan p-EGFR, p-AKT ve p-ERK1/2 sinyallerini artan dozlarda baskıladığı belirtilmiştir. delE746-750/T790M mutasyonlarını taşıyan 3T3 hücrelerine CL uygulaması yine p-EGFR'ı baskılamaktadır [Zhou et al, 2009]. Chiu ve grubu (2012) tarafından yapılan bir diğer çalışmada gefitinibe L858R ve T790M mutasyonları sonucu direnç kazanmış H1975 hücrelerinin CL uygulanmasına daha net yanıt verdiği görülmektedir. CL'nin çeşitli kanser türlerinde örneğin küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde [Kobayashi et al., 2005] ve göğüs kanserinde [Mayer et al., 2009] EGFR' ı bloke ederek sinyal iletim moleküllerini baskıladığı gözlemlenmiştir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERİYAL

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

CL-387,785 (Calbiochem, 233100), UO126 ethanolate (Sigma U120), SB 202190 (Sigma S7067), SP600125 (Sigma Aldrich S5567) Fetal Bovine Serum (Lonza, DE14-802F; HyClone, SV30180.03), 10X Tyrpsin (Lonza, BE17-160E), Penicillin-Streptomycin (HyClone, SV30010), Yağsız süt tozu (%5), Agarose (Sigma, A9539), Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (Intron, 21141), ECL (Thermo Scientific 32106; Thermo Scientific Plus, 32132), RT-PCR (Qiagen RNeasy Mini Kit, 74104), DEPC (AppliChem A0881,0100), RNaseZAP (Sigma R2020), DMSO (Sigma D5879), RPMI 1640 (Sigma Aldrich R6504; Lonza 15-7020; HyClone SH3001103), Page Ruler Prestained (Thermo Scientific 26616), Akrilamid/bisakrilamid (MP BIAC3752, %40; AppliChem UN3426 ,%40), Medium 199 (Sigma Aldrich M5017) , BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227).

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

CO₂ inkübatörü (Thermo Forma), Laminar Akım Kabini (Herau Safe), Su banyosu (Mettler), Plate Reader (Varioskan Flash), Işık Mikroskobu (Nikon TMS), Floresans Mikroskobu (Nikon, Eclipse Ti-S), Dikey Elektroforez ve Transfer Sistemi (BioRad Mini Protean), PVDF Western Blotting Membrane (Amersham Biosciences, Hybond-P), Soğutmalı Mikrosantrifüj (Beckman Coulter 22R), Mikrosantrifüj, (Eppendorf Mini Spin), Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22, Eppendorf Centrifuge 5810R), Sıcaklık İnkübatörlü Çalkalayıcı (BioSan , ES-20), Termal Döngü Cihazı (BioRad), Gerçek Zamanlı Termal Döngü Cihazı (Roche, LC480II), Hassas terazi (Precisa XB320M), -80°C Dondurucu (Symphony), pH Metre (Mettler Toledo), Jel Görüntüleme Sistemi (BioRad, ChemiDoc XRS+), Vortex (Yellowline TTS2), Sıvı Azot Tankı (Arpege 140), Otoklav (Hirayama, HVE-50), Orbital Shaker (IKA, Yellow line), Isıtıcı Blok (VWR), Manyetik karıştırıcı (Heidolph).

3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar

M199: 500ml besiyeri için M5017 Sigma besiyerinden 4.75 gr tartılır 50 ml suda çözülür, 0.62 gr NaHCO_3 50 ml suda çözünür, 100 ml'lik karışım 0,22 μM 'lık filtreden geçirilir. Karışım otoklavlanmış 333 ml distile suya eklenir, 5 ml pen/strep, 50 ml FBS, 10 ml HEPES (final konsantrasyon 20 mM), 2 ml L-glutamine (final konsantrasyon 0,75 mM), 10 μM EGF (3.3 nM final konsantrasyon), 1445 μM hydrocortizone (400 nM final konsantrasyon), 250 μM insulin (870 nM final konsantrasyon) eklenerek besi yerinin pH'ı 7.2-7.4 arasında olacak şekilde ayarlanır.

RPMI: R6504 Sigma besiyerinden 5.2 g tartılır 50 ml suda çözülür, 1g NaHCO_3 50 ml suda çözülür, 100 ml'lik karışım 0,22 μM 'lık filtreden geçirilir. Karışım otoklavlanmış 345 ml distile suya eklenir, 5 ml pen/strep ve 50 ml FBS eklenerek besi yerinin pH'ı 7.2-7.4 arasında olacak şekilde ayarlanır.

EGF (Sigma E9644) asetik asit ile çözülmüştür. 0,2 mg (toz) stok EGF'e 0,2 ml (10mM) asetik asit karıştırılarak 1 mg/ml EGF stok hazırlanmıştır. Deneylerde kullanılan EGF serumsuz besiyeriyle 100 μM olacak şekilde seyreltilmiştir.

10X PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.4 g KH_2PO_4 son hacim 1 L olacak şekilde distile su içerisinde çözüldükten sonra (pH 7.4), 0,22 μM 'lık filtre yardımı ile sterilize edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek 1X PBS olarak kullanılmıştır.

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

1X Puck's Saline A: 6 g NaCl, 0.4 g KCl, 10 g Glukoz (D- Glukoz), 0.0005 g Fenol Red, 0.35 g NaHCO_2 ya da NaHCO_3 100 ml suyun içinde çözülüp 0,22 μM 'lık filtreden geçirilip, pH 7.2'ye ayarlanır. Sonrasında 1 lt'ye steril dH_2O ile tamamlanır.

Hücre Dondurma/Stok Medyumu: FBS'e %5 (v/v) olacak şekilde DMSO eklenerek hazırlanmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

10X SDS-Yürütme Tamponu: 30.3 g Tris Base, 144.1 g Glisin ve 10 g SDS tartılarak toplam hacim 1 L olacak şekilde distile su (dH_2O) içerisinde çözülmüştür. SDS-PAGE için kullanılacağı zaman ise distile su ile 1:10 seyreltilerek (1X) kullanılmıştır.

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

1X Transfer Tamponu: Hazırlanacak toplam hacmin %10'u 10X Transfer tamponu, %20'si metanol içerecek şekilde solösyonlar mezür ile ölçölmüş ve hacmin geri kalanı dH₂O ile tamamlanmıştır. (1 L 1X Transfer Tamponu için; 100 ml 10X Transfer Tamponu + 200 ml metanol + 700 ml dH₂O).

4X SDS Yökleme (Laemmli) Boyası: 0,134 ml Tris-HCl (0,2 M pH 6.8), 0.8 g SDS(%40 SDS'ten 0,4 ml), %40 Gliserol (0,8 ml %100), %0.4 (w/v) Bromophenol Blue (%3 'lükten 0,267 ml), %20 β -Mercaptoethanol(%100'lükten 0,4 ml), toplam hacim 2 ml olacak şekilde dH₂O eklenerek falkon tüpte birbirlerine iyice karışması sağlanmıştır. Karışım homojen hale getirildikten sonra alüminyum folyo ile sarılarak -20oC'de muhafaza edilmiştir.

10X TBS: 0,5 M Tris-HCl (250 ml %100 Tris-HCl'den, pH 7.4), 1,5 M NaCl (187,5 ml ,4 M NaCl'den) yaklaşık 800-900 ml dH₂O içerisinde çözölmüş ve HCl ile pH aralığı 7.4-7.6'ya ayarlanarak final hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

1X TBS-T: 10X TBS tamponu distile su ile 1:10 oranında sulandırılarak 1X TBS hazırlanmıştır. Elde edilen 1X TBS içerisine ise %0.1 (v/v) olacak şekilde Tween 20 eklenmiştir.

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

Tris-HCl Çözeltileri: SDS-Poliakrilamid jel için iki ayrı Tris-HCl çözeltisi (1.5 M pH 8.8 ve 1 M pH 6.8) kullanılmaktadır. İstenilen hacim için 1.5 M olacak şekilde Tris tartılmış ve bir miktar dH₂O içerisinde çözölmüştür. Derişik (12.2 M) HCl ile pH'sı 8.8'e diğer Tris çözeltisinin pH'sı 6.8'e ayarlandıktan sonra dH₂O ile son hacime tamamlanmıştır.

RNase'sız Su: Ticari olarak alınan 1ml DEPC, koyu şişe içerisinde 1 litre çift distile suya (ddH₂O) eklenerek gece boyu karıştırılmış ve 121oC'de 20 dk otoklav edilmiştir.

Liziz Tamponu: 150 mM NaCl (15 ml, 1 M NaCl'den), 1 mM MgCl₂ (0,1 ml, 1 M MgCl₂ 'den), %10 gliserol (10 ml), 20 mM Tris (2 ml, 1 M Tris-HCl, pH 7,5-8), %1 Triton X-100 (1 ml), 71,9 ml dH₂O

3.2. METOD

3.2.1. Hücre Kültürü ve Alt Kültürleme

Met5A hücreleri ve SPC-212 hücreleri %10 (v/v) FBS ve %1 Pen/Strep içeren sırasıyla M199 ve RPMI besiyerlerinde 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında inkübatörde büyütülmüştür. Hücrelerin besiyeri ortalama 2-3 günde bir taze besiyeri ile değiştirilirken, yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler ise pasajlanmıştır.

Hücrelerin yoğunluğu (confluency), büyütüldükleri flaskta yaklaşık % 90-100 oranına ulaştığında alt kültürleri yapılmıştır. Flasktaki besiyeri vakum yardımıyla çekildikten sonra yaklaşık 1-2 ml (25 cm²'lik petri için) 1X PBS ile yıkanan hücrelere, hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantılarını ayırmak için 1-1.5 ml 1X Tripsin eklenerek hücreler kaldırılmıştır. Oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk santrifüjün ardından üst sıvı çekilir (tripsin ve besi yeri) ve belirlenen oranda (1:3) seyreltmek amacıyla tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstüne taze besiyeri eklenir. Hücre çökeltisi homojen olarak dağıtıldıktan sonra taze besiyeri bulunan flasklara nazikçe ilave edilir ve 37°C'de nemli, %5 CO₂ inkübatöründe büyümesi sağlanır.

3.2.2. Hücre Stoklama

1X tripsin ile flasktan kaldırılan hücreler üzerlerine 5:1 oranında besiyeri eklenerek tripsinin etkinliği azaltılmıştır. Hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldükten sonra üst kısımdaki sıvı atılarak pellet 1 ml hücre dondurma solüsyonu ile süspanse edilmiştir. Solüsyon kriyo tüplere aktarılarak hızlı bir şekilde buzda -80°C'ye ve sonrasında -196 °C'ye aktarılmıştır.

3.2.3. Hücre Proliferasyon Testi

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla kullanılan MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium salt), canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu, tetrazolium tuzunun, renkli bir ürüne dönüştürülmesi temeline dayanır. Dehidrogenaz enzimlerinin ürettiği formazan

miktarı, kültürdeki canlı hücre sayısı ile ve mitokondriyel aktivite ile doğru orantılıdır ve spektral yöntemler kullanılarak 490 nm’de formazan miktarı ölçülebilir.

Met5A ve SPC-212 hücre hatları, 200 µl’de 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekilerek, FBS içeren besiyerinde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra 1,5,10,20 ve 30 µM’lik CL-387,785 ile muamele edilen hücreler 0- 96 saatler arasında izlenmiştir. MTS deneyi için CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferasyon Assay kiti (Promega) kullanılmıştır. 20 µl MTS bileşiği, 200 µl besiyeri içeren her bir kuyuya eklendikten sonra, 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmış, bu sürenin sonunda plate 25°C’de 5 dakika bekletilerek reaksiyon içeriğinin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Mikroplate Reader (Thermo, Varioskan Flash) kullanılarak 490 nm dalga boyunda fotometrik ölçüm yapılmıştır. Ortalamalar ve standart sapmalar Mikrosoft Excel programı kullanılarak; istatistiksel hesaplamalar Annova ve Benforoni testleri ile SPSS programında yapılmıştır.

3.2.4. Protein İzolasyonu

Petrilere 2X106 SPC212 hücresi ekildikten 24 saat sonra PBS ile yıkanan hücreler serumsuz besi yerinde starvation tabi tutulmuştur. EGFR, ERK, JNK, p38 proteinlerinin aktivasyonu ve toplam protein seviyelerinde doza bağlı meydana gelen değişimler belirlenmiştir. SPC212 hücrelerinden CL uygulamasının 3 saat sonrasında total protein izolasyonları yapılmıştır. Hücreler izolasyonun 15 dak öncesinde EGF (100 ng/ml) ile indüklenmiştir ve üzerlerindeki besiyeri çekildikten sonra PBS ile yıkanmış ve üzerlerine 200 µl (%1 proteaz-fosfataz inhibitörü içeren) lizis buffer eklenerek hücrelerin lizisi gerçekleştirilmiştir. 14000 g’de 7 dakika santrifüj edilen hücrelerin supernatantı yeni bir tüpe aktarılmıştır. Protein lizatından 20 µl BCA assay için ayrılmıştır. Proteinler – 20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Protein Miktar Tayini

İzole edilen total protein miktarları Thermo BCA Protein Assay ile belirlenmiştir. BCA (bicinchoninic acid) içeriğinde bulunan Cu^{+2} iyonlarının, alkali ortamda protein ile tepkimeye girmesiyle Cu^{+} ’ya indirgenmesi (Biuret tepkimesi) sonucu oluşan mor-menekşe renkli ürünün kolorimetrik olarak ölçülmesi temeline

dayanmaktadır. Oluşan ürün ise 562 nm’de maksimum absorbans vermektedir. BCA’nın iki solüsyonu (Reagent A ve B) 50:1 oranında karıştırılarak 96-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 200 µl eklenmiştir. Elde edilen protein lizatlarından ve konsantrasyonları bilinen protein standartlarından her bir kuyucuğa iki tekrarlı olacak şekilde 10’ar µl eklenerek iyice karıştırılmıştır. Kuyucuklara liziz tamponu da kör kuyucuk (blank) olarak eklenmiş, oluşan ürünün ışıktan etkilenmemesi için 96-kuyucuklu plaka alüminyum folyo ile sarılarak 37oC’de 30 dk inkübe edilmiştir. Plakanın oda sıcaklığına soğuması beklendikten sonra 562 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Protein standartlarının ve örneklerin absorbans değerlerinin ortalaması alınarak kör kuyucuğun absorbans değeri bu ortalamalardan çıkarılmıştır. Standartların absorbans değeri kullanılarak grafik çizildikten sonra doğrusal grafiğin formülü ile R2 değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan formülde ilgili yere absorbans değerleri yazılarak protein lizatlarının konsantrasyonları µg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.6. SDS-PAGE ve Western Blotting

Protein seviyelerinde meydana gelen değişimleri analiz etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western blotting uygulamaları yapılmıştır. 15 µg total protein lizatı 4X sample yükleme tamponu ile karıştırılmış, proteinleri denatüre etmek amacıyla 95oC’de 5 dk inkübe edildikten sonra örnekler kuyulara yüklenerek jelde yürütülmüştür. %10 SDS-PAGE ile ayrıştırılan proteinlerin jelden PVDF membrana aktarılması 1,5 saat 110 V elektrik akımı ile gerçekleştirilmiştir. Transfer verimliliği ve proteinlerin yeri renkli marker kullanılarak belirlenmiştir. Membran %5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T içerisinde, 80-100 rpm’de oda sıcaklığında 1saat çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Membran 1X TBS-T ile üç kez (5, 10 ve 5 dk süreyle) 240 rpm’de çalkalanarak yıkanmıştır. Membran, %5’lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilere hazırlanan primer (birincil) antikor ile +4oC’de gece boyu 80-100 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Birincil antikor ile inkübasyonun ardından membran 1X TBS-T ile 3 kez yıkanmıştır. Membran, %5’lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerek hazırlanan HRP-konjuge sekonder (ikincil) antikor ile +4oC’de 1,5 saat 80-100 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir.

İkincil antikor ile inkübasyonun ardından 1X TBS-T ile 3 kez yıkanan membran, ECL (enhanced chemiluminescence) plus kit (Pierce) içeriğindeki solüsyonlar kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde karanlık ortamda, oda sıcaklığında 5 dk muamele edilmiştir. Membran alüminyum folyo ile sarılarak ChemiDoc XRS+ (BioRad) cihazı ile görüntülenmiştir. Elde edilen protein bantlarının yoğunluğu ve protein miktarları BioRad ImageLab programı ile analiz edilerek protein seviyelerindeki değişimler karşılaştırılmıştır. Referans olarak β -aktin kullanılmış ve deney gruplarını birbirlerine göre normalize etmek amacıyla, ölçülen bant yoğunlukları her bir deney grubuna ait β -aktin bant yoğunluklarına bölünerek elde edilen değerler analiz edilmiştir. Aşağıda Tablo 3.1 'de jel konsantrasyonları ve 3.2'de deneylerde kullanılan antikorlar gösterilmektedir.

Tablo 3.1: %10'luk ayırma jeli ve %4.5'lik paketleme jeli hazırlamak için kullanılan maddeler ve miktarları.

	<i>Running Gel (%10)</i>	<i>Stacking Gel (%4.5)</i>
<i>dH₂O</i>	7.75 ml	3.1 ml
<i>Tris-HCl</i>	4 ml (pH 8.8) 1.5 M	1.25 ml (pH 6.8) 0.5 M
<i>%10 SDS</i>	159.6 μ l	50 μ l
<i>%40 Acr:Bis</i>	4 ml	562 μ l
<i>%10 APS</i>	79.8 μ l	25 μ l
<i>TEMED</i>	11.4 μ l	5 μ l

Tablo 3.2: Westen Blotting’de ilgili proteinlerin saptanması amacıyla kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile kullanılan seyreltme oranları.

<i>Birincil (1°) Antikor</i>	<i>1° Antikor Seyreltme Oranı</i>	<i>Sekonder (2°)Antikor</i>	<i>2° Antikor Seyreltme Oranı</i>	<i>Katalog Numarası</i>
EGFR	1:1000	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling 4267
p-EGFR	1:100	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling 3777
ERK1	1:200	Anti-Rabbit	1:1000	SC94
p-ERK	1:200	Anti-Mouse	1:1000	SC7383
Jnk	1:1000	Anti-Mouse	1:1000	SC7345
p-jnk	1:1000	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling 4668
p38	1:1000	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling 9212
p-p38	1:1000	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling 4511
AKT	1:1000	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling 4691
p-AKT	1:2000	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling 4060
p-c-jun	1:1000	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling 3270
β -actin	1:2000	Anti-Mouse	1:1000	SC47778
-	-	Anti-Mouse	1:2000	SC2005
-	-	Anti-Rabbit	1:1000	Cell Signaling 7074

3.2.7. Total RNA İzolasyonu

Hücrelerde CL uygulaması sonucu EGFR alt yolağında rol alan ELK-1, jun, STAT1, STAT3 ve STAT5A’nın gen ifadelerindeki değişimlerin qRT-PCR ile analiz edilebilmesi için 1×10^6 SPC212 hücresi serum starvation yapıldıktan sonra hücrelere 3 saatlik süre için 100 nM dozda CL uygulanmıştır. Lizizden 15 dakika önce 100 ng/ul EGF ile indüklenen hücrelerden total RNA izolasyonları 3, 6, 12 ve 24 saatlerde yapılmıştır.

Öncelikle RNA izolasyonu yapılacak yüzey ve kullanılacak malzemeler RNaz’sız su ile hazırlanmış %70’lik (v/v) etanol ve RNAZap ile silinmiştir. Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1X PBS kazınarak kaldırılmıştır. Falkona alınan hücre-PBS karışımı oda sıcaklığında 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Üst sıvı çekildikten sonra pelletin 350 μ l RLT buffer (liziz

buffer) eklenmiş ve RNase/DNase free tüpe alınıp lizizleri yapılmıştır. 3 dk 14000 rpm’de santrifüj edilip supernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 350 µl %70 Etanol (1:1) eklemiştir. Karışım 2 ml’lik toplama tüpüne 700 µl transfer edilip, 15 sn 8000xg yada 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Atık sıvı kısım atıldıktan sonra 700 µl RW1 buffer spin kolona eklenmiş ve 15 sn 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Daha sonra 500 µl RPE buffer spin kolona eklenmiştir ve yukarıdaki şekilde santrifüj edilmiştir, atık sıvı kısım atılmıştır. 500 µl RPE buffer spin kolona eklenmiş, 2 dk 8000xg yada 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Spin kolon 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirildikten sonra, 40 µl RNase free su eklenip RNA’yı süzmek için 1 dk 8000 g de santrifüj edilmiştir. Elde edilen total RNA karışımından 3 kez saflık ölçümü yapılması için 6 ul, jelde yürütmek için de 2-4 ul RNA ayrılmıştır.

3.2.8. cDNA Sentezi

Revers transkripsiyon reaksiyonu 100 ng RNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Random Hexamer Primer (60 µM final konsantrasyon), RNA ve su karışımı total hacim 11.4 ul olacak şekilde hazırlanmıştır. Template-primer karışımı tüpler 65 ° C ‘de 10 dakika ısıtılmıştır. Reaksiyon buffer (8 mM MgCl₂ konsantrasyonu), RNase inhibitörü, dNTP mix (final konsantrasyonu 1 mM her birinden), DTT (5 mM final konsantrasyonu), ve Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (final konsantrasyonu 10 birim) den oluşan karışım tüplere son hacim 20 µl olacak şekilde eklenmiştir. Oda sıcaklığında 29 °C ‘de 10 dakika inkübasyon sonrasında 48 ° C ‘de 60 dakika inkübe edilmiştir. 85 ° C ‘de 5 dakika bekletilerek Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase enzimi inaktif edilmiştir. Reaksiyon tüpler buza alınarak -20 ° C ‘de daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.9. RT-PCR

Primer-probe karışımından son hacim 1X olacak şekilde alınır, su ve final konsantrasyonu 1X olacak şekilde LightCycler 480 Probe Master karışımı ile PCR mix oluşturulmuştur. 1:3 oranında seyreltilen cDNA' ler toplam hacim 10 µl olacak şekilde 384'lü plağa yerleştirilmiştir. qPCR reaksiyonları LightCycler 480 sisteminde analiz edilmiştir. Referans gen olarak β -Aktin (ACTB) ve hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) kullanılırken, deney gruplarının normalizasyonu kontrol grubuna göre yapılmıştır. PCR reaksiyonlarında kontaminasyon kaynaklı olası hataların belirlenmesi amacı ile kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol grupları da kuyucuklara eklenmiştir. PCR reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin özgün olup olmadığının belirlenmesi için de bu reaksiyonlara ait erime eğrileri analiz edilmiştir. qPCR sonuçları $\Delta\Delta C_T$ metodu ile analiz edilmiştir. $\Delta\Delta C_T$ değerleri kullanılarak gen ifadelerindeki göreceli değişim hesaplanarak grafikleri çizilmiştir. Aşağıda real time reaksiyonunun sıcaklık, süre ve döngü sayıları belirtilmiştir.

Tablo 3.3: RT-PCR sırasında kullanılan sıcaklık ve süreleri.

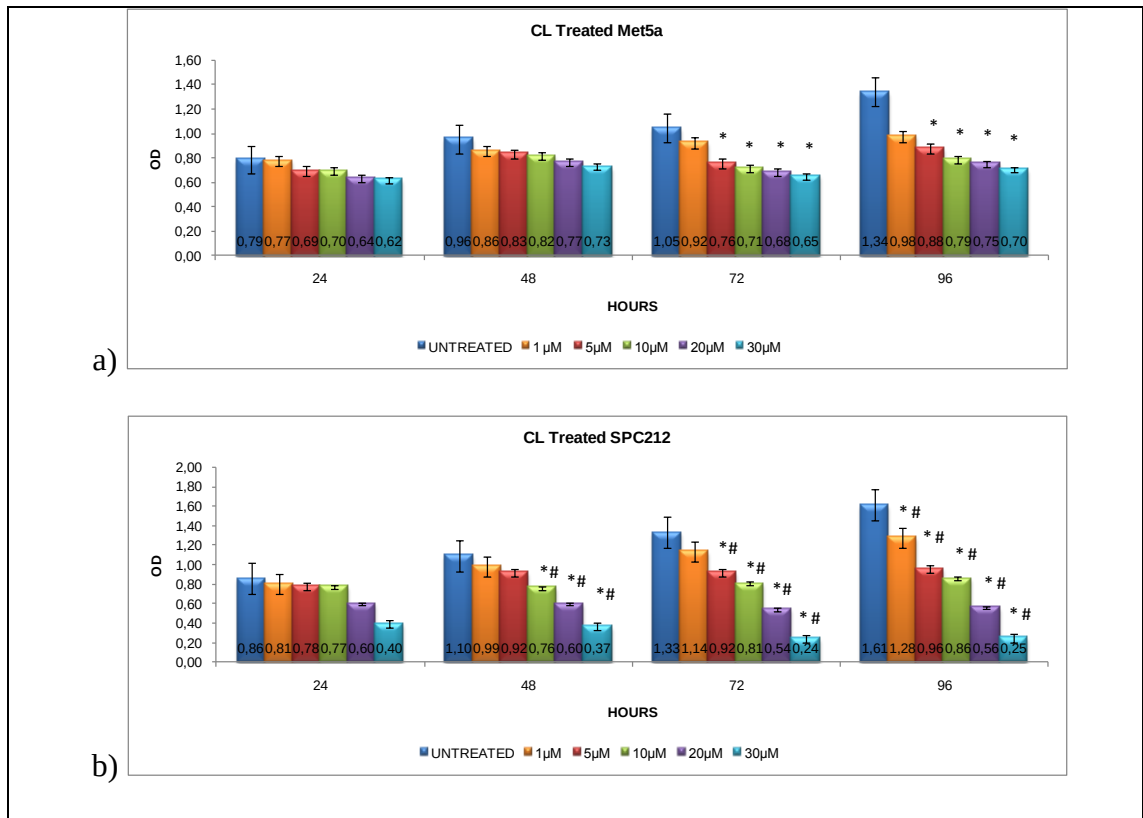
	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Pre-İnkübasyon	95	10 dakika	1
PCR Amplifikasyonu (45 Döngü)			
Denatürasyon	95	10 sn	
Bağlanma	60	15 sn	
Uzama	72	1 sn	
Soğuma	40	10 sn	

4. SONUÇLAR

4.1. CL-387,785' in Met5A ve SPC212 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Met5a ve SPC212 hücrelerinde CL molekülünün hücre canlılığına doza ve zamana bağımlı etkileri MTS hücre proliferasyon testi ile belirlenmiştir. FBS içeren besiyerinde 24 saat inkübe edilen hücrelere 0-30 μ M'lık CL eklenerek 0-96 saatler arasında hücre proliferasyonundaki değişimler incelenmiştir. Hücre canlılığı absorbans değerlerine göre değerlendirilmiştir.

Met5a hücrelerinde inhibitörün hücre büyümesi üzerindeki anlamlı azaltıcı etkisi 72. saatte 5 μ M ve üzeri dozlarda gözlemlenirken SPC212 hücrelerinde bu etki 48 . saatten itibaren 10 μ M'lık konsantrasyonlarda etkin bulunmuştur (Şekil 4.1).

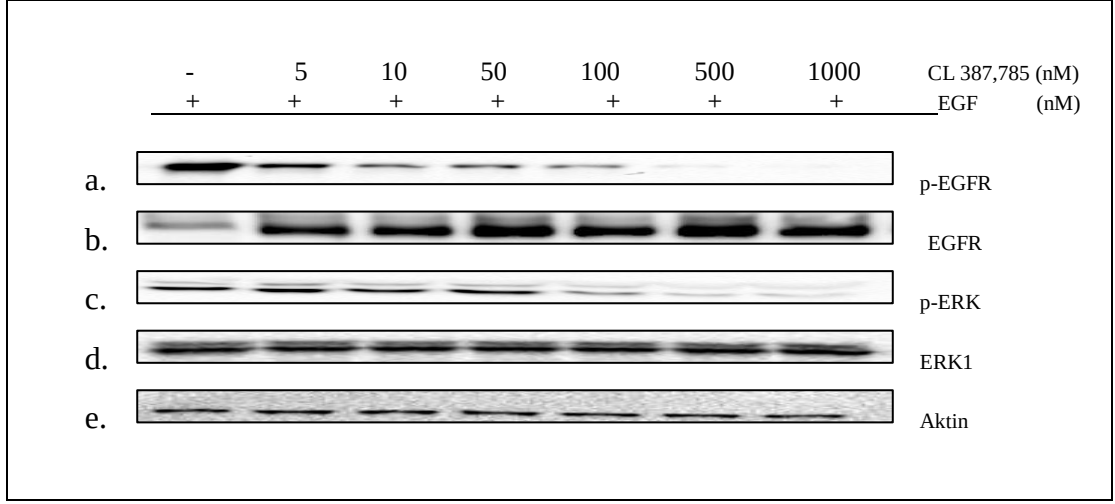


Şekil 4.1: CL' nin Met5a a) ve SPC212 b) hücre canlılığına etkisi.

Şekil 4.1’de MTS testi 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde uygulanmıştır. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin çiftli tekrarları olarak yapılmış ve ortalamaları alınmıştır. p değeri SPSS programında One way ANOVA ve Benforoni testleri ile hesaplanmıştır. p değeri *P<0,005 ve #p<0,001 olarak hesaplanmıştır.

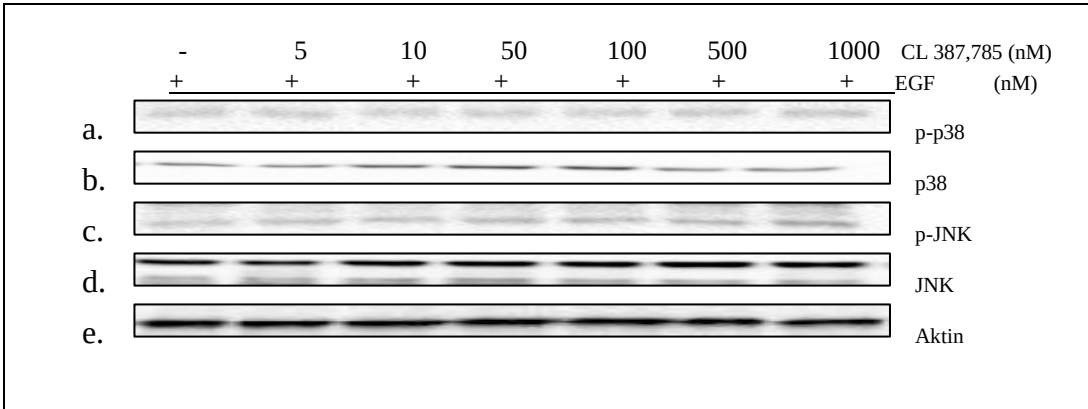
4.2. CL 387,785 Molekülünün MAPK Sinyal Yolağındaki Protein Düzeylerine Etkisi

SPC212 hücrelerinde CL 387,785’in doza bağımlı olarak MAPK sinyal yolağında rol alan bazı anahtar proteinler üzerinde etkisinin incelenmesinde, %70-80 yoğunluğundaki hücreler serumsuz besi yerine aktarıldıktan sonra, CL molekülü eklenerek 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun bitiminden 15 dakika önce hücreler EGF (100 ng/μl) ile indüklenmiştir. Protein düzeyleri SDS-PAGE ve Western Blotlama yöntemleriyle belirlenmiştir. Böylelikle spesifik EGFR inhibitörü olan CL’nin MAPK yolağındaki etkisi gözlenmiştir. Şekil 4.2’de klasik MAPK yolağının aşağı akımında yer alan ERK1/2 proteinlerinin fosforilasyonu ve toplam seviyeleri gösterilmektedir. SPC212 hücrelerinde CL, EGFR aktivasyonunu 5 ng’ın üzerindeki konsantrasyonlarda düşürmektedir. 100 ng üzerindeki konsantrasyonlarda EGFR fosforilasyonu tamamiyle inhibe edilmiştir. EGFR protein seviyesi 5 ng CL konsantrasyonu ile indüklenirken, 100 ng’dan itibaren aşağı regüle edilmiştir. ERK fosforilasyonu 100 nm üzerinde engellenirken toplam ERK seviyesinde değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4.2 : CL' nin p-EGFR a), EGFR b), p-ERK c), ERK1 d) ve aktine) proteinlerinde doza bağlı meydana getirdiği değişim. (Aktin proteini kontrol olarak kullanılmıştır.)

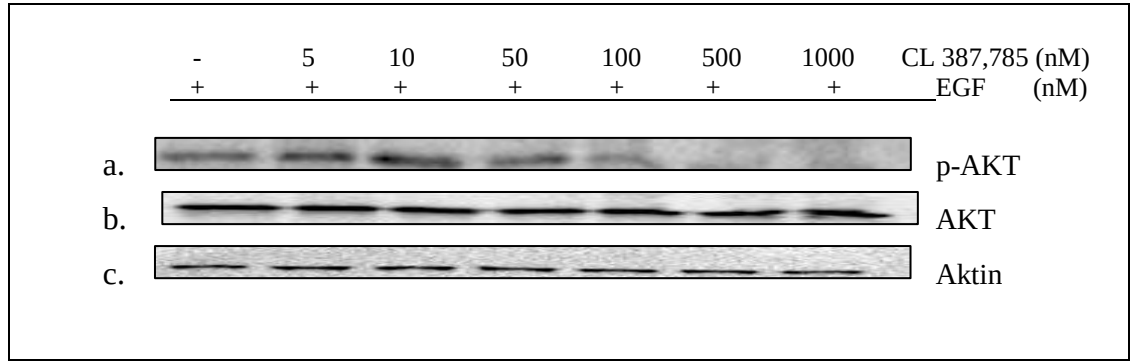
Araştırmamızda klasik MAPK/ERK yolağının analizinin takibinde stresle aktive olan MAPK yolları da incelenmiştir. CL molekülünün SAPK yolağındaki anahtar proteinlerden olan p38 ve jnk proteinlerin fosforilasyonlarının ve toplam seviyelerinin doza bağlı olarak değişimi 3 saatlik inhibitör inkübasyonla belirlenmiştir. CL'nin 0-1000 nM dozlarda bu yollarda protein fosforilasyonlarına ve protein seviyelerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: CL'nin p-p38 a), p38 b), p-JNK c), JNK d) ve aktin e) proteinlerinde doza bağlı meydana getirdiği değişim.

4.3. CL'nin PI3K/AKT Yolağı Üzerine Aktivitesinin Ölçülmesi

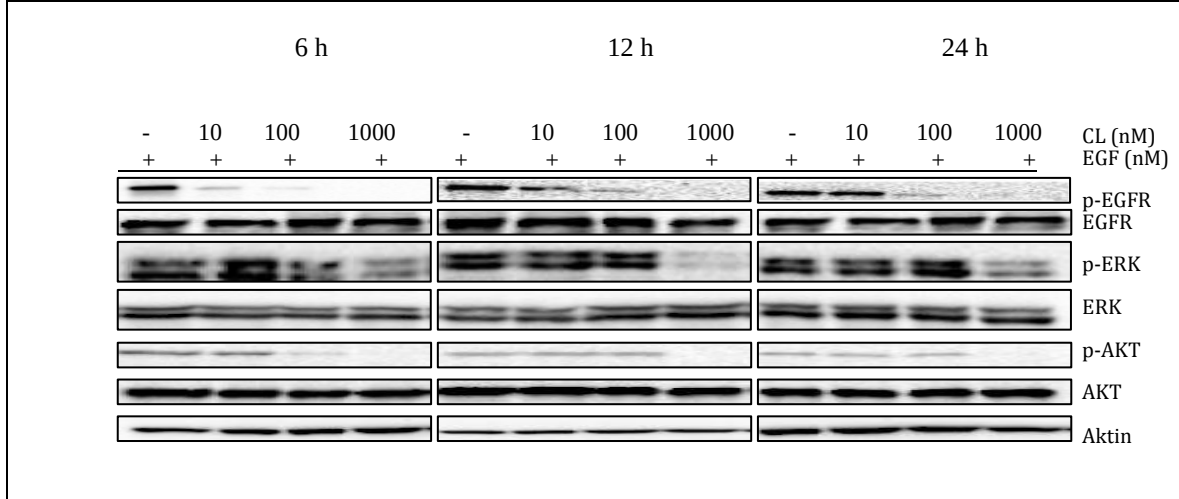
CL uygulaması sonucu AKT sinyal yolağında bulunan p-AKT proteinindeki değişimi incelemek amacıyla 0-1 μ M CL uygulanarak 3 saatlik sürede AKT fosforilasyon ve total protein miktarı incelenmiştir. 100 nM üzerindeki dozlarda CL uygulaması AKT fosforilasyonunu etkilerken toplam AKT seviyesinde değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: CL'nin p-AKT a), AKT b) ve aktin c) proteinlerinde doza bağlı meydana getirdiği değişim.

4.4. CL'nin Zamana Bağlı Etkisinin İncelenmesi

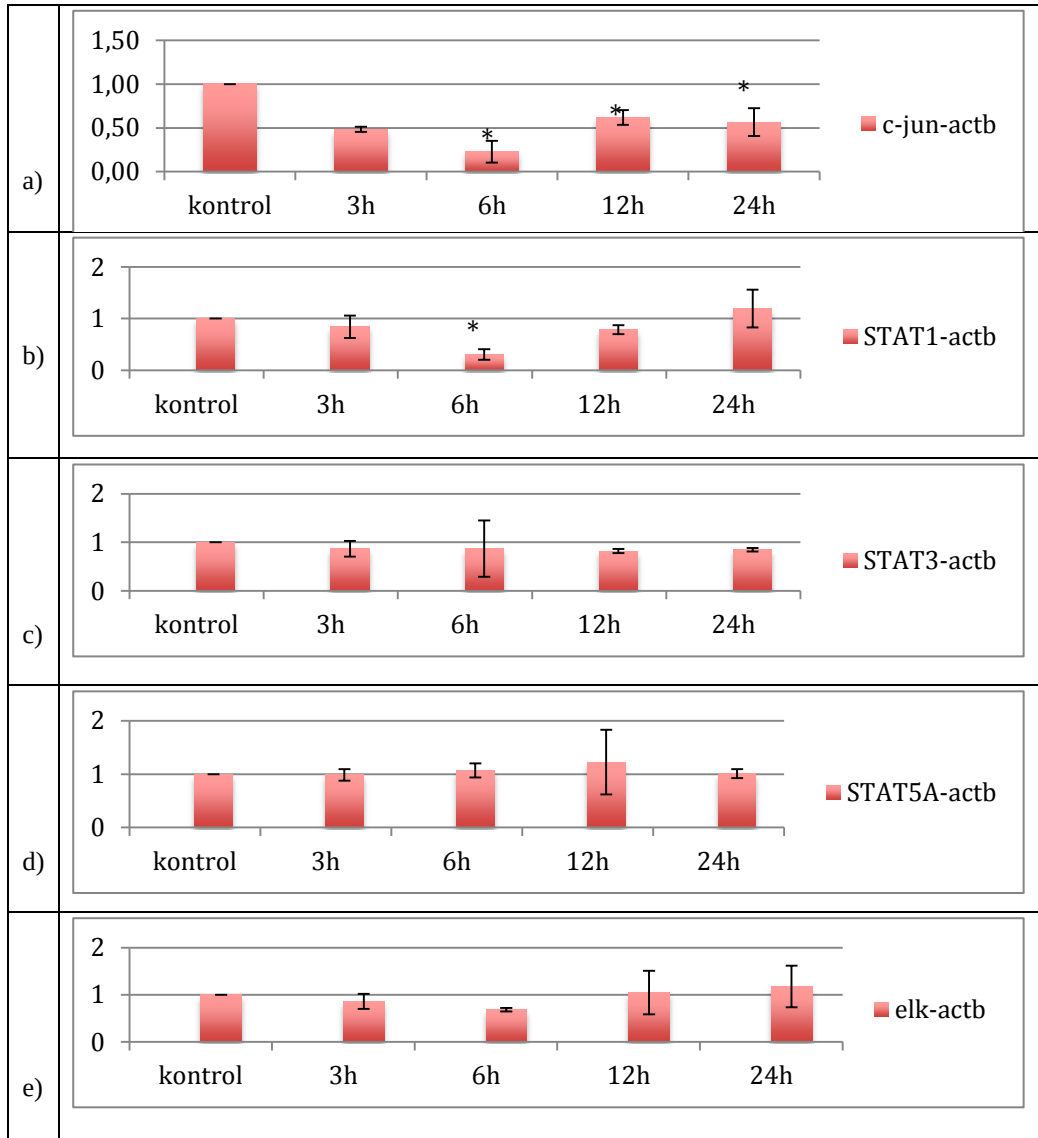
SPC212 hücrelerinde CL'nin zaman bağımlı etkisinin incelenmesinde hücrelere 10,100 ve 1000 nM konsantrasyonlarında CL eklenerek 6, 12 ve 24 saatlerde protein düzeyleri SDS-PAGE ve Western Blot yöntemleriyle belirlenmiştir. Şekil 4.5'de görüldüğü üzere ERK fosforilasyonlarının inhibisyonu 1 μ M' ın altındaki dozlarda 24 saat içinde kaybolurken 1 μ M dozda hala engellenmektedir. Benzer durum AKT fosforilasyonlarında da gözlemlenmektedir.



Şekil 4.5: 10, 100, 1000 nM CL zamana bağlı olarak p-EGFR, EGFR ,p-ERK, ERK, p-AKT, AKT ve aktin proteinlerinde meydana getirdiği değişim. (Aktin kontrol olarak kullanılmıştır.)

4.5. CL'nin Etkisinin mRNA Düzeyinde İncelenmesi

SPC212 hücrelerinde CL'nin gen ekspresyonları üzerinde zamana bağlı olarak etkisinin incelenmesinde p-ERK ve p-AKT seviyelerinde düşüşün başladığı 100 nM konsantrasyonu seçilerek uygulanmış ve etkisi 3, 6, 12 ve 24. saatlerde incelenmiştir. Bu amaçla, önce RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve real time PCR yapılarak, c-jun, STAT1, STAT3A, STAT5A ve elk1 genleri incelenmiştir. Referans gen olarak aktin (actb) ve hprt kullanılmış hesaplamalar aktin dikkate alınarak yapılmıştır. $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile göreceli miktar değişimi hesaplanmıştır (Şekil 4.6). $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile farklı deneylerden elde edile Ct değerleri referans gene (actb) göre normalize edilip kıyaslanmış, ilgili gendeki ekspresyon farklılığı $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ hesaplaması sonucu bulunmuştur [Web 5].



Şekil 4.6: CL'nin zamana bağlı olarak sırası ile c-jun a), STAT1 b), STAT3 c), STAT5A d) ve elk1 e) transkripsiyon faktörlerinin mRNA seviyelerine olan etkisi.

Şekil 4.6'da, sonuçlar 2-3 bağımsız deneyin çiftli tekrarları olarak yapılmış ve ortalamaları alınmıştır. p değeri SPSS programında One way ANOVA ve Benforoni testleri ile hesaplanmıştır. p değeri *P<0,005 olarak hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda CL'nin etkisi ilk kez mezotelyoma hücrelerinde incelenmiştir. İlk olarak, kontrol ve malign mezotelyoma hücre canlılığı üzerine CL' nin (0-30 μ M) etkisi incelenmiştir. SPC212 hücrelerinde 48. saatte 10 μ M üzerindeki dozlarda hücrelerin proliferasyonunu inhibe ederken, Met5A hücrelerinde aynı dozda 72. saatte etkin olmaktadır. CL uygulamasında hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmaya başlamıştır (Şekil 4.1). Sonuçlarımız doğrultusunda CL'nin kanser hücreleri üzerinde konsantrasyon ve zamana bağımlı olarak daha etkin olduğunu söylemek mümkündür.

Ras/Raf/MEK/ERK1/2,PI3K/Akt ve JAK/STAT sinyal yolları EGFR molekülü ile aktive olan yollardandır. CL'nin protein düzeyindeki etkisi bu yollar üzerinde incelenmiştir. MAPK yolağının ERK üzerinden aktif olan kısmında en çok çalışılan kinazlar ERK1 ve ERK2'dir [Ramos-Nino et al., 2004]. Şekil 4.2'de CL'nin EGFR ile ERK üzerindeki etkisi görülmektedir. Artan CL konsantrasyonlarında EGFR fosforilasyonu 5 nM ve üzerinde, ERK fosforilasyonu ise 100 nM üzerinde baskılanmıştır. EGFR fosforilasyonu beklenen şekilde EGFR molekülünün ATP bağlama bölgesi ile etkileşerek aktive olmasını dolayısıyla fosforilasyonunu engellemiştir. EGFR protein seviyeleri incelendiğinde aynı dozda (5 nM) ve üzerinde indüklemeye olduğu ve bu durumun hücrenin inhibitöre verdiği tepki olabileceği düşünülmektedir. p-ERK seviyesindeki azalma 100 nM CL uygulandığında başlamakta ve CL konsantrasyonunun artması ile doğru orantılı olarak fosforilasyon düşüş göstermektedir (Şekil 4.2.c).

Stresle aktif olan diğer MAPK moleküllerinden JNK ve p38 'in [Ip YT et al., 1998] fosforilasyonlarında bir değişiklik görülmemektedir (Şekil 4.3.a ve c). Bu sonuçlar EGFR'in CL tarafından inhibe edilmesinin SAPK ve p38 MAPK yolağı üzerinden bir etki oluşturmadığına işaret etmektedir.

EGFR ile ERK fosforilasyonun her ikisinin de inhibisyonu EGFR ve ona bağımlı olarak alt yolağındaki ERK'in inaktivasyonunu gösterir. EGFR fosforilasyonu daha düşük dozda etkilenirken ERK fosforilasyon inhibisyonu daha yüksek dozda başlamaktadır. Bu durum EGFR'in bu hücrelerde MAPK dışında diğer yolları da kullandığını düşündürülebilir.

EGFR alt yolağında bulunan, büyüme ve hücre sağ kalımında önemli etkileri olan yolaklardan biri de AKT yolağıdır. Bu yolağın aktivasyonu sonucu çeşitli kanser türlerinde büyüme, metastaz, apoptozu engelleme gibi kanseri tetikleyici özelliklerin arttığı gözlemlenmiştir [Song et al., 2013], [Long et al., 2013], [Kunter et al., 2013].

Fare ve hayvan mezotelyoma modellerinde PI3K/AKT yolağında ciddi bir aktivasyon artışı görülmektedir (Fennell et al, 2011). EGFR'in protein kinaz B/AKT yolağını aktiveleştirip hücre sağ kalımını (survival) artırdığı bir çok çalışmada incelenmiştir [Datta et al., 1999], [Toru et al., 2004], [Yamada et al., 2013]. Yaptığımız çalışmada CL 'nin bu yolak üzerindeki etkisi AKT proteinin fosforilasyonuna bakarak tespit edilmiştir. p-AKT seviyesinin 100 nM CL dozundan itibaren azalmaya başladığı görülmüştür (Şekil 4.4). Bu sonuç bize inhibitörün bu yolak üzerinden etkili olan hücre proliferasyonu ve sağ kalımını yanı sıra diğer hücresel faaliyetleri önleyici etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. AKT yolağının inaktivasyonu hayatta kalmayı engellediği için kanser hücre büyümesinin durdurulmasında önem teşkil etmektedir. PKB/AKT yolağının büyümeyi tetikleyip, hücre sağ kalımını artırdığı ve sonuç olarak kanser gelişimine katkıda bulunduğu [Nicholson and Anderson, 2002] düşünüldüğünde bu sinyalleri baskılamamanın kanser gelişimini yavaşlatma adına çözüm sunması kaçınılmazdır.

CL'nin hücre içindeki etkisini zamana bağlı incelemek için 10,100 ve 1000 nM CL hücrelere uygulandıktan sonra, ERK ve PKB/AKT yolağı üzerindeki değişim 6,12 ve 24. saatler de analiz edilmiştir. Şekil 4.5 'de görüldüğü üzere 1000 nM (1 μ M)'ın altındaki dozlarda CL'nin gerek EGFR gerekse ERK ve AKT fosforilasyonuna etkisi 24 saat içinde azalmaktadır.

Birçok kanser, Ras mutasyonu sonucu artan ERK aktivasyonuna bağlı gelişim göstermektedir [Ishii et al.,2013], [Hollestelle et al., 2007]. Ras/Raf aktivasyonu sonucu fosforile olan ERK yolağının inhibe edilmesi kanserin bu yolağa bağlı gelişimine engel olmaktadır. 1000 nM ve üstünde 24. saatte devam etmekte olan p-ERK inhibisyonu, CL ajanının kanser hücrelerinin büyümesine baskılayıcı etkisini uzun süre devam ettirdiğini göstermektedir. Bu inhibisyonlar kanser hücrelerinin gelişimini engelleyerek, hem proliferasyon hem survival (hayatta kalma) için gerekli iki yolağın baskılanması stres yolaklarının aktive olmaması CL'nin tedavide hedef bir ajan adayı olabileceği fikrini destekler. Böylelikle henüz klinik

öncesi çalışmalarda denenmekte olan bu ajanın daha detaylı *in vivo* araştırmalardan sonra MM tedavisi kapsamında kullanılması mümkün olabilecektir.

Hücrelerde AP-1 kompleksini oluşturan komponentlerden biri c-jun'dur. JNK, bazal seviyede c-jun ekspresyonu ve fosforilasyonu için gerekli olmakla beraber. yapılan çalışmalardan bazıları p38 MAPK, ERK1/2 ve ERK5' in de UV ya da EGF indüklenmiş c-jun ekspresyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. Melonoma hücreleri ile yapılan bir çalışma ERK'in konstitütif aktif oluşunun c-jun ekspresyonu ve stabilitesini artırdığını göstermektedir [Bergami et al., 2007]. Fibroblast hücreleri ile yapılan bir diğer çalışma ise, EGF ile indüklenen hücrelerde 30 dakika içerisinde c-jun mRNA miktarında 5.5 kata kadar artma olduğunu göstermiştir [Kayahara M. et al, 2005]. Şekil 4.6.a'da görüldüğü üzere 100 nM'lık CL uygulamasına bağlı olarak c-jun mRNA seviyesinde 6. saatte kadar ciddi bir baskılanma görülmektedir. 24 saat içinde anlamlı değerde baskılandığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar Kayahara M. et al, 2005 tarafından yapılan çalışmalara paralel olarak EGF tarafından indüklenen ERK1/2' nin c-jun ekspresyonu için gerekli olduğu fikrini desteklemektedir.

ELK-1 geninin regülasyonundaki bozukluklar prostat, göğüs ve T- hücreli kanserleri gibi birçok kanser türü ile ilişkilendirilmişlerdir. Mitojen sonucu aktive olan c-fos gibi çok erken genler AP-1'e bağlı genlerin aktivasyonunda önemli rol almaktadır [Araud T. et al., 2007]. U138 glioblastoma hücrelerinde EGF stimülasyonuna cevap olarak aktive olan ELK-1'in, büyüme ve hayatta kalma ile ilgili sinyalleri artırdığı gözlenmiş, MAPK/ERK1/2 ve PI3K/Akt yollarının Elk-1 üzerinden gelen sinyale cevap için regüle edici özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Şekil 4.6.e'de görüldüğü üzere 6. saat içinde CL' nin ELK-1 transkripsiyonunu azalttığı görülmektedir. ELK-1 transkripsiyon faktörünün c-fos genini regüle ettiği ve c-fos geninin proto-onkogen olması, bu baskılamının hücrenin kontrolsüz büyümesini engellemeye yönelik faydası olacağını akla getirmektedir. c-jun ve c-fos hızlı erken genlerden olduklarından dolayı hücrenin stimüle olması ile gerçekleşen c-jun ve c-fos ekspresyonu hızlı, geniş ve geçici olmaktadır [Kayahara M. et al, 2005]. İnhibisyonu 6. saatte maksimuma ulaşip daha sonra artma gösteren c-jun ve c-fos'un üst yolağında bulunan ELK-1 genlerinin ekspresyonlarının 12 ve 24. saatteki artan profillerinin bu geçici etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 4.6.a ve e).

STAT'lar çok çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin sinyalini regüle eden anahtar moleküllerdendir. Teoride çok basit görünen JAK/STAT sinyali, diğer sinyal yolları ile oluşturduğu etkileşimden dolayı kompleks hale gelmektedir. RTK

(reseptör tirozin kinaz) bağımlı JAK/STAT sinyali bilinen en az iki mekanizma ile aktif hale gelmektedir. Bunlardan birinci mekanizma; EGFR ve PDGFR gibi bazı reseptör tirozin kinazların aktif hale geçip, JAK'dan bağımsız olarak STAT'ları tirozin fosforilasyonu sonucu aktive etmeleri şeklinde olur ve bu aktivasyonun Src kinaz aracılığı ile olduğu tahmin edilmektedir. Bir diğer mekanizma ise RTK/Ras sinyali sonucu aktive olan MAPK'ın, STAT'ları C-terminaline yakın serin amino asidinden fosforile etmesi ile gerçekleşir [Rawlings J. et al, 2004]. Protein düzeyinde yapılan çalışmalar EGFR ve STAT'lar arasında ilişki olduğunu göstermekle beraber EGFR yolağının STAT gen regülasyonuna etkisi ile alakalı çok fazla çalışma bulunmamaktadır. CL uygulaması STAT1 gen ifadesinde 6 saat içinde anlamlı şekilde azalırken 24 saat içinde tekrar kontrol seviyesine ulaşmıştır. Buna karşın STAT3 ve STAT5a gen ifadelerinde herhangi bir anlamlı değişim tespit edilememiştir. (Şekil 4.6 b, c ve d). Bu bilgiler literatürde olmayan EGFR ve STAT gen düzenlemesi ilişkisine perspektif sunma açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Aaronson S. A., (1991), "Growth factors and cancer", *Science*, 54 (5035), 1146-1153.
- Araud T., Genolet R., Pascale G., Curran J., (2007), "Alternatively spliced isoforms of the human elk-1 mRNA within the 50 UTR: implications for ELK-1 expression", *Nucleic Acids Research*, 35 (14), 4649-4663.
- Arora A., Scholar E. M., (2005), "Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315 (3), 971-999.
- Bergami P., Huang C., Goydos J., Yip D., Eli M., Meenhard H., Keiran S. M., Alka M., Alexey E., Stuart A., Ze'ev R., (2007), "Rewired ERK-JNK Signaling Pathways in Melanoma", *Cancer Cell*, 11 (5), 447-460.
- Bocchetta M., Miele L., Pass H. I., Carbone M., (2003), "Notch-1 induction, a novel activity of SV40 required for growth of SV40-transformed human mesothelial cells", *Oncogene*, 22 (1), 81-89.
- Bojang P., Ramos K., (2014), "The promise and failures of epigenetic therapies for cancer treatment", *Cancer Treatment Reviews*, 40 (1), 153-169
- Bromberg J., Darnell J., (2000), "The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function", *Oncogene*, 19 (21), 2468 - 2473.
- Cacciotti P., Libener R., Betta P., Martini F., Porta C., Procopio A., Strizzi L., Penengo L., Tognon M., Mutti L., Gaudino G., (2001), "SV40 replication in human mesothelial cells induces HGF/Met receptor activation: a model for viral-related carcinogenesis of human malignant mesothelioma", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (21), 12032-12037.
- Carbone M., Albelda S. M., Broaddus V. C., Flores R. M., Hillerdal G., Jaurand M. C., Jaerheim K. K., Pass H. I., Robinson B., Tsao A., (2007), "Eighth international mesothelioma interest group", *Oncogene*, 26 (1), 6959-6967.
- Carolyn M. D., Marion L. C., M. Brawner F., Jr., Irwin J. H., Zaheed H., Bernard D. J., Douglas K., Michael K. M., Madhu S. M., Albert A. Minnick, Jr., Ramaswamy N., Ru S., Yu-Fen W., Allan W., Lee M. G., (1999), "Irreversible inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase with in vivo activity by N-[4-[(3-bromophenyl) amino]-6-quinazolinyl]-2-butynamide (CL-387,785)", *Biochemical Pharmacology*, 57 (8), 917-925.
- Chunyan M., Shuzhen W., Yong S., (2011), "T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports", *Journal of Thoracic Disease*, 3 (1), 10-18.
- Craighead J. E., (1987), "Current pathogenetic concepts of diffuse malignant mesothelioma", *Human Pathology*, 18 (6), 544-557.

Datta S. R., Brunet A., Greenberg M. E., (1999), "Cellular survival: a play in three Akts", *Genes and Development*, 13 (1), 2905-2927.

Demirag F., Unsal E., Yilmaz A., Caglar A., (2005), "Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis, and mitotic activity index in malignant pleural mesothelioma", *Chest*, 128 (5), 3382-3387.

Earp H. S., Calvo B. F., Sartor C. I., (2003), "The EGF receptor family—multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4", *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 114 (1), 315-333.

Ebaugh D., Spinelli B., Schmitz K., (2011), "Shoulder impairments and their association with symptomatic rotator cuff disease in breast cancer survivors", *Medical Hypotheses*, 77, (4), 481-487

Erwin F. W., Ángel R. N., (2009), "Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development", *Nature Reviews of Cancer*, 9 (8), 537-549.

Federica B., Roberto W., Roberto E. F., Alessandra P., Monica G., Alessandra R., Angelo F., Adriana B., Tullio F., (2011), "Receptor tyrosine kinase inhibitors and cytotoxic drugs affect pleural mesothelioma cell proliferation: insight into EGFR and ERK1/2 as antitumor targets", *Biochemical Pharmacology*, 82 (10), 1467-1477.

Foddìs R., De Rienzo A., Broccoli D., Bocchetta M., Stekala E., Rizzo P., Tosolini A., Jhanwar S. C., Pass H. I., Testa J. R., Carbone M., (2002), "SV40 infection induces telomerase activity in human mesothelial cells", *Oncogene*, 21 (9), 1434-1442.

Fry D. W., (2003), "Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors", *Experimental Cell Research*, 284 (1), 131-139.

Fuchs S. Y., Dolan L. R., Davis R. J., Ronai Z., (1996), "JNK targets the ubiquitination of c-Jun in a phosphorylation-dependent manner", *Oncogene*, 13 (61), 1531–1535.

Geoffrey M. C., Robert E. H., (2007), "The Cell: A Molecular Approach", 4th Edition, ASM Press and Sinauer Associates.

Ghosh G., Yan X., Lee A. G., Kron S. J., Palecek S. P., (2010), "Quantifying the sensitivities of EGF receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in drug resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) cells using hydrogel-based peptide array", *Biosensors and Bioelectron*, 26 (1), 424-431.

Giaccone G., Zucali P. A., (2008), "Src as a potential therapeutic target in non-small-cell lung cancer", *Annals of Oncol*, 19 (7), 1219-1223.

- Gille H., Sharrocks A. D., Shaw P. E., (1992), "Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter", *Nature*, 358 (6385), 414-417.
- Harari P. M., (2004), "Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology", *Endocrine-Related Cancer*, 1 (4), 689-708.
- Herbst R. S., (2002), "Targeted therapy in non-small-cell lung cancer", *Oncology*, 16 (9), 19-24.
- Hollestelle A., Elstrodt F., Nagel J. H., Kallemeijn W. W., Schutte M., (2007), "Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines", *Molecular Cancer Research*, 5 (2), 195-201.
- Horvath C. M., (2000), "STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals", *Trends in Biochemical Sciences*, 25 (10), 496-502
- Huan-Chih C., Teng-Yuan C., Chin-Ting H., Yu-Sheng C., John T. A. H., (2012), "EGFR and myosin II inhibitors cooperate to suppress EGFR-T790M-mutant NSCLC cells", *Molecular Oncology*, 6 (3), 299-310.
- Ip Y. T., Davis R. J., (1998), "Signal transduction by the c-jun N-terminal kinase (JNK): from inflammation to development", *Current Opinion Cell Biology*, 10 (2), 205-219.
- Ishii N., Harada N., Joseph E. W., Ohara K., Miura T., Sakamoto H., Matsuda Y., Tomii Y., Tachibana-Kondo Y., Iikura H., Aoki T., Shimma N., Arisawa M., Sowa Y., Poulikakos P. I., Rosen N., Aoki Y., Sakai T., (2013), "Enhanced inhibition of ERK signaling by a novel allosteric MEK inhibitor, CH5126766, that suppresses feedback reactivation of RAF activity", *Cancer Research*, 73 (13), 4050-4060.
- Jakobsen J. N., Sorensen J. B., (2011), "Review on clinical trials of targeted treatments in malignant mesothelioma", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 68 (1), 1-15.
- Karin M., Liu Z. G., Zandi E., (1997), "AP-1 regulation and function", *Current Opinion in Cell Biology*, 9 (2), 240-246.
- Kayahara M., Wang X., Tournier C., (2005), "Selective Regulation of c-jun Gene Expression by Mitogen-Activated Protein Kinases via the 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Responsive Element and Myocyte Enhancer Factor 2 Binding Sites", *American Society for Microbiology*, 25 (9), 3784-3792
- Kindler H. L., (2008), "Systemic treatments for mesothelioma: standard and novel", *Current Treatment Options in Oncology*, 9 (2-3), 171-179.
- Kobayashi S., Boggon T. J., Dayaram T., Jänne P. A., Kocher O., Meyerson M., Johnson B. E., Eck M. J., Tenen D. G., Halmos B., (2005), "EGFR Mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib", *The New England Journal of Medicine*, 352 (8), 786-792.

Kunter I., Erdal E., Nart D., Yilmaz F., Karademir S., Sagol O., Atabey N., (2014), "Active form of AKT controls cell proliferation and response to apoptosis in hepatocellular carcinoma.", *Oncology Reports*, 31 (2), 573-580.

Langerak A. W., Van der Linden-van Beurden C. A., Versnel M. A., (1996), "Regulation of differential expression of platelet-derived growth factor alpha- and beta-receptor mRNA in normal and malignant human mesothelial cell lines", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1305 (1-2), 63-70.

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

Marais R., Wynne J., Treisman R., (1993), "The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain", *Cell*, 73 (2), 381-393.

Mayer I. A., (2009), "Treatment of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Following Initial Progression", *Clinical Breast Cancer*, 9 (2), 50-57.

Mazzone M., Comoglio P. M., (2006), "The Met pathway: master switch and drug target in cancer progression", *Faseb Journal*, 20 (10), 1611-1621.

Mendelsohn J., (2001), "The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy", *Endocrine-Related Cancer*, 8 (1), 3-9.

Mendelsohn J., Baselga J., (2003), "Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer", *Journal of Clinical Oncology*, 21 (14), 2787-2799.

Mercedes R., Richard A. F., Roger J. D., (2001), "Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes", *Oncogene*, 20 (19), 2490-2497.

Metheny-Barlow L. J., Flynn B., Van Gijssel H. E., Marrogi A., Gerwin B. I., (2001), "Paradoxical effects of platelet-derived growth factor-A overexpression in malignant mesothelioma. Antiproliferative effects in vitro and tumorigenic stimulation in vivo", *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24 (6), 694-702.

Meytal L., Nir Ben-T., (2008), "Dynamic equilibrium between multiple active and inactive conformations explains regulation and oncogenic mutations in ErbB receptors", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1785 (1), 12-31.

Musti A. M., Treier M., Bohmann D., (1997), "Reduced ubiquitindependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases", *Science*, 275 (5298), 400-402.

Nicholson R. I., Gee J. M., Harper M. E., (2001), "EGFR and cancer prognosis", *European Journal of Cancer*, 37 (4), 9-15.

Nicholson K. M., Anderson N. G., (2002), "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy", *Cell Signalling*, 14 (5), 381-395.

Nurwidya F., Takahashi F., Murakami A., Kobayashi I., Kato M., Shukuya T., Tajima K., Shimada N., Takahashi K., (2013), "Acquired resistance of non-small cell lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors", *Respiratory Investigation*, In Press

Nutt J. E., O'Tool K., Gonzalez D., Lunec J., (2009), "Growth inhibition by tyrosine kinase inhibitors in mesothelioma cell lines", *European Journal of Cancer*, 45 (9), 1684-1691.

Ono M., Hirata A., Kometani T., Miyagawa M., Ueda S., Kinoshita H., Fujii T., Kuwano M., (2004), "Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation", *Molecular Cancer Therapy*, 3 (4), 465-472.

Pao W., Miller V. A., (2005), "Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions", *Journal of Clinical Oncology*, 23 (11), 2556-2568.

Pasello G., Favaretto A., (2009), "Molecular Targets in Malignant Pleural Mesothelioma Treatment", *Current Drug Targets*, 10 (12), 1235-1244.

Pasi A. J., (2009), "Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M", 462 (7276), 1070-1074.

Ramos-Nino M. E., Timblin C. R., Mossman B. T., (2002), "Mesothelial cell transformation requires increased AP-1 binding activity and ERK-dependent Fra-1 expression", *Cancer Research*, 62 (21), 6065-6069.

Remon J., Morán T., Majem M., Reguart N., Dalmau E., Márquez-Medina D., Lianes P., (2014), "Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: A new era begins", *Cancer Treatment Reviews*, 40 (1), 93-101.

Salomon D. S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N., (1995), "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 19 (3), 183-232.

Sasaki H., Endo K., Yukiue H., Kobayashi Y., Yano M., Fujii Y., (2007), "Mutation of epidermal growth factor receptor gene in adenosquamous carcinoma of the lung", *Lung Cancer*, 55 (1), 129-130.

Scapoli L., Ramos-Nino M. E., Martinelli M., Mossman B. T., (2004), "Src-dependent ERK5 and Src/EGFR-dependent ERK1/2 activation is required for cell proliferation by asbestos", *Oncogene*, 23 (3), 805-813.

Schmid B., Oehler M., (2014), “New perspectives in ovarian cancer treatment”, *Maturitas*, 77 (2), 128-136

Song T., Wang L., Mo Z., Mao L., Ma X., Niu R., Gu K., Yan R., Ma P., Qi Y., Jiao Q., (2014), “Expression of p-Akt in ovarian serous carcinoma and its association with proliferation and apoptosis”, *Oncology Letters*, 7(1), 59-64.

Susumu K., Titus J. B., Tajhal D., Pasi J., Olivier K., Matthew M., Bruce E. J., Michael J. E., Daniel G. T., Balázs H., (2005), “EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib”, *New England Journal of Medicine*, 352 (8), 786-792.

Takayuki K., Yasushi Y., Hideki E., Kimihide Y., Toyoaki H., Masahiro T., Hirohito T., Hiroyuki K., Tetsuya M., (2005), “Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib”, *Journal of Clinical Cancer Research*, 12 (19), 5764-5769.

Toru M., Shinzoh K., Kuniomi M., Setsuko Y., Tatsuo K., Naruo Y., Hiroshi K., Kazuto H., Kiyotoshi I., Hideki W., Shoji F., Junichi Y., (2004), “Activated Akt expression has significant correlation with EGFR and TGF- α expressions in stage I NSCLC”, *Anticancer Research*, 24 (1), 11-18.

Valerio I., Laura M., Ilaria T., Calogero F., Andrea M., Roberto B., (2012), “Immunity and malignant mesothelioma: From mesothelial cell damage to tumor development and immune response-based therapies”, *Cancer Letters*, 322 (1), 18-34.

Web 1, (2013), <http://www.bioscience.org/2005/v10/af/1755/fulltext.php?bframe=figures.htm>, (Eriřim Tarihi: 24/01/2013).

Web 2, (2013), http://www.nature.com/onc/journal/v26/n22/fig_tab/1210417f1.html#figure-title, (Eriřim Tarihi: 24/01/2013).

Web 3, (2013), <http://www.bioscience.org/2005/v10/af/1735/figures.htm>, (Eriřim Tarihi: 24/01/2013).

Web 4, (2013), <http://www.discoverymedicine.com/Megan-Jo-Miller/2013/03/28/cancer-immunotherapy-present-status-future-perspective-and-a-new-paradigm-of-peptide-immunotherapeutics>, (Eriřim Tarihi: 24/01/2013).

Web 5, (2013), <http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/faq/?ID=97de7874-5571-4916-936f-f481a98f25dd>, (Eriřim Tarihi: 24/01/2013).

Weinstein I. B., (2002), “Cancer addiction to oncogenes the achilles heal of cancer”, *Science*, 297 (5578), 63-64.

Wells A., (1999), “EGF receptor”, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31 (6), 637–643.

Wenjun Z., Dalia E., Liang C., Cai-Hong Y., Danan L., Marzia C., Alexis B. C., Lucian C., Roxana E. I., Robert P., John R. E., Kwok-Kin W., Michael J. E., Nathanael S. G., Woodburn J. R., (1999), "The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy", *Pharmacology and Therapeutics*, 82 (2-3), 241-250.

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

Xin-Hua L., Guo-Mei Z., Ai-Fen P., Qing-Feng L., Lin Z., Hui- Cai W., Rong-Ping Z., Song G., Yang Z., Zhi-Li L., (2013), "Lapatinib alters the malignant phenotype of osteosarcoma cells via downregulation of the activity of the HER2-PI3K/AKT-FASN axis in vitro", *Oncology Reports*, 31 (1), 328-334.

Xu A., Wu L. J., Santella R. M., Hei T. K., (1999), "Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos in mammalian cells", *Cancer Research*, 59 (23), 5922-5926.

Xu A., Zhou H., Yu D. Z., Hei T. K., (2002), "Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species", *Environmental Health Perspective*, 110 (10), 1003-1008.

Yamada T., Takeuchi S., Fujita N., Nakamura A., Wang W., Li Q., Oda M., Mitsudomi T., Yatabe Y., Sekido Y., Yoshida J., Higashiyama M., Noguchi M., Uehara H., Nishioka Y., Sone S., Yano S., (2013), "Akt kinase-interacting protein1, a novel therapeutic target for lung cancer with EGFR-activating and gatekeeper mutations", *Oncogene*, 32 (37), 4427-4435.

Zanella C. L., Timblin C. R., Cummins A., Jung M., Goldberg J., Raabe R., Tritton T. R., Mossman B. T., (1999), "Asbestos-induced phosphorylation of epidermal growth factor receptor is linked to c-fos expression and apoptosis", *American Journal of Physiology*, 277 (4), 684-693.

Zhou W., Ercan D., Chen L., Yun CH., Li D., Capelletti M., Cortot A. B., Chirieac L., Jacob R. E., Padera R., Engen J. R., Wong K. K., Eck M. J., Gray N. S., Jänne P. A., (2009), "Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M", *Nature*, 462 (7276), 1070-1074.

Zucali P., Santoro A., Rodriguez-Lope C., Simonelli M., Camacho L. H., Senzer N. N., Bolondi L., Lamar M., Abbadessa G., Schwartz B. E., (2010), "Final results from ARQ 197-114: A phase Ib safety trial evaluating ARQ 197 in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma (HCC)", *Journal of Clinical Oncology*, 28(1), 15.

ÖZGEÇMİŞ

Fatma Sağır 2010 yılında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (GYTE), Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans eğitimine 2010 yılında başlayıp, 2014 yılında mezun oldu.