



---

**EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ AKTİVASYONUNA NEDEN OLAN  
EGFR vIII, E746-A750 del ve L858R MUTASYONLARININ BİYOLOJİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Onur TOKGÜN**

**Temmuz 2011  
DENİZLİ**



**EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ AKTİVASYONUNA NEDEN OLAN  
EGFR VIII, E746-A750 del ve L858R MUTASYONLARININ BİYOLOJİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Pamukkale Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisan Tezi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**Onur TOKGÜN**

**Danışman: Doç. Dr. Hakan AKÇA**

**TEMMUZ 2011  
DENİZLİ**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Onur TOKGÜN tarafından, Doç. Dr. Hakan AKÇA yönetiminde hazırlanan “EGFR Aktivasyonuna Sebep Olan EGFRIII, E476-A750 Del ve L858R Mutasyonlarının Biyolojik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

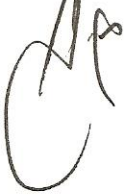
Prof. Dr. Gülseren BAĞCI

Jüri Başkanı



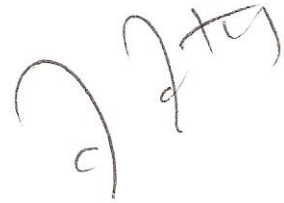
Doç. Dr. Hakan AKÇA

Jüri Üyesi (Danışman)



Yrd. Doç. Dr. Gamze GÖKÖZ DOĞU

Jüri Üyesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 4.18.11 tarih ve 11/11-3 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. A. Çevik TUFAN  
Müdür

## TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince her tűrlű bilgi ve becerilerini benden esirgemedi paylaőan deęerli tez danıőman hocam Doç.Dr. Hakan AKÇA' ya teőekkűr ederim. Yűksek lisans eęitimim boyunca bilimsel alt yapımın geliőmesinde katkıda bulunan baőta bűlűm baőkanımız Prof.Dr. Gűlseren Baęcı olmak űzere tűm bűlűm hocalarıma teőekkűrű de bir borç bilmekteyim. Hayatımın her evresinde yanımda olan maddi ve manevi desteklerini hiçbir űekilde benden esirgemeyen aileme sonsuz minnetlerimi sunarım.

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

İmza

:



Öğrenci Adı Soyadı : Onur TOKGÜN

**ÖZET****EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ AKTİVASYONUNA NEDEN OLAN EGFR vIII, E746-A750 del ve L858R MUTASYONLARININ BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tokgün, Onur  
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji ABD  
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Hakan AKÇA

Temmuz 2011, 67 sayfa

Kanser gelişiminde hücre siklusu kontrolü ve hücre metabolizmasının önemli basamaklarında rol alan genlerde meydana gelebilecek olası genetik değişimler aktif rol oynamaktadırlar. Normal bir hücrenin siklusunun ve metabolizmasının düzenlenmesinde büyüme faktörleri ve reseptörleri önemli derecede rol almaktadırlar. Bu büyüme faktörleri ve reseptörlerini kodlayan genlerde meydana gelebilecek mutasyonlar hücrenin anormal çoğalmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu büyüme faktörleri ve reseptörleri arasında en önemli yeri epidermal büyüme faktörü ve reseptörleri almaktadır. Deri, oral kavite, özofagus ve akciğerin skuamoz hücreli karsinomlarını da içeren çeşitli insan tümör hücre hatlarında EGFR düzeylerinin artmış olduğu literatürde yapılan çalışmalar tarafından gösterilmiştir. Literatürde yapılan bu çalışmalarında gösterdiği gibi EGFR kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle EGFR'ın kanser hücrelerinde davranışını, ekspresyonunu ve hücre üzerinde olan diğer etkilerini tanımlamak amacıyla yapılacak çalışmalar kanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Bizde bu çalışmalardan yola çıkarak çalışmamızda EGFRvIII, E746-A750 del ve L858R EGFR mutasyonlarının biyolojik etkilerini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bize mutant EGFR eksprese eden hücrelerin invazyon, metastaz ve sağ kalım oranı gibi özelliklerinde kontrole oranla farklılıklar olduğunu gösterdi. Mutant EGFR eksprese eden hücrelerin invazyon yapabilme yeteneği kazandığı ve anti-EGFR ilaçlara karşı daha duyarlı hale geldiği yaptığımız çalışmalar sonucunda gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Metastaz, EGFR, İnvazyon

**ABSTRACT****A RESEARCH OF BIOLOGICAL EFFECTS OF EGFR vIII, E746-A750 del and L858R MUTATIONS THAT CAUSED EPIDERMAL GROWTH FACTOR ACTIVATION**

Tokgün, Onur  
M. Sc. Thesis in medical biology  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan AKÇA

July 2011, 67 page

Possible changes on the genes which play essential roles through out the steps of cellular cycles and metabolism also play a significant role in cancer development. In regulation of a normal cellular cycle and metabolism growth factors and receptors have a fundamental role. Mutations on the genes which are encoding growth factors and receptors might result an abnormal cell proliferation. Among these growth factors and receptors epidermal growth factors and receptors occupy the most important place. Through out the literature many studies note down that in several tumor cell lines involving carcinomas of skin, oral cavity, esophagus and squamous cells in the lungs EGFR levels were significantly increased. As these studies appoint, EGFR has a cardinal role in cancer development. Therefore studying EGFR's behaviour and expression in cancer cells and elucidating other effects on cells have a vital part in developing new treatments for cancer. By following previous studies, we have aimed to reveal the biological effects of EGFRvIII, E746-A750 del and L858R EGFR mutations. The results of our study have yielded differences in invasion, metastasis and survival ratios between mutant EGFR expressing and control cell groups, such as mutant EGFR expressing cells gaining invasion ability and developing sensitivity against anti-EGFR drugs.

**Key Words:** Metastasis, EGFR, Invasion



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

İçindekiler .....	v
Şekiller Dizini .....	vii
Tablolar Dizini.....	viii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini .....	ix
1. GİRİŞ ve Amaç.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI.....	4
2.1. Kanser Tanımı.....	4
2.1.1. Çok Aşamalı Kanser Gelişim Süreci.....	4
2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	6
2.2. Kanser ve Genetik.....	7
2.3. Kanser Gelişiminde Rol Oynayan Genler ve Fonksiyonları.....	8
2.3.1. Tümör Baskılayıcı Genler.....	9
2.3.2. Onkogenler.....	10
2.3.2.1.1 Onkogenlerin Aktivasyon Mekanizmaları.....	11
2.4. Akciğer Kanserleri.....	12
2.4.1. Histolojik Sınıflandırma.....	12
2.4.2. Etyoloji.....	13
2.4.3. Evreleme.....	14
2.5. İnvazyon ve Metastaz.....	17
2.6. Hücre Yüzey Reseptörleri ve Büyüme Faktörleri.....	20
2.6.1. Epidermal Büyüme Faktörü ve Reseptör Ailesi.....	22
2.6.1.1. Epidermal Büyüme Faktörü ve Kanser.....	28
2.6.1.2. Epidermal Büyüme Faktör Reseptörleri Sinyal Yolakları.....	30
2.6.1.3. PI3K/Akt Sinyal İletim Yolağı.....	31
2.6.1.4. JAK/STAT Sinyal İletim Yolağı.....	33
2.6.1.5. Ras/Raf/Map kinaz Sinyal İletim Yolağı.....	35
3. MATERYAL ve METOD.....	38
3.1. Hücreler ve Hücre Kültürü.....	38
3.2. Transformasyon.....	38
3.3. Plazmid İzolasyonu .....	39
3.4. Agaroz Jel Hazırlanması.....	40
3.5. Plazmidlerin HEK 293 Hücrelerine Transfekte Edilmesi .....	40
3.6. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Saptanması.....	41
3.7. SDS-PAGE ve Western Blot.....	42
3.8. Proliferasyonun Saptanması .....	44
3.9. İnvazyonun Saptanması .....	44
3.10. Verilerin Değerlendirilmesi.....	45
4. BULGULAR.....	47
4.1. Plazmit izolasyonu sonucu elde edilen plazmitlerin agaroz jelde görüntülenmesi.....	47
4.2. Bradford Yöntemiyle Protein Konsantrasyonunun Saptanması.....	48
4.3. Transfekte Hücrelerde EGFR İfadesinin Gösterilmesi .....	49
4.4. EGFR İfadesinin Proliferasyona Etkisi.....	51
4.5. EGFR İfadesinin İnvazyon Üzerine Etkisi .....	53

5. TARTIŞMA .....	55
6. SONUÇ .....	60
7. KAYNAKÇA .....	61
8. ÖZGEÇMİŞ.....	67

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1 Çok aşamalı kanser gelişim süreci .....	5
Şekil 2.2 Akciğer kanser histolojik alt tiplerinin Hemotoksilen-Eozin boyama görüntüleri.....	13
Şekil 2.3 İnvazyon ve Metastaz Aşamaları.....	18
Şekil 2.4. Çeşitli kanser türlerinin metastaz özellikleri.....	19
Şekil 2.5. Epidermal büyüme faktör reseptör ailesi sinyal iletimleri.....	23
Şekil 2.6. EGFR ekzonları ve spesifik bölgeleri.....	24
Şekil 2.7. ErbB ailesi üyelerinin farklı dimerleşmelerini indükleyen büyüme faktörleri ve bu farklı dimer oluşumlarının aktifleştirdiği yolları.....	25
Şekil 2.8. ErbB familyası üyeleri arasında dimer yapısı oluşumu.....	26
Şekil 2.9. EGFR temel yapısı ve yapısındaki farklı bölgeleri.....	27
Şekil 2.10. EGFR geninde görülen mutasyonlar ve bölgeleri.....	30
Şekil.2.11. Epidermal büyüme faktörü reseptörü sinyal yolları.....	31
Şekil.2.12. JAK/STAT sinyal iletim yolağının sitokinlerce uyarımı.....	35
Şekil.3.1. Çalışmada kullanılan hücre dizisi HEK 293 'ün genel görüntüsü.....	38
Şekil 3.2. 96 kuyucuklu plaklarda hücre kültürü.....	44
Şekil 3.3. Cytotox Glo kitinin Canlı hücreler İçindeki ATP molekülünü saptaması...44	44
Şekil 3.4. BD Biocoat Matrigel İnvasyon Chamber Genel Görünümü.....	45
Şekil 4.1. Plazmid izolasyonundan sonra elde edilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü.....	48
Şekil 4.2. HEK 293 hücrelerine transfekte edilen ekspresyon vektörleri.....	49
Şekil 4.3. pzip EGFRVIII, pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin EGFR ve GAPDH ekspresyonları.....	50
Şekil 4.4. pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin 0 ve 72. saatler arasındaki kontrole oranla % proliferasyon oranları.....	52
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Gensitabinin pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.6. Yeniden yaratılan EGFR ekspresyonunun hücre invazyona etkisi.....	54

**TABLULAR DİZİNİ****Sayfa**

Tablo 2.1. Bazı tümör baskılayıcı genler ve rol aldığı kanser türleri.....	10
Tablo 2.2. Akciğer kanserlerinin DSÖ'nün sınıflandırılması.....	15
Tablo 2.3. Çeşitli büyüme faktörlerinin kaynakları ve görevleri.....	21
Tablo 2.4. ErbB ligand ve substratları.....	26
Tablo 2.5. Farklı tümör tiplerinde görülen EGFR ekspresyon yüzdeleri.....	28
Tablo 2.6. JAK/STAT' lar ile etkileşim içinde olan sitokinler.....	34
Tablo 4.1. İzole edilen plazmit DNA'larının spektrofotometrik ölçüm sonuçları.....	47
Tablo 4.2. Bradford Analizi Sonucu Saptanan Protein Miktarları ve R Değeri.....	49
Tablo 4.3. pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin 0 ve 72. saatler arasındaki kontrole oranla % proliferasyon oranları.....	51
Tablo 4.4. Yeniden yaratılan EGFR ekspresyonunun hücre invazyona etkisi.....	54

**SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>APC:</b>	Adenomatöz Poliposis Koli
<b>EGF:</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>EGFR:</b>	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
<b>IGFR:</b>	İnsülin Büyüme Faktör Reseptörü
<b>JAK:</b>	Janus kinaz
<b>KHDAK:</b>	Küçük hücre dışı akciğer kanseri
<b>NSCLC:</b>	Küçük Hücreli olmayan Akciğer Kanseri
<b>MAPK:</b>	Mitojen aktive edici kinaz
<b>mTOR:</b>	Mammalian Tor-riCTOR kompleksi
<b>NF-KB:</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>PDK:</b>	Fosfoinositol Bağımlı Kinaz
<b>PI3K:</b>	Fosfoinositol 3 Kinaz
<b>PI2P:</b>	Fosfoinositol (4,5) iki fosfat
<b>PI3P:</b>	Fosfoinositol (3,4,5) üç fosfat
<b>PTEN:</b>	10 kromozomdan fosfat ve tensin delesyonlu
<b>RTK:</b>	Reseptör Tirozin Kinaz
<b>SCC:</b>	Skuamoz hücreli akciğer karsinomu
<b>SDS-PAGE:</b>	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez
<b>SOS:</b>	Son of sevenless
<b>STAT:</b>	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
<b>WHO:</b>	Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, hücrelerin yaşam sikluslarını düzenleyen mekanizmalarda meydana gelen olası değişimler sonucunda hücrenin kontrolsüz ve aşırı çoğalmasıyla ilerleyen, çağımızın en önemli sağlık sorunlarından birisidir.

Kanser gelişiminde hücre siklusu kontrolü ve hücre metabolizmasının önemli basamaklarında rol alan genlerde meydana gelebilecek olası genetik değişimler aktif rol oynamaktadırlar. Bu genetik değişimler sonucunda ilgili genin amplifikasyonu ya da baskılanması sonucu karsinogenez süreci başlayabilmektedir. Örneğin, *EGFR* geninde meydana gelebilecek bir delesyon mutasyonunun sonucu olarak *EGFR* tirozin kinaz aktivasyonunun artışı sonucu olarak da hücrenin aşırı derecede çoğalması görülebilmektedir.

Hücre içi faktörlerin yanında kanser gelişiminde rol oynayan çevresel etmenlerde mevcuttur. Bunlara örnek olarak akciğer kanseri gelişiminde sigaranın, deri kanseri gelişiminde UV ışığın, beyin tümörü gelişiminde pestisitlerin rol oynadıkları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Günümüzde insanın hemen her organına özgü kanser türü saptanmıştır. Ancak bu kanser türleri coğrafik bölgelere, insan ırklarına ve yaşam koşullarına göre farklı oranlarda gözlenmektedir. Genetik faktörlerin yanında önceden de belirtildiği gibi çevresel etmenlerde kanser gelişiminde rol oynamaktadır ve bu çevresel etmenler insanların yaşadıkları çevre koşullarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin hava kirliliğinin çok olduğu bölgelerde yaşayan insanlarda akciğer kanseri riski daha yüksektir.

Akciğer kanseri, Sağlık Bakanlığına bildiri zorunlu bir hastalık olmasına rağmen hala ülkemizde gerçek kanser insidansı bilinmemektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün 2007 yılına ait kanser raporunda, dünya çapında kanser oranının hızla arttığı ve 2030 yılında bu oranın daha da artarak 12 milyon kişinin kanserden dolayı ölebileceği bildirilmiştir (web1).

Hastalık nedenli ölümler arasında kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra 2. sırada yer almaktadır. Tüm dünya ortalamasına bakıldığında akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde akciğer kanserleri sıklıkla erkeklerde görülmektedir. Fakat son yıllarda kadınlarda sigara tiryakiliğinin artması bu oranın hızla değişmesine neden olmuştur ve kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen kanser tipi haline gelmiştir (Kligerman vd 2011).

Akciğer kanseri gelişiminde tütün alışkanlığı, genetik faktörler, yaş, hava kirliliği, cinsiyet ve diyetle ilgili faktörler rol almaktadır. Ancak akciğer kanserinin bilinen en önemli nedeni sigara içimidir. Aktif sigara kullanımı birinci risk faktörüken, pasif sigara içiciliği ikinci risk faktörüdür.

Sigara içiciliğinin yanında ailesel yatkınlıkta önemli bir akciğer kanseri risk faktörüdür. Hiç sigara kullanmamış ve ailesinde akciğer kanseri öyküsü bulunan bir kadında akciğer kanserine yakalanma riski aile öyküsü olmayanlara göre 2,8 kat daha fazla olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Williams ve Cummings 2000).

Normal bir hücrenin siklusunun ve metabolizmasının düzenlenmesinde büyüme faktörleri ve reseptörleri önemli derecede rol almaktadırlar. Bu büyüme faktörleri ve reseptörlerini kodlayan genlerde meydana gelebilecek mutasyonlar hücrenin anormal çoğalmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu büyüme faktörleri ve reseptörleri arasında en önemli yeri epidermal büyüme faktörü ve reseptörleri almaktadır.

Epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) ailesi, sinyal yollarının aktivasyonunu sağlayan ligand bağlanmasının ardından aktive olduklarında hücre proliferasyonunu, diferansiyasyonunu ve programlı hücre ölümünü gerçekleştiren; normal hücre gelişim sürecinde rol almakla birlikte pek çok kanser türünde aktivasyonları veya aşırı ekspresyonları gösterilmiş, tirozin kinaz reseptörleri ailesine üye transmembran bir reseptör ailesidir (Krause vd 2005). Bu reseptör ailesi üyelerinde meydana gelen genetik değişimler pek çok kanser türünde gösterilmiştir.

Küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde (KHDAK) EGFR'nin tirozin kinaz aktivasyonunun artışı yaygın olarak gözlenen bir genetik değişimdir. EGFR'nin aşırı aktivitesine neden olan genetik değişimler arasında görülen EGFR VIII ve E746-A750 delesyon mutasyonları ile L858R nokta mutasyonları sık görülen EGFR mutasyonları olup yapılan çalışmamızda kullanılan mutasyonlardır.

EGFR' in iki delesyon mutasyonu EGFR VIII ve E746-A750 ile nokta mutasyonu L858R EGFR geninde yaygın olarak görülen mutasyonlardır Bu mutasyonları taşıyan pzip EGFRVIII ekspresyon vektörü ile pc DNA 3.1 EGFR E746-A750 ve pc DNA 3.1 EGFR L858R ekspresyon vektörleri çalışmamızda kullanılmıştır.



## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Kanserin Tanımı

Hücre çoğalması, hücre ölümü gibi hücrenin yaşamsal aktivitelerinin düzenli bir şekilde devam etmesi hücrelerin ve dokuların devamlılığını sağlayan en önemli etkidir. Canlı organizmadaki tüm hücreler belirli bir yaşam süresine sahip olup bu sürenin dolmasının ardından ölmeye programlanmışlardır. Canlı sistemlerde hücrelerin ömürlerini tamamlamalarının ardından ölmelerini kontrol eden mekanizmalar mevcuttur. Ancak canlıda gerçekleşebilecek bir moleküler kargaşa sonucunda bu sistemin bozulması ortaya çıkabilmektedir. Bu durumun sonucu olarak hücrelerin kontrolsüz ve aşırı çoğalmasını takiben tümör oluşumu ve devam eden süreçte ise ilerleyen tümörün çevre dokulara zarar vermesi sonucu kanserleşme süreci başlamaktadır. Kısacası kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemden kaçmalarına ve sonuç olarak daha uzak dokulara metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik değişiklikler geçirdikleri çok adımlı bir süreçtir (Merlo vd 2006).

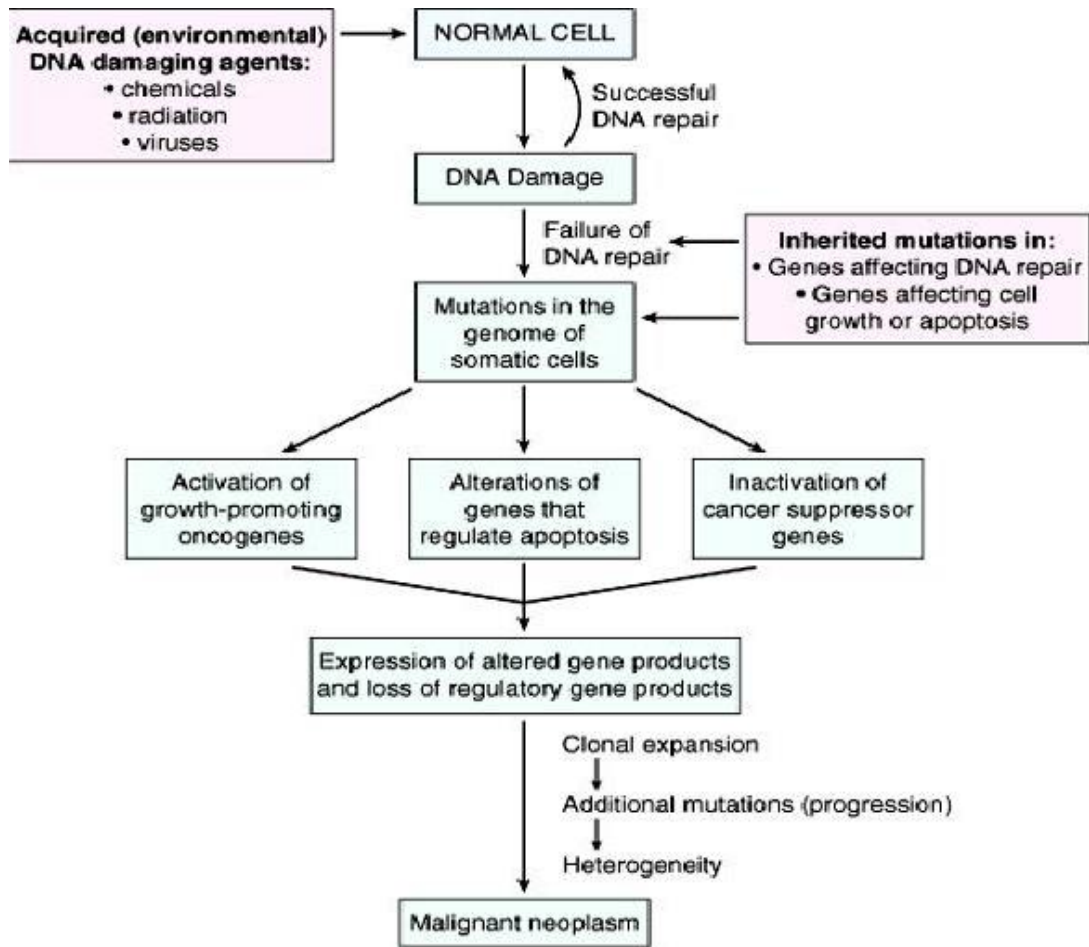
#### 2.1.1 Çok Aşamalı Kanser Gelişim Süreci

Kanserin gelişim süreci “karsinogenez” olarak adlandırılır. Karsinogenez, homeostatik feedback mekanizmalara yanıt veren normal hücrelerin bu mekanizmaların kontrolünden çıkıp, kontrolsüz ve spontan olarak büyüeyebilen ve komşu dokulara invazyon yapabilen hücre şekillerine dönüşmeleridir. Karsinogenez çok aşamalı bir olay olup başlangıcında bir genetik hasar yatmaktadır. Bu genetik hasar kansere yol açan ajanlara ya da karsinojenlere maruz kalınmasıyla ortaya çıkabilir. Kimyasal madde, radyasyon gibi karsinojenlerin veya virüslerin etkisiyle hasara uğrayan tek bir hücre, bir dizi olay zinciri sonrasında tümör gelişimine sebep olur (Williams ve Cummings 2000, Cooper ve Goeffrey 2006, Kumar vd 2000).

Kanser oluşumuna sebep olan genetik değişiklikler, kromozomal düzeyde ya da tek bir nükleotid düzeyinde (tek ya da çoklu nükleotid değişimleri) olabileceği gibi hiçbir baz değişimi gerçekleşmeksizin metilasyon ya da asetilasyon mekanizmaları ile de

oluşabilmektedir (Williams ve Cummings 2000, Cooper ve Goeffrey 2006, Kumar vd 2000).

Proto-onkogen aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu, viral onkogenler, epigenetik değişimler ve immün sistemdeki bozuluklardan kaynaklı olarak ortaya çıkabilecek karsinogenez süreci çeşitli basamaklardan oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Çok aşamalı kanser gelişim süreci (web3)

Kanser gelişim basamaklarından ilki tümör oluşumudur. Tümör oluşumu, bir tek hücrenin aşırı çoğalmasına neden olan genetik değişimlerin sonucudur. Hücrenin aşırı çoğalmasına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu giderek büyür. Tümörün büyümesi ve ilerlemesi çoğalan hücrelerde yeni mutasyonların gelişimiyle ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucu olarakta hücre hızlı çoğalma gibi

yetenekler kazanmaktadır. İlerleyen tümörün ortam şartları değişip, oksijen ve besin miktarı azalabilir ve büyümesi çevresindeki normal doku hücreleri tarafından engellenebilir. Buna rağmen geçirdiği mutasyonlar sayesinde ortama iyi adapte olabilen kanser hücreleri bölünmeye devam eder ve gelişmiş lezyon baskın hale geçer. Böylece tümör artık büyümeye başlar (Cooper ve Goeffrey 2006, Alberts vd 2002).

Tümör, oluşumunu takiben devam etmekte olan mutasyonlar ve diğer genetik değişimler nedeniyle büyüyen tümör invazyon yapma gibi yetenekler kazanır. İlerleyen aşamada bölünen kanser hücreleri immün sistemden kaçabilme ve metastaz yapabilme özellikleri kazanır. Bunun sonucu olarakta kanser daha agresif bir niteliğe sahip olur.

### **2.1.2 Kanser Hücrelerinin Özellikleri**

Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması, hücre çoğalmasını düzenleyen mekanizmaları etkileyen değişikliklerin birikmesinin bir sonucudur. Kanser hücrelerinde, hücrenin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını düzenleyen mekanizmalarda anormallikler görülür. Tüm bunlar bir araya geldiğinde, kanser hücresinin karakteristik özellikleri malignitenin hücresele düzeyde tanımlanmasını sağlar. Kanser hücrelerinin çoğalması, kontakt inhibisyondan etkilenmez. Normal hücrelerin çoğalmasını durduran sinyallere uyması yerine, kanser hücreleri kontrolsüz çoğalma davranışı sergileyerek hücre yoğunluğunun artmasına rağmen çoğalmaya devam ederler ve kontakt inhibisyondan etkilenmezler.

Kanser hücreleri, normal hücrelerimizden farklı olarak daha düşük miktarda büyüme faktörüne ihtiyaç duymaktadırlar. Ancak bazı durumlarda kanser hücreleri çoğalabilmek için gerekli büyüme faktörlerini kendileri de salgılayabilmektedirler. Kanser hücreleri, normal hücrelerden farklı olarak hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayan ve komşu dokunun içerisine yayılmasına olanak veren proteazlar ile anjiyogenezi hızlandıran büyüme faktörleri de salgırlar. Kanser hücrelerinin bir başka genel özelliği ise normal farklılaşma sürecinden geçmek yerine, sürekli aktif biçimde çoğalmaları ile uyumlu olarak, farklılaşmanın erken aşamalarında kalmalarıdır. Kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz görülmediğinden bu hücreler normal hücrelerden çok daha uzun süre yaşarlar. Bu durumun da sonucu olarak tümör gelişimi önemli ölçüde hızlanmaktadır. Bazı

kanser hücreleri programlı hücre ölümünden kaçmalarına ek olarak, telomeraz enziminin ekspresyonu sayesinde, sınırsız replikasyon yeteneğine de sahiptir. Böylece anormal sağ kalım ve çoğalma yeteneği sayesinde kanser hücrelerinin sınırsız çoğalmaları mümkün olur (Cooper ve Goeffrey 2006).

## 2.2 Kanser ve Genetik

Neoplastik hücrelerde genetik aberasyonlar ilk kez 1914 yılında ortaya atılan “neoplazinin tek bir hücre kazanılmış genetik değişimlerle oluştuğu” kavramı çok sayıda deneysel veri ile desteklenmiş olup, kanser formlarıyla hücre bölünmeyi kontrol eden normal genetik mekanizmanın bozulmasıyla karakterize edilmektedir. Kanser hücrelerindeki genetik değişimler hücre genomunun farklı organizasyon düzeylerinde gerçekleşmektedir (Köktürk vd 2003). Hücrenin bölünme, büyüme ve ölümü gibi temel fonksiyonları genler tarafından kontrol edilir. Kanser başlangıcı ve gelişiminde farklı kanser türlerinde farklı genlerin rol oynadığı bilinmektedir. Bu grupta yer alan genler;

- Tümör baskılayıcı ya da onkogen ürünlerini kodlayan genler
- Mitotik siklus düzenleyicilerini kodlayan genler
- Kontakt inhibisyon oluşumunda rol oynayan elemanları kodlayan genler
- Apoptoziste rol oynayan kompotentleri kodlayan genler
- Mutasyonların tanımlanması ve DNA hasarının onarılmasında görev alan kompotentleri kodlayan genler

Farklı kanser türlerinin gelişiminde bu genlerde meydana gelebilecek olası değişimlerin rol oynadığı literatür tarafından da desteklenmektedir. Bu veriler bir kanserin sporadik olaylardan dolayı bireyde gözlenmesine ya da herediter bir özellik göstererek ailede bazı bireylerde tekrar etmesine bakılmaksızın kanser genetik orijini olan bir hastalıktır varsayımını da doğrulamaktadır (Cooper ve Goeffrey 2006, Nussbaum vd 2006).

Kanser ile diğer genetik hastalıklar arasında iki temel farklılık bulunmaktadır. Bunlarda ilki kanserin genellikle somatik hücrelerde meydana gelen olası genetik

değişimlerin sonucu ortaya çıkmasıdır. Buna karşın diğer genetik hastalıklar germ hücrelerini de etkileyen bir genetik değişim sonucu ortaya çıkarak nesilden nesile aktarılabilirler. İkinci temel farklılık ise kanserin tek bir mutasyon sonucu ortaya çıkmamasıdır. Kanser oluşumu için kanserin tipine bağlı olarak birden fazla mutasyonun birikimi gerekmektedir (Lodish vd 2000).

Kanser her ne kadar somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar ile meydana gelse de germ hücrelerinde meydana gelen bazı mutasyonlar kanser gelişme olasılığını arttırabilmektedir. Bu mutasyonlar neoplastik kanser gelişiminin başlangıcını oluştururlar. Germline neoplastik taşıyıcısı bireylerde kansere yatkınlık artar ve kanser daha erken yaşlarda ortaya çıkar (Vert vd 2006).

Kanser gelişimi bir kez başladığında, sitogenetik yapının korunmasından ve DNA' da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücresel mekanizmaları kodlayan DNA tamir genlerindeki mutasyonlarda giderek bir artış göstererek kanser gelişimine katkıda bulunurlar (Pateras vd 2006).

### **2.3 Kanser Gelişiminde Rol oynayan Genler ve Fonksiyonları**

Günümüzde karsinogenez aşamasında rol oynayan 100' ün üzerinde gen tanımlanmıştır. Buna rağmen keşfedilmeyi bekleyen pek çok genin olduğu da ön görülmektedir.

Hücrenin bölünme, büyüme ve ölümü gibi fonksiyonlarını denetleyen genlerde meydana gelen değişimler kanser gelişimine neden olmaktadır. Kanser gelişiminde rol oynayan genler; tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve DNA tamirinde rol oynayan genler olarak tanımlanmışlardır (Vert vd 2006).

Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalma isteği ve invaze olabilme yeteneği kanser gelişiminde rol oynayan genlerde ve onların rol oynadığı mekanizmalarda ortaya çıkan sorunlardan dolayıdır. Bu genler normal bir hücrenin programlanmış hücre ölümünün ve hücre siklusunun kontrolünde rol oynamaktadırlar. Kanser gelişimine neden olan mutasyonlar sıklıkla hücrelerin apoptozis ve hücre siklusunun kontrolünde rol oynayan

genleri etkileyebilmektedir. Karsinojenik mutasyonlar sonucunda hücre anormal çoğalmakta ve biriken mutasyonların ardından invazyon ve metastaz yapabilme yetenekleri kazanmaktadır (Strachan ve Andrew 1999).

### 2.3.1 Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genlerin kontrolsüz hücre proliferasyonunu kontrol etme ve inhibe etme yeteneği vardır. Bu yeteneği ancak ilgili genin iki alelinde de değişim olması durumunda kaybolur. Bu durumu ifade eden hipotez, “Knudson hipotezi” olarak adlandırılmıştır. Günümüzde bu görüş tek bir tümör baskılayıcı genin iki kopyasının da fonksiyon kaybına neden olan hem herediter hem sporadik kanserler için kabul edilen bir model oluşturur.

Retinoblastoma yatkınlık, dominant bir karakter olarak taşındığı halde, yatkınlık geninin varlığı retinoblastom gelişmesi için yeterli değildir. Duyarlılık geni hastanın tüm retina hücrelerinde bulunduğu halde, bunların sadece bir kısmında ortaya çıkıyor olması Knudson hipotezini doğrular niteliktedir. Bu duruma göre retinoblastom gelişmesi için *Rb* tümör baskılayıcı geninin iki sağlam kopyasının da ortadan kaybolması gerekmektedir. İki alelden birinin varlığı bile retinoblastom gelişimini engellemektedir. Bu şekilde *Rb* geninin tümör baskılayıcı bir gen olduğu ortaya çıkmıştır. *Rb*’nin tümör baskılayıcı bir gen olarak tanımlanmasından sonra pek çok kanser türüyle ilişkili yeni tümör baskılayıcı genler tanımlanmıştır.

*Rb*’nin ardından tanımlanan tümör baskılayıcı genlerin kodladığı proteinler, hücrenin çoğalmasını ve sağkalımını baskılayabilmektedir. Bu yüzden tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, negatif düzenleyici olarak görev yapan bu proteinleri ortadan kaldırarak tümör gelişimine neden olur. Pek çok kanser türünde bu tümör baskılayıcı genlerin rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Tablo2.1)

**Tablo 2.1** Bazı tümör baskılayıcı genler ve rol aldığı kanser türleri

Gen	Kanser Türü
<i>APC</i> (Adenomatous polyposis coli)	Kolon/rektum karsinomu
<i>BRCA1</i> (Breast cancer 1)	Meme ve over karsinomları
<i>BRCA2</i> (Breast cancer 2)	Meme karsinomu
<i>INK4</i> (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)	Melanom, akciğer karsinomu, beyin tümörleri, lösemiler, lenfomalar
<i>NF1</i> (Neurofibromin 1)	Nörofibrosarkom
<i>NF2</i> (Neurofibromin 2)	Meningiom
<i>p53</i>	Beyin tümörleri, meme, kolon/rektum, özofagus, karaciğer ve akciğer karsinomları, sarkomlar, lösemi ve lenfomalar
<i>PTC</i> (Patched gene)	Bazal hücreli karsinom
<i>PTEN</i> (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)	Beyin tümörleri, melanom, prostat, endometrium, böbrek ve akciğer karsinomları
<i>Rb</i> (Retinoblastoma)	Retinoblastom, sarkom, mesane, meme ve akciğer karsinomları
<i>Smad2</i> (Sma- and Mad- related gene 2)	Kolon/rektum karsinomu
<i>Smad4</i> (Sma- and Mad- related gene 4)	Kolon/rektum karsinomu, pankreas karsinomu
<i>T<math>\beta</math>R II</i> (TGF- $\beta$ type II receptor)	Kolon/rektum karsinomu, mide karsinomu
<i>VHL</i> (von Hippel–Lindau)	Renal hücreli karsinom
<i>WT1</i> (Wilm tumor 1)	Wilms tümörü

### 2.3.2 Onkogenler

Onkogenlerin kökeni hakkında ilk ipucu, yüksek derecede onkojenik virüslerin izolasyonu sonucu elde edilmiştir. Retroviral onkogenlerin oluşmasına öncülük eden genlere protoonkogen adı verilmiştir. Bunlar hücrede önemli rol oynayan, genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerdir. Onkogenler ise protoonkogenlerin anormal ya da mutant eksprese olan şekilleridir.

Protoonkogenler sinyal iletimini, hücresel farklılaşmayı ve hücre proliferasyonunu kontrol eder. Sinyal iletimi karmaşık ve çok aşamalı bir şekilde hücre membranından başlayıp, sitoplazmaya ve nükleusa kadar gider. Normal hücre farklılaşması ve proliferasyonu için pozitif ve negatif feed back mekanizmalarıyla protoonkogen tiplerinin çeşitliliği önemlidir.

Protoonkogenler, protein ürünleri, temel biyolojik olayları düzenleyen ve evrim boyunca yüksek oranda korunmuş genlerdir. Protoonkogenler sinyal iletiminde 3 temel noktada görev yapar:

1. ATP'nin fosfat grubunun transferi ile proteinlerin serin, treonin ve tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonunu sağlar. Böylece protein konfigürasyonunda değişiklik yaparak proteinin kinaz özelliğini aktive eder ve sinyal iletimini sağlayan proteinler için bir bağlanma bölgesi oluştururlar. Bu durum EGFR (Epidermal büyüme faktör reseptör) ailesi protoonkogenleri için bir örnektir.

2. RAS ailesi protoonkogenleri GDP/GTP döngüsünde aracı olarak rol almaktadırlar

3. Nükleus içine yerleşmiş olan proteinleri kapsar. Bunlar gen ekspresyonu, DNA replikasyonu ve hücre döngüsünün kontrolünde rol almaktadırlar (Peter ve Sian 2005).

### **2.3.2.1 Onkogenlerin Aktivasyon Mekanizmaları**

Protoonkogenlerde meydana gelen olası genetik değişimler onkogenlerin aktivasyonunu etkiler. Bu genetik değişimler hücre için bir büyüme avantajı sağlamaktadır. İnsan neoplazmilerinde yer alan onkogenler üç genetik mekanizma ile aktive olmaktadır. Bunlar; kromozom yeniden düzenlemeleri, delesyonlar ve nokta mutasyonları ve gen amplifikasyonları olarak tanımlanmıştır.

Bu mekanizmalar protoonkogen yapısında farklılıklara neden olabileceği gibi ifadelerinde de bir atışa neden olabilir. Çünkü neoplazi çok aşamalı bir süreçtir. Mekanizmalardaki bir ya da birden fazla değişiklik, kanserle ilgili genlerin sayısındaki değişimlere ve bu şekilde tümör gelişimine neden olmaktadır. Neoplastik fenotipin



tamamen aktarımı metastaz kapasitesiyle ilişkilidir. Genellikle bu tablo protoonkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile birlikte gerçekleşmesiyle oluşur (Kufe vd 2003).

## **2.4 Akciğer Kanseri**

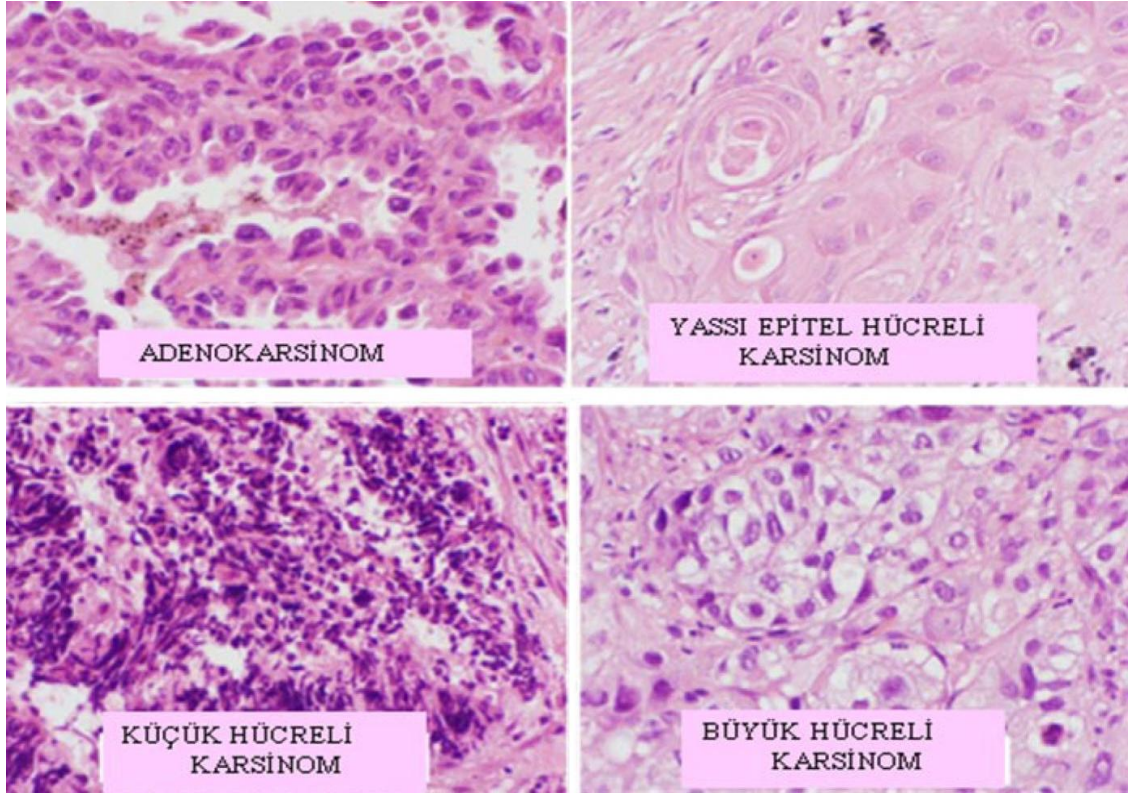
WHO' un 2008 yılına ait kanser raporunda global kanser oranının hızla arttığı ve 2030 yılında, bu oranın daha da artarak 15 milyon kişiyi etkileyebileceği öngörülmektedir. Bu rapora göre 2030 yılında yaklaşık olarak yıllık 26,4 milyon yeni kanser vakası beklenmektedir.

Akciğer kanseri, tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında 2. sırada yer almaktadır. Tüm dünya ortalamasına bakıldığında Akciğer kanseri erkeklerde birinci, kadınlarda da meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Grenle vd 2000).

### **2.4.1 Histolojik Sınıflandırma**

Patolojik olarak akciğer kanserinde 4 ana histolojik grup bilinmektedir: Skuamoz hücreli (epidermoid) karsinom, adenokarsinom, büyük hücreli karsinom ve KHAK (küçük hücreli akciğer kanseri). Hücre tipi hem tedavi hem de prognoz ile yakın ilişkilidir. KHAK diğer tiplerle karşılaştırıldığında belirgin olarak farklı davrandığı için, klinisyenler akciğer kanserini KHAK ve küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki grupta sınıflandırmaktadırlar.

Akciğer karsinomları histopatolojik özellikleri açısından heterojen bir grup oluşturmaktadırlar (Şekil 2.2). Histopatolojik sınıflamanın temeli hücre diferansiyasyonuna dayanmaktadır. Ancak son yıllarda immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve genetik çalışmaların yardımıyla pek çok tümörün çıkış hücresi üzerinde farklı görüşler oluşmuştur. İyi diferansiye tümörler dışında, az diferansiye tümörlerde % 40'a varan tanısal uyumsuzluk görülmektedir (web2).



**Şekil 2.2** Akciğer kanseri histolojik alt tiplerinin Hemotoksilen-Eozin boyama görüntüleri

#### 2.4.2 Etiyoloji

Primer akciğer kanserinde rol oynadığı düşünülen ve büyük oranda kabul edilen faktörler:

- Tütün alışkanlığı
- Genetik faktörler
- Yaş
- Cinsiyet
- Irk ve coğrafik dağılım
- Diyetle bağlı faktörler
- Hava kirliliği başlıkları altında toplanabilmektedir

Bu faktörler arasında tütün alışkanlığı ve özellikle sigara belirgin bir şekilde öne çıkmaktadır. Sigaranın kansere yol açabileceği çeşitli çalışmalarda kesin olarak gösterilmiştir (Kaneko vd 1986, Newcomb vd 1992). Bu çalışmalar, klinik gözlemlerin

ve oluşturulan istatistiksel verilerin ışığında sigara dumanı ve katrandaki, toksik ve karsinojen maddelerin varlığını ortaya koyan, bu maddeler ile akciğer kanseri arasında doğrudan ilişki bulmuş çalışmalardır (Gözü 2001).

Sigara dumanı, partikül ve gaz fazından oluşur. Her iki fazda 4000'den fazla kimyasal ve yaklaşık 40 karsinojen madde saptanmıştır. Sigara dumanındaki en belirgin karsinojenler; nitrozaminler, aseton, akrolein, mekloretamin, benzen, bütan, siyanid, sebest radikaller, hidrazin vb. karsinojenik maddelerdir. Nikotin karsinojen olmamakla beraber bağımlılık yapması ve toksik özellikte olması ile sigaradaki en etkin maddelerden biridir ve akciğer kanseri gelişimini dolaylı olarak desteklemektedir.

Sigara içenlerde akciğer kanseri görülme oranı, hiç içmeyenlerden 10-15 kat daha yüksek bulunmuş olup günde bir paket sigara tüketimi bu oranı 20-25 kata kadar çıkarmaktadır (Atalay vd 1999). Akciğer kanserlerinin histolojik alt grupları içinde sigara içimi ile en güçlü ilişki skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli akciğer karsinomu arasındadır (Morabia vd 1970).

### **2.4.3 Evreleme**

Evreleme; analitik, terapötik ve prognostik amaçlarla bir hastalığın benzer seviyelerdeki hastalarını gruplandırmak için bir kişideki hastalığın yaygınlığının belirlenmesidir. Akciğer kanserinde en önemli prognostik faktör tümörün evresi olup ikinci sırada histopatolojik hücre tipi gelmektedir. Akciğer kanserinin evrelendirilmesinde kullanılan TNM ( T: Primer tümör; N: Bölgesel lenf bezleri; M: Metastaz durumu) evreleme sistemi hastalığın anatomik yaygınlığını gösteren önemli bir rehber olup, elde edilen rölatif derecelendirme primer akciğer malignitesi olan tüm hastalara uygulanabilmektedir.

**Tablo 2.2** Akciğer kanserlerinin DSÖ'nün sınıflandırılması

<b>Akciğer Kanseri</b>	<b>İnsidans</b>
<b>Küçük hücreli akciğer kanserleri</b>	<b>%20</b>
<b>Küçük hücreli olmayan akciğer kanserler</b>	<b>%75</b>
• adeno kanser	%35
• skuamöz hücreli kanserler	%30
• büyük hücreli kanser	%10
<b>Diğerleri</b>	<b>%5</b>
• karsinoid tümörler	
• pulmoner lenfoma	
• mukoepidermoid karsinoma	
• adenoid kistik karsinoma	
• Sarkomlar	

Akciğer kanserleri uluslar arası kabul görmüş tümör, nodül ve metastaz (TNM) sistemine göre sınıflandırılmaktadır. Buna göre;

**PRİMER TÜMÖR (T)** Tx: Primer tümörün belirlenememesi veya balgam ya da bronş lavajında maling hücrelerin tespit edilip görüntüleme teknikleri ya da bronskopi ile tümörün gösterilmemesi

T0: Primer tümör belirtisi yok

Tis: Karsinoma in situ

T1: En geniş çapı < 3 cm, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkopik olarak lop bronşundan daha proksimale (ana bronşa) invazyon göstermeyen tümör. (örneğin: ana bronşda olmayan)

T2: Tümörün aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olması:

- En geniş çapı > 3 cm,

- Ana bronş invaze ancak ana karinaya uzaklık > 2 cm,

- Visseral plevra invazyonu

- Hiler bölgeye ulasan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi yada obstrüktif pnömoni

T3: Tümörün herhangi bir büyüklükte olup göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), diyagrafma, mediastinal plevra, perikard gibi yapılardan herhangi birine direkt invazyon göstermesi; veya karinaya 2 cm den daha yakın ancak karinayı tutmayan ana bronştaki tümör; veya bütün bir akciğeri kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni ile birlikte olan tümör

T4: Tümörün herhangi bir büyüklükte olup mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea özofagus, vertebral kolon, karina gibi yapılardan herhangi birini invaze etmesi; veya malign plevral veya perikardiyal sıvı ile birlikte olan tümör; veya tümörle aynı lob içinde satellit tümör nodule ve nodülleri

### **BÖLGESEL LENF NODU (N)**

Nx: Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi

N0: Bölgesel lenf bezi metastazı yok

N1: Aynı taraf peribronsiyal ve/veya aynı taraf hiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner bezlerin tutulması

N2: Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz.

N3: Karşı taraf mediastinal, hiler, aynı veya karşı taraf supraklavikular veya skalen lenf bezi metastazı

### **UZAK METASTAZ (M)**

Mx: Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

<i><b>EVRE</b></i>	<i><b>TNM ALT GRUBU</b></i>
Occult karsinom	TXN0M0
0 (karsinoma in situ)	TisN0M0
IA	T1N0M0
IB	T2N0M0
IIA	T1N1M0
IIB	T2N1M0
	T3N0M0
IIIA	T3N1M0
	T1N2M0
	T2N2M0
	T3N2M0
IIIB	T4N0M0
	T4N1M0
	T4N2M0
	T1N3M0
	T2N3M0

IV	T3N3M0 T4N3M0 Herhangi T Herhangi N M1
----	--

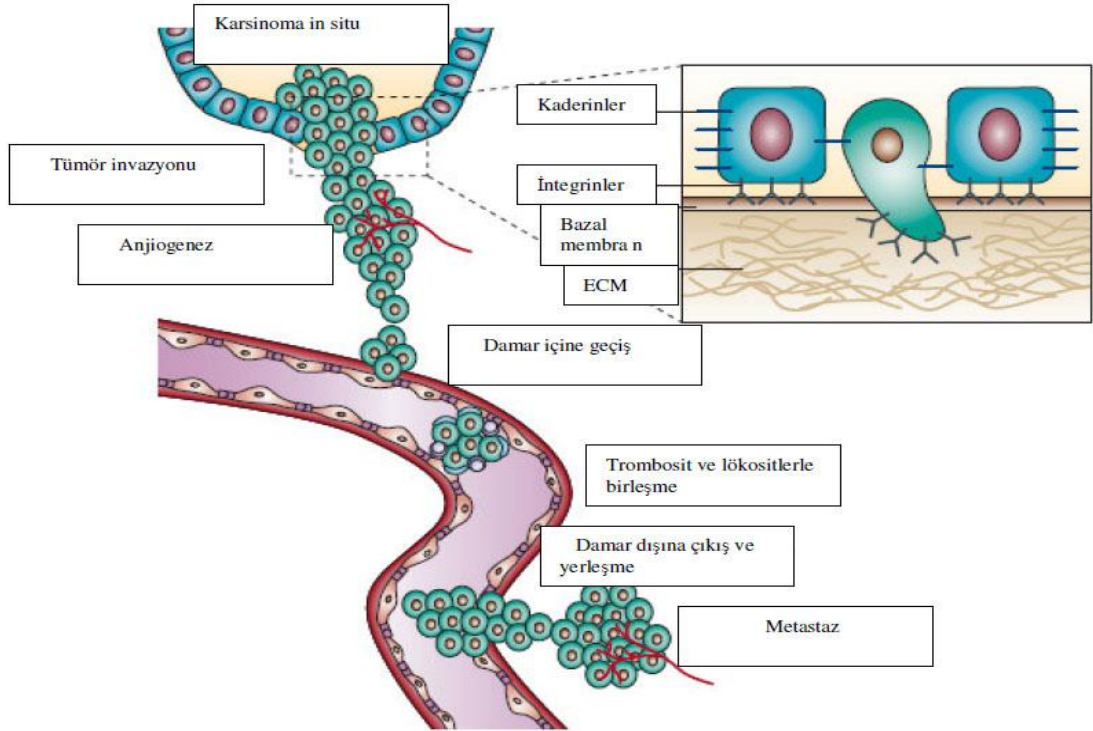
## 2.5 İnvazyon ve Metastaz

İnvazyon, neoplazm gösteren hücre ya da hücre grubunun proliferasyon veya hücre göçü yoluyla bulunduğu bölgeye komşu olan dokuya penetre olarak işgal etmesi olarak tanımlanırken, metastaz; uzak dokularda, tümör ile devamlılığı olmayan sekonder implantların gelişmesi olarak tanımlanır. Genel olarak daha anaplastik ve daha büyük primer neoplazm daha çok metastatik yayılım özelliğindedir, ancak istisnalar bulunmaktadır (Kumar vd 2003).

Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyüme ve yayılımı devam ederken buldukları dokuda diğer dokuları itmeye başlarlar. Bu süreçte mutasyonlar da devam etmektedir. Kanser gelişiminin ilk aşamalarında anormal derecede çoğalan hücrelerin arasındaki bağlantı yapıları da bozulmaktadır. Örneğin, kanser hücrelerinde bir yapılan araştırma da kadherin ailesinden E kadherinin ifadesinin azaldığı ve N kadherinin ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Bogenrieder ve Herlyn 2003). E kadherin ifadesini kaybetmiş olan kanser hücresi, bazal laminaya  $\alpha 5\beta 3$  integrin proteini ile fibronektin aracılığıyla tutunmaktadır (Demuth ve Berens 2003). Bu tutunma hareketi sabit olmayıp, E kadherin ifade kaybı nedeni ile zayıflayan hücre-bazal lamina bağlantısının sonucu olarak hücre hareketliliği kazanmış olan kanser hücresi amoboid hareket yapmaktadır. Bu hareketliliği aktin proteinin yeniden organize olması sonucu oluşan yalancı ayak, fillipoda ve lamellipoda oluşumları ile sağlamaktadır. Sitoplazmada ise miyozin kasılmaları ile hücre hareketini gerçekleştirmektedir (Sahai 2005).

Bu hareketlilikten sonra hücre ekstraselüler matrikse ulaşır. Buradaki bariyeri ise matriks metalloproteaz ve plazmin gibi proteazların yardımıyla aşar (Bogenrieder ve Herlyn 2003). Kanser hücrelerinde matriks metalloproteaz inhibitörünün ifade edilmediği dolayısıyla matriks metalloproteazların aşırı ifadesinin olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (Bogenrieder ve Herlyn 2003). Ayrıca ürokinaz reseptörüne bağlı olarak hücrede plazmin artışı olmaktadır (Bogenrieder ve Herlyn 2003). Bu iki proteaz

ekstraselüler matriksin parçalanmasına dolayısıyla kanser hücrelerinin ekstraselüler matrikste ilerlemesine neden olmaktadır (Şekil 2.3).



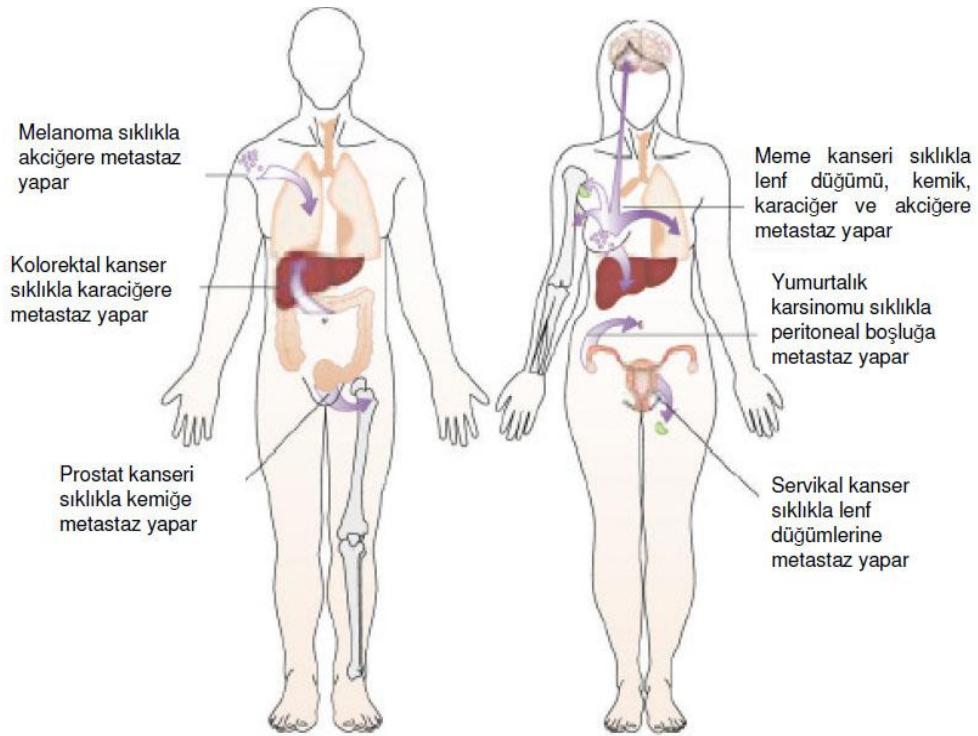
Şekil 2.3 İnvazyon ve Metastaz aşamaları ( Jin ve Varner 2004)

Ekstraselüler matrikste bulunan kanser hücresi damar endoteline ulaştığında tümör ilişkili makrofaj (tumor associated macrophage) ile arasında parakrin bir ilimik oluşur. Tümör ilişkili makrofaj epidermal büyüme faktörü salgılamakta bunu epidermal büyüme faktör reseptörü ile alan tümör hücresi hepatosit büyüme faktörü salgılar ve makrofaj bunu C-met (hepatosit büyüme faktör reseptörü) ile alır (Sahai 2005). Bu da kemokinin 12 ya da SDF-1 olarak bilinen proteininin ifade edilmesine neden olur. SDF-1, invazyon indükleyicisidir (Sahai 2005). Bu parakrin ilimik oluşumu ile hücre endotelden damar içine ekstravaze olur.

Damar içine ekstravazyon yapan tümör hücresi, alt ana toplardamarda ise karaciğere, üst ana toplar damar veya lenf damarlarında ise akciğere metastaz yapar. Damar içinde savunma hücresinden kaçmak için ise trombositler ile kendine bir örtü yapan tümör hücresi emboli oluşturur bu yapı dar yataklı organlardan geçerken kılcal damarlara

takılır ve buradan tekrar invazyon yaparak tutunduğu organa metastaz yapar (Sahai 2005).

Tüm bu süreç tümör hücresinin uğradığı mutasyonlara bağlı olduğu kadar bulunduğu ortamda var olan mikro çevre ile de ilişkilidir (Bogenrieder ve Herlyn 2003). İnvazyon yeteneği kazanmış olan hücreler buldukları doku ya da organa göre farklı bölgelere metastaz yapabilme özelliğindedirler (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4** Çeşitli kanser türlerinin metastaz özellikleri

Akciğer kanserinin multi-organ metastazının mekanizmalarını belirlemek için bazı metastaz modelleri geliştirilmiştir (Nugent ve Iozzo 2000). Akciğer kanseri sıklıkla kemik, akciğer (diğer bölgeleri), beyin ve karaciğer gibi çeşitli organlara metastaz gerçekleştirir. Organ lokalizasyonları göz önüne alındığında beyin metastazı en ciddi problemlerden biridir. Çünkü hastanın yaşam kalitesini sınırlandırmaktadır ve çeşitli antikanser uygulamaları açısından tedavi edilmesi çok güçtür (Seiji vd 2003).



## 2.6 Hücre Yüzey Reseptörleri ve Büyüme Faktörleri

Hücrelerin tümü buldukları ortamdan sinyal alırlar ve bu sinyallere bir yanıt verirler. Hücreler arası sinyal iletimi, bir hücrenin yüzeyinde eksprese edilen veya salınan sinyal iletim moleküllerinin, bir diğer hücrede eksprese olan reseptörlere bağlanması ile gerçekleştirilir. Birçok sinyal iletim molekülünün kendine özgü reseptöre bağlanması ile hücre metabolizmasını, sağ kalımını ve farklılaşmasını içeren, hücresel fonksiyonları düzenleyen bir reaksiyon zinciri başlamaktadır.

Hücreler arasındaki bilgi aktarımını pek çok farklı tipte molekül sağlamaktadır. Reseptörler hücreler tarafından eksprese edildiklerinde yapı ve fonksiyon açısından farklılıklar göstermektedirler. Sinyal iletim moleküllerinin hedef hücrelerdeki etki yolları birbirinden farklıdır. Bazı sinyal iletim molekülleri plazma zarından kolaylıkla geçebilir ve sitoplazmadaki veya nükleustaki hücre içi reseptörlerine bağlanabilir iken bazı reseptörler ise hedef hücre yüzeyinde bulunmaktadır.

Hücre sinyal iletimi, ya bir hücrenin komşusu ile doğrudan etkileşimi ya da salgılanan sinyal iletim molekülleri ile gerçekleşir. Bunlar dışında hücrelerde komşu hücrelerin yüzeyindeki sinyal iletim molekülleriyle etkileşime giren çeşitli hücre yüzey reseptörlerine de sahiptirler

Büyüme faktörleri, afinite gösterdikleri hücre membran reseptörlerine spesifik olarak bağlanan, normal hücre proliferasyonunu uyaran, çok az miktarları dahi hücresel aktiviteleri etkileyebilen polipeptitlerdir. Polipeptit büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonu kontrolündeki kritik rollerinden dolayı büyüme faktörü sinyal iletimindeki anormallikler pek çok kanser tipini de içeren çok sayıda hastalığın nedenidir (Goustin vd 2006).

Büyüme faktörünün kendine özgül reseptörüne bağlanması ardından hücre içinde özgün bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki çoğunlukla tirozin kinaz uyarılarak sağlanır ve her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörleri bulunmaktadır.

Büyüme faktörleri, hüresel fonksiyonları otokrin, endokrin veya parakrin mekanizmalarla sağlarlar.

- Endokrin yolla etkileyen faktörler hedef hücreye kan yoluyla gider ve uzak dokulardaki hücreleri de etkiler.
- Parakrin yol ile etkileşimde bir hücreden salınan bir molekülün komşu hedef hücreleri etkilemektedir.
- Bazı hücreler ise kendi ürettikleri sinyal iletim moleküllerine yanıt verebilmektedirler. Bu şekilde sinyal iletimine otokrin sinyal iletimi adı verilmektedir.

Polipeptit yapısındaki büyüme faktörleri organizmada farklı hücre grupları tarafından salgılanıp birbirlerinden farklı işlevlerde rol almaktadırlar. Örneğin; FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü) fibroblast ve endotel hücrelerinin çoğalmasında, NGF (Sinir Büyüme Faktörü) nöron hücrelerinin çoğalmasında, TGF- $\beta$  (Transforme edici Büyüme Faktörü) trombosit, makrofaj, kemik dokusu hücreleri gibi hücrelerin çoğalmasında önemli rol oynamaktadırlar. Tablo 2.3' te bu büyüme faktörleri dışında diğer büyüme faktörlerinin kaynakları ve görevleri belirtilmiştir.

**Tablo 2.3** Çeşitli büyüme faktörlerinin kaynakları ve görevleri

Büyüme Faktörü	Kaynağı	Görevleri
Trombosit-kaynaklı büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor, PDGF)	Trombositler, makrofajlar endotel hücreleri, düz kas hücreleri	Fibroblast proliferasyonu nötrofil ve makrofaj kemotaksisi ve proliferasyonu, anjiogenez
Transforme edici büyüme faktörü beta (Transforming growth factor $\beta$ , TGF- $\beta$ )	Trombosit, nötrofil, lenfosit, makrofaj, birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu, kemotaksis indirekt anjiogenez, diğer büyüme faktörlerinin etkilerine yardım
Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF)	Trombositler, tükürük, idrar, anne sütü, plazma	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunun uvarılması
Transforme edici büyüme faktörü alfa (Transforming growth factor $\alpha$ , TGF- $\alpha$ )	Aktive makrofajlar, trombosit, keratinosit, bazı dokular	EGF'ye benzer

İnterlökinler (Interleukins 1-2, IL-1,2)	Makrofaj, lenfosit, birçok doku ve hücre	Fibroblast proliferasyonu, kollajenaz, nötrofil kemotaksisi
Tümör nekroz faktörü (Tumor necrosis factor, TNF)	Makrofaj, mast hücresi, T lenfositler	Fibroblast proliferasyonu
Lökosit kaynaklı büyüme faktörü (Leucocyte derived growth factor, LDGF)	Makrofaj, mast hücresi T lenfositleri	Bağ dokusu hücreleri için kemoatraktan ve mitojen
Bağ dokusu büyüme faktörü (Connective tissue growth factor, CTGF)	Endotel hücreler, fibroblastlar	Bağ dokusu hücreleri için kemoatraktan ve mitojen
Fibroblast büyüme faktörleri (Fibroblast growth factors, FGF)	Beyin, pitüiter bez, makrofaj diğer doku ve hücreler	Epitel hücre ve fibroblast proliferasyonu, matriks depolanmasını uyandır, anjiogenez, yara kontraksiyonu
Keratinosit büyüme faktörleri (Keratinocyte growth factors, KGF)	Fibroblastlar	Epitel hücre proliferasyonu
İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (İnsülin-like growth factor-1, IGF-1)	Karaciğer, plazma, fibroblastlar	Sülfat proteoglikanlar ve kollajen sentezini, fibroblast proliferasyonunu uyandır
İnsan büyüme hormonu (Human growth hormone, HGH)	Pitüiter bez, plazma	Anabolizma, IGF-1 'i uyandır
İnterferonlar (İnterferons, IFN)	Lenfositler, fibroblastlar	Fibroblast proliferasyonu ve kollajen sentezinin inhibisyonu

### 2.6.1 Epidermal Büyüme Faktörü ve Reseptör Ailesi

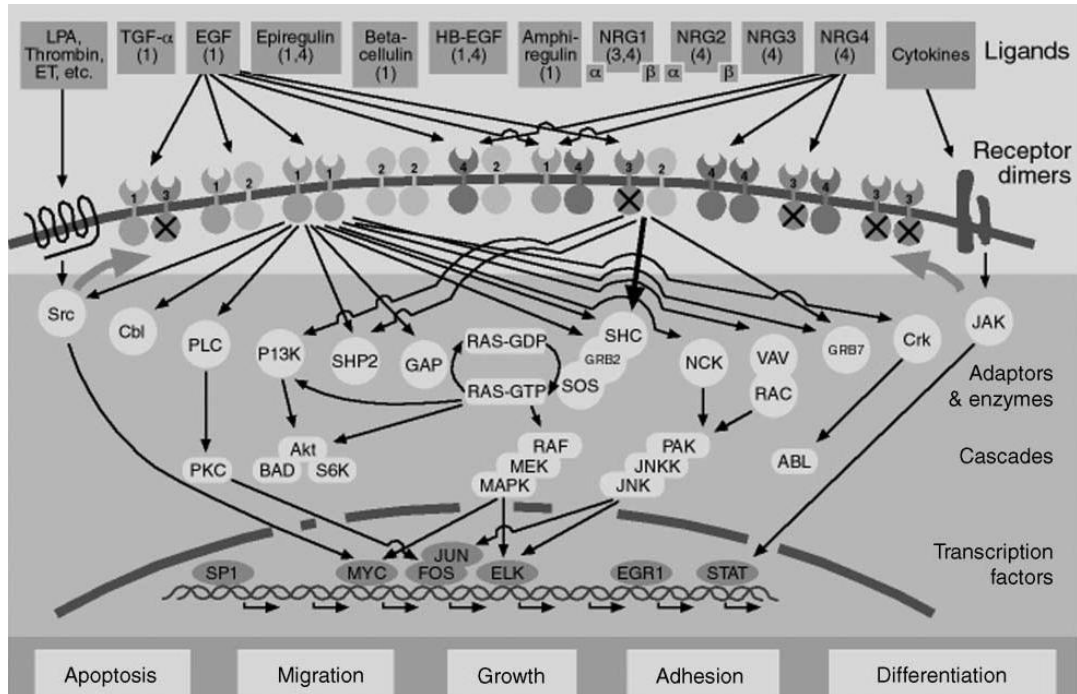
EGF ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibular tükürük bezinden izole edilmiştir. Cohen erkek fare submandibular tükürük bezinde Sinir Büyüme Faktörü (NGF) izole etmeye çalışırken bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken diş sürmesi ve erken göz kapağının açılışına neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve bu maddeyi epidermisin hızlandırıcı etkisinden dolayı Epidermal Growth Factor (EGF) adını vermiştir (Cohen 1962).

EGF aminoasit dizisinde lizin, fenilalanin ve alanin bulundurmayan ve 53 aminoasitten oluşmuş tek zincirli bir polipeptittir. 6000 Da molekül ağırlığına sahip,

birçok dokuda reseptörleri olup, epitelyal ve mezotelyal kökenli hücrelerde mitojenik bir polipeptittir (Das 1982). Molekülün bir ucu NH<sub>2</sub> grubu, diğer ucu ise COOH grubu ile sonlanmaktadır ve üç adet disülfid bağı içermektedir. Bu disülfid bağları EGF' in biyolojik aktivitesi için çok gereklidir.

EGF, farklılaşma ve büyümeyi etkileyerek organizmanın gelişiminde rol oynar. Ayrıca EGF, etkili olduğu hücrelerde iyon alınımı, glikolizis, DNA ve RNA ile protein yapımını artırıcı özellik göstermektedir (Nave vd 1985, Pratt vd 1987)

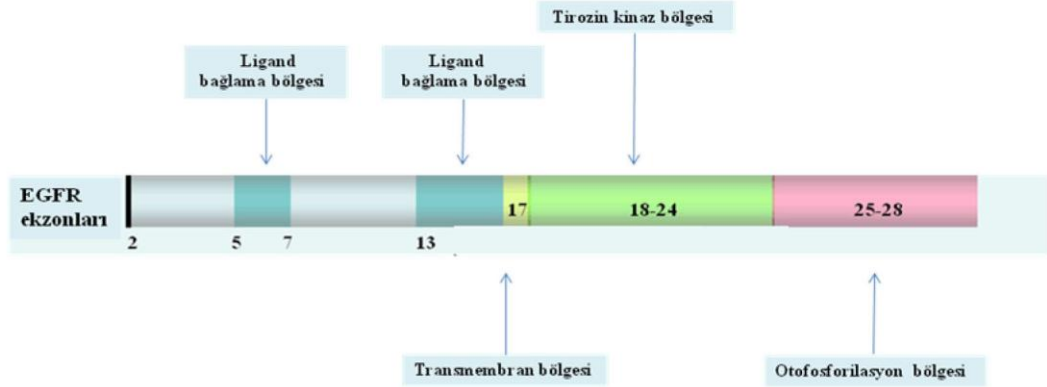
EGF gibi büyüme faktörlerinin pek çok kanser türünün patogenezinde rol oynadığı önceki yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Sporn ve Roberts 1987). Farklı büyüme faktörü molekülleri ve reseptörleri kanser hücrelerinin otonom çoğalmasında rol almaktadır. EGF familyasına ait peptit büyüme faktörleri çeşitli kanser tiplerinin patogenezi ve progresyonunda rol almaktadır. Ayrıca EGF ligand/reseptör sistemi erken embriyonik dönemde deri, böbrek vb. dokuların yenilenmesinde rol oynamaktadır (Salomon vd 1995, Normanno vd 2001).



Şekil 2.5 Epidermal büyüme faktör reseptör ailesi sinyal iletimleri ( Yarden 2001)

EGFR proteini, 7p12 kromozom bölgesinde lokalize olan ve 28 ekson içeren *EGFR* geni tarafından sentezlenen 1186 aminoasitten oluşan 170 kDa büyüklüğünde

transmembran bir glikoproteindir (Şekil 2.6) . Ligandların tanınması ve bağlanmasını sağlayan bir ekstraselüler altbirim, hidrofobik özelliğe sahip membran içinde diğer reseptörlerle ilişkileri sağlayan bir transmembran altbirim ve *EGFR* geninin 18. ve 24. Eksonlarınca kodlanan protein tirozin kinaz aktivitesine sahip bir intraselüler alt birimden oluşmaktadır (Miller 2008).



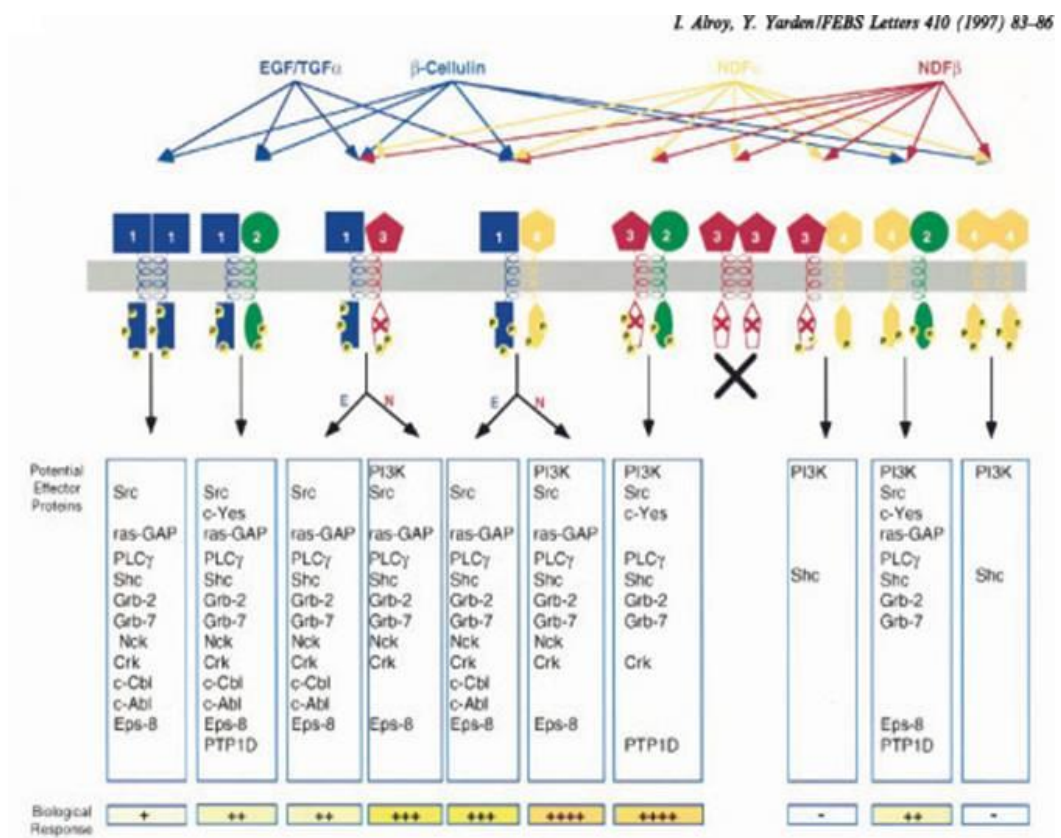
**Şekil 2.6** EGFR ekzonları ve spesifik bölgeleri

Reseptör tirozin kinaz (RTKs) üst ailesinin üyesi olan epidermal büyüme faktör reseptör ailesi dört üyeden oluşur, bunlar; epidermal büyüme faktör reseptörü (ErbB-1/HER-1), ErbB-2/neu/HER-2, ErbB-3/HER-3 ve ErbB-4/HER-4 dür. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, ErbB-1, HER-1) ilk keşfedilen reseptör tirozin kinazdır. EGFR ailesi üyesi özellikle ekstraselüler ve transmembran alt birimlerinde yapısal olarak yüksek oranda homoloji göstermektedirler (Ferguson vd 2003, Yarden 2001, Burgess vd 2003, Capuzzo 2007).

EGFR ailesi, sinyal yollarının aktivasyonunun kontrolünde görev alan, normal gelişim sürecinde rol oynamakla beraber, kanserde aktivasyonlarının veya aşırı homodimerizasyon veya heterodimerizasyon ile bağlanarak, onların aktivasyonunu sağlayan EGF, transforme edici büyüme faktörü (TGF- $\alpha$ ), heparin bağlayıcı EGF (HB-EGF), amfıregulin (AR), betaselulin (BTC), epigulin (EPR) ve epigen gibi farklı ligandları vardır.

ErbB ailesi reseptörlerinin tirozin kinaz bölgesi aile içindeki reseptör bireyleri ile homo ve heterodimerizasyonuna izin verebilecek yapıdadır. Homo ve heterodimer çiftleri oluşunca reseptör karşılıklı olarak birbirlerini fosforilleyerek aktive etmektedir.

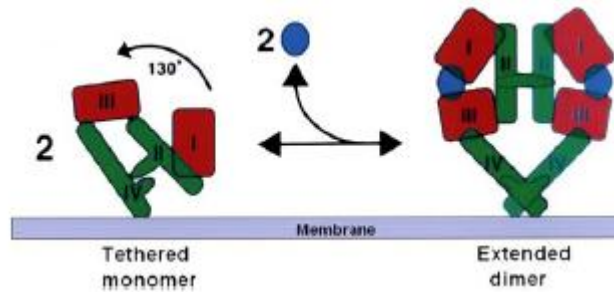
Diğer ErbB ailesi üyelerinden farklı olarak ErbB-2 reseptörüne bağlanabilen bir ligand olmadığından bu reseptör ErbB-2/ErbB-2 homodimeri oluşturamaz sadece diğer ErbB ailesi reseptörleri ile heterodimer yapabilirler. ErbB-3' ün ise tirozin kinaz bölgesi fosforilasyon yapabilme yeteneğinde değildir (death). Dolayısı ile bu reseptör ligand bağlasa bile aktifleşmek için heterodimer yapıya ihtiyaç duyar. ErbB-3/ErbB-3 homodimeri aktif değildir (Ciardiello vd 2004, Gschwind vd 2004, Nakamura vd 2003, Chang vd 1997). Diğer ErbB ailesi dimerleşme olasılıkları şu şekildedir; (ErbB-1/ErbB-2, ErbB-1/ErbB-3, ErbB-1/ErbB-4, ErbB-2/ErbB-3, ErbB-2/ErbB-4, ErbB-3/ErbB-4). Bu dimerler hücre içinde farklı yolları aktive etmektedirler (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7** ErbB ailesi üyelerinin farklı dimerleşmelerini indükleyen büyüme faktörleri ve bu farklı dimer oluşumlarının aktive ettiği yollar (Aloy ve Yarden 1997)

İki EGF molekülü iki reseptörün 1. ve 3. kolu arasında bağlı kalır iken 2. kol 130° dönerek ortada bağ oluşturmaktadır. 4. kol ise dimer yapısının membrana bağlı

kalmasını sağlamaktadır. HER2 reseptörünün 2. kolu bu dönüşümü sağlayamadığı için reseptörüne ligand bağlanamamaktadır (Şekil 2.8).



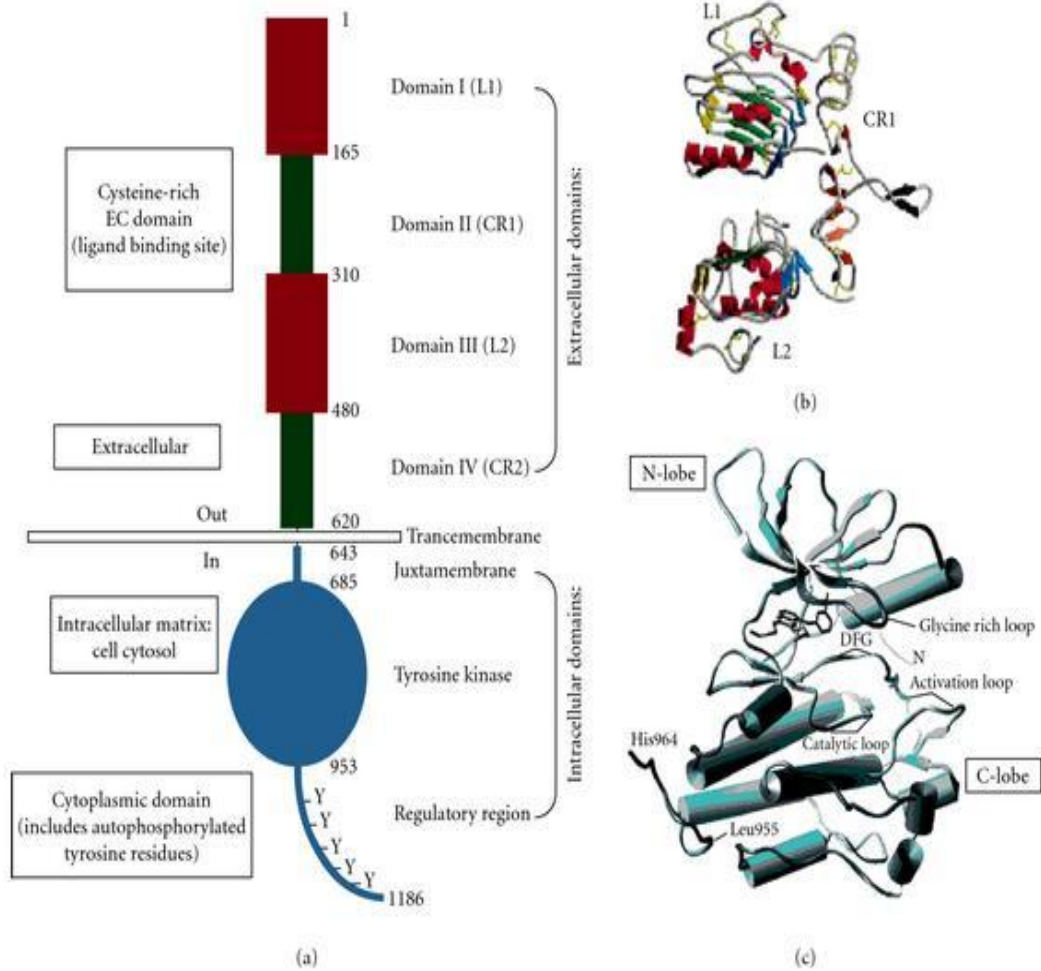
**Şekil 2.8.** ErbB familyası üyeleri arasında dimer yapısı oluşumu

ErbB-3' in tirozin kinaz aktivitesi yoktur dolayısı ile ErbB-3/3 homodimeri aktif reseptör oluşturamaz. ErbB-3, ErbB-2 ya da diğer reseptörler ile heterodimer yaparak onlar tarafından fosforillenip aktifleşir.

**Tablo 2.4.** ErbB ligand ve substratları (Alroy ve Yarden 1997)

	Very high affinity (< 1 nM)	High affinity (1-100 nM)	Moderate affinity (100-1000 nM)	Low affinity (> 1000 nM)	No measurable binding
ErbB4		BTC HRGβ BtR NRG2β	HRGα	NRG3	EGF TGFα HB-EGF EPR NRG2α
ErbB3/4	BTC HRGβ BtR NRG2β	HRGα EGF	NRG3 EPR HB-EGF TGFα NRG2α HRGα		
ErbB3		HRGβ	HRGα	BtR	EGF TGFα HB-EGF EPR NRG2α NRG2β NRG3 BTC EGF TGFα HB-EGF NRG2α BTC HRGα HRGβ NRG2α NRG2β NRG3
ErbB2/3	HRGβ	HRGα BtR	NRG2β EPR		
ErbB1		TGFα EGF BTC HB-EGF BtR		EPR	
ErbB2		TGFα EGF BTC HB-EGF BtR		EPR	HRGα HRGβ NRG2α NRG2β NRG3

EGFR üç önemli fonksiyonel domaine sahiptir. Hücre dışında ligandların bağlandığı bir domain, hidrofobik transmembran bir domain ve hücre içinde yer alan sitoplazmik bir tirozin kinaz domaini içerir. Hücre dışı domain L1, CR1, L2 ve CR2 olmak üzere 4 farklı bölgeden oluşur.



**Şekil 2.9** EGFR temel yapısı ve yapısındaki farklı bölgeleri

L bölgeleri lösinden zengin iken, CR bölgeleri sisteinden zengin yapıdadır. Hücre dışı domain L1 ve L2 bölgeleri arasında ligand bağlanırken, ErbB-2’de bu bölgeler arasında güçlü bir etkileşim bulunduğundan ErbB-2’nin ligand bağlanma yeri kaybolmuştur. Bu nedenle ErbB-2’nin fonksiyonel olabilmesi için ailenin diğer üyeleriyle heterodimer oluşturması gerekmektedir. CR1 ve CR2 domainleri çeşitli küçük moleküllerden meydana gelmiştir. Her biri bir veya iki disülfid bağıyla bir arada



tutulur. Hücre içi domain ise C-terminal düzenleyici bölge ve tirozin kinaz bölgesine sahiptir. Tirozin kinaz bölgesi N ve C olmak üzere iki lobtan oluşur. N-terminal lob ve daha büyük C-terminal lob'da ATP bağlanma bölgeleri yer alır. EGFR'nin C-terminal lobu tirozin aminoasitleri içerir. Reseptör üzerindeki bu alıcı tirozin aminoasitlerine ATP'nin  $\gamma$ -fosfat gruplarından ATP transfer edilir. Bu şekilde EGFR aracılığıyla sinyal iletimi tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonu ile reseptör aktivitesi gerçekleştirilmiş olur ( Martin vd 2006, Nair 2005, Jorrisen 2003)

### 2.6.1.1 Epidermal Büyüme Faktörü ve Kanser

Yapılan klinik çalışmalarda artmış EGFR ekspresyonu ile tümör gelişimi arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bazı vakalarda tek başına EGFR düzeylerinin değişimi bile kanser gelişimini indüklemek için yeterli olabilmektedir. Deri, oral kavite, özofagus ve akciğerin skuamoz hücreli karsinomlarını da içeren çeşitli insan tümör hücre hatlarında artmış EGFR düzeyleri gösterilmiştir (Salomon vd 1995). Yine meme, serviks, mesane, renal, over, akciğer ve çeşitli skuamoz hücreli karsinomlarda da artmış EGFR ekspresyonu saptanmıştır (Normanno vd 2005). Skuamoz hücreli karsinomlarda (SCC) EGFR aşırı ekspresyonuna yol açan ana mekanizma EGFR gen amplifikasyonudur ve belli tümörlerde her hücrede 15 den fazla gen kopyası rapor edilmiştir. EGFR gen amplifikasyonu tüm SCC'lerin %60'ında saptanırken, SCC'lerin %100'ünde üç kattan fazla artmış EGFR saptanmıştır (Herbst ve Shin 2002). Tablo 2.4' te farklı tümör tiplerinde görülen EGFR ekspresyon yüzdeleri gösterilmiştir.

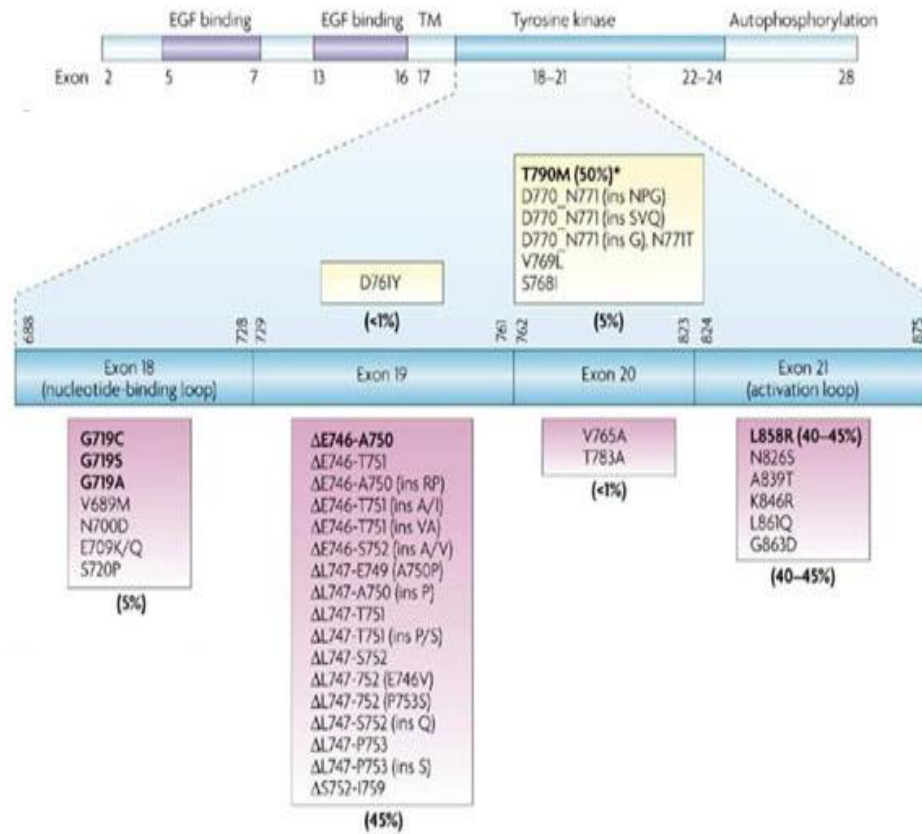
**Tablo 2.5.** Farklı tümör tiplerinde görülen EGFR ekspresyon yüzdeleri

Tümör Tipi	EGFR Ekspresyon yüzdesi
Kolon	25–77
Baş-Boyun tümörleri	80–100
Akciğer	40–80
Meme	14–91
Renal	50–90
Over	35–70
Prostat	39–47
Gliom	40–63
Pankreas	30–50
Mesane	31–48

EGFR ekspresyonda artışa neden olan diğer bir mekanizma ise mutasyonlar aracılığı ile EGFR aktivitesinde meydana gelen tümörojenik değişimler sonucunda ligand bağlanmaksızın reseptörün aktivasyonudur. *In vivo* çalışmalarda ligand olmaksızın kendiliğinden EGFR aktivasyonunun transgenik hayvanlarda tümör oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir. İnsan kanserlerinde çok sayıda EGFR delesyonu gösterilmiş olup, bu mutasyonlar reseptörün ekstraselüler ligand bağlayan bölgesinin yapısını değiştirir. En yaygın delesyon mutasyonu genin yeniden düzenlenmesine veya alternatif mRNA bağlanmasına yol açan EGFRvIII mutasyonudur. Bu hem EGFR ekspresyon düzeyini hem de reseptör fonksiyonunu etkiler ve sonuç olarak reseptörün tirozin kinaz bölgesi ligand bağlanmaksızın aktive olur. Bu özel EGFR mutasyonu gliomaların %50'den fazlasında, over kanserlerinin %75'inde, meme kanserlerinin %27'sinde ve KHDAK'lerinin %15'inde gösterilmiştir (Voldborg 1997).

İmmünohistokimyasal metotla araştırılmış hastalarda küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde EGFR ekspresyonu artmış olup, bu artışın hayatta kalabilme, tekrarlayabilirlik ve verilecek tedavinin belirlenmesine katkı sağlayabilmesi açısından prognostik önemi vurgulanmıştır. Bununla birlikte HER-2 'nin de KHDAK'de %2 ila %40 oranında amplifiye olduğu ve kötü prognozla ilişkilendirildiği yapılan çalışmalarca ortaya konmuştur. Yapılan pek çok çalışmada ekspresyon artışı olan hastaların küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörlerine duyarlı olduğu bildirilmiş olup KHDAK hastalarında bu EGFR inhibitörlerinin tedavide kullanılabilir ajanlar olduğu gösterilmiştir (Ciardiello vd 2004).

EGFR geninin aşırı ekspresyonundan başka KHDAK' de EGFR' nin tirozin kinaz domaininde çeşitli mutasyonlar saptanmış ve karsinogenez sürecinde ortaya çıkan belirli mutasyonlar belirtilmiştir (Şekil 2.10). EGFR geninin 21. ekzonunda, 858. pozisyonunda yer alan lösin-arjinin aminoasit substitasyonu, 19. ekzonundaki karakterize aminoasit 747-750 delesyonları, 20. Ekzonunda yer alan 790. pozisyonunda yer alan treonin-metioninaminoasit substitasyonu ile aynı ekzondaki insersiyon tipi delesyonlar ile çok sık rastlanmamakla beraber 18. Ekzon mutasyonları gen üzerinde saptanmış mutasyonlardır (Pines vd 2010, Kosaka vd 2006, Tokumo vd 2005).



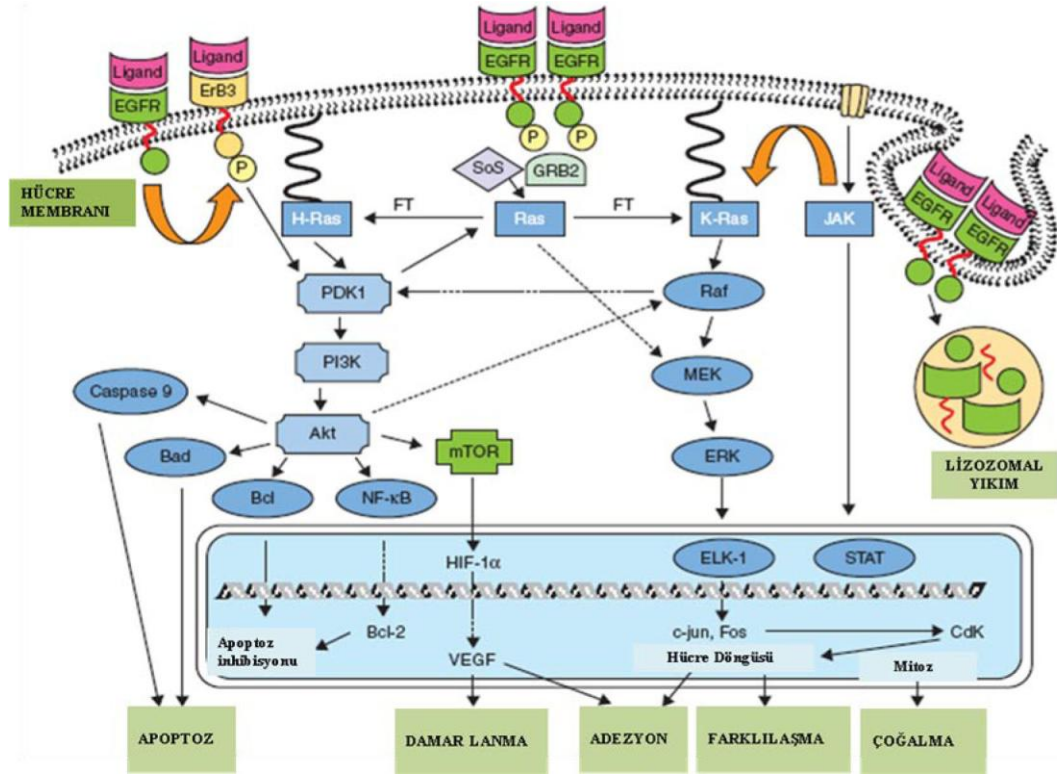
**Şekil 2.10** EGFR geninde görülen mutasyonlar ve bölgeleri (Sharma 2007)

Kanser tedavisinde EGFR monoklonal antikorlar kullanılarak EGFR dimerizasyonunun önüne geçilmek amaçlanmaktadır. Normal bir hücrede yaklaşık on bin EGFR mevcut iken kanser hücrelerinde bu sayı iki milyona kadar çıkabilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlar yardımıyla bu sayı normal düzeylere düşürülmeye çalışılmaktadır. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında EGFR' nin ATP bağlanma bölgesine spesifik olarak bağlanabilen ilaçlar kullanılarak kanser tedavisi amaçlanmaktadır.

### 2.6.1.2 Epidermal Büyüme Faktör Reseptörleri Sinyal Yolakları

EGFR ile aktive olan 3 farklı sinyal yolağı tanımlanmıştır. Bu sinyal yolakları; Ras/Raf/Mitogen activated protein (MAP) kinase, Jak/STAT ve PI3K/Akt sinyal yolaklarıdır (Şekil 2.11). Bu sinyal yolaklarının aktivasyonu hücre proliferasyonu, metastaz, tümör invazyonu, antiapoptotik sinyal iletimi, kemoterapiye direnç,

anjyogenez ve hücre-hücre bağlantılarının kurulması ile ilişkili hücrel aktiviteleleri tetiklemektedir.



Şekil 2.11 Epidermal büyüme faktörü reseptörü sinyal yolları

### 2.6.1.3 PI3K/Akt Sinyal İletim Yolağı

Hücre sinyalizasyonunu, büyümesini, proliferasyonunu ve apoptozunu regüle eden yollar pek çok kanser türünde temel olarak rol almaktadırlar. PI3K/Akt hücre siklusu, protein sentezi, metabolizma, motilite ve anjyogenez gibi önemli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev almaktadır (Castaneda vd 2010).

PI3K' ler bir lipid kinaz ailesidir 3 ayrı tipi tanımlanmıştır. Sınıf I PI3K' ler 2' ye ayrılmaktadır. Sınıf IA PI3K' ler hücre bölünmesi ve tümör gelişimi ile ilişkili görünen tiptir ve bu grupta p110 $\alpha$  ve onun regülatör alt ünitesi olan p85 bulunmaktadır. Sınıf IB PI3K, p101 ve p110 $\gamma$ ' dan oluşmaktadır. Sınıf II PI3K' ler monometrik katalitik izoformlardır. Son olarak tek tanımlanmış sınıf III üyesi Vps 34' tür. Sınıf II ve III

PI3K'lerin tümör gelişiminde rol oynayıp oynamadığı tam olarak bilinmemektedir (Castaneda vd 2010).

PI3K, büyüme faktörünün bağlandığı tirozin kinaz reseptörleri veya diğer tirozin kinazlar tarafından aktive edilir (Jiang ve Liu 2008). Aktif PI3K, Fosfoinositol (4,5) di fosfat'ın (PI2P), inositol halkasını 3' ucundan fosfatlayarak fosfoinositol 3,4,5 tri fosfat oluşturur (PI3P) (Engelman vd 2006). PI3 fosfat, fosfoinositol bağımlı protein kinaz 1 ve 2'yi (PDK1 ve 2) aktive ederek, protein kinaz B/ Akt'yi treonin 308. ve serin 473.'den fosfatlar. Bu sayede hücrenin yaşamsal olaylarını kontrol eden Akt'nin aktive edilmesinde görev amaktadır (Shukla vd 2007). Hücreler, PI3K'nin düzenleyici alt ünitesinde aşırı ifade edilmesi durumunda diğer düzenleyici alt ünite ile dimerizasyon yaparak, katalitik alt ünite ile heterodimer yapı oluşturmasını inhibe eden kontrol mekanizmasına sahiptir (Jing ve Liu 2008). Ancak kanser hücrelerinde PI3K'nin katalitik alt ünitesi aşırı ifade edilmektedir. Bununla birlikte PI3K'nin düzenleyici alt ünitesi ise mutasyona uğrayarak dimerizasyon oluşturamamaktadır (Jing ve Liu 2008). Bunun sonucunda ise sürekli olarak heterodimer yapı oluşmaktadır. Ayrıca PI3K, birçok kanser türünde tirozin kinaz reseptörlerinin mutasyonuna da bağlı olarak hücrede sürekli aktif olarak bulunur (Jing ve Liu 2008).

Akt bir serin/treonin kinazdır ve anahtar hücresel süreçleri etkileyen çok sayıda efektörleri ile PI3K sinyal iletim yolağının ana molekülüdür. Hücre içerisinde farklı lokalizasyonlarda bulunur ve hücresel işleyişlerin düzenlenmesinde farklı rolleri vardır. Akt hücre membranında bulunduğu zaman PDK1 tarafından treonin-308 ve serin-473 pozisyonunda fosforillenir. Fosforillenen Akt sitoplazma ve nükleusa giderek farklı hücresel olaylarda rol alan hedef proteinleri fosforiller ve aktive eder (Castaneda vd 2010)

Akt, aynı zamanda ERK tarafından da module edilen bir kompleks olan mTORC-1' i de aktive eder. mTORC-1 de ribozomal p70S6 (S6K) ve ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 4R (eIF4)' yi düzenleyerek protein sentezi ve hücre büyümesini uyarır. Akt ayrıca hücre siklusu uyarıcı proteinlerini ( c-myc ve siklinD1) arttırarak ve hücre siklusu inhibitörlerini (p27, p21 ve GSK3) inaktive ederek hücre siklusu progresyonunu ve proliferasyonunu arttırır. Bunun yanı sıra, Akt proapoptotik genleri (FasL ve Bim) ve proteinleri (Bad ve Bax) inhibe ederek ve tümör baskılayıcı protein p53' ün

degradasyonunu arttırarak programlı hücre ölümünü sınırlandırır ve hücrenin hayatta kalma kapasitesini arttırır.

PI3K/Akt sinyal iletim yolu aktivitesini düzenleyen çeşitli feedback inhibitör mekanizmalar tanımlanmıştır. SHIP fosfatazları PIP3' ın PI(3,4)P2' ye dönüşümünü sağlayarak sinyal iletimini durdurabilir. İkinci mekanizma ise bir tümör baskılayıcı ve dual fosfataz olan ve hem lipid hem de protein yapıdaki substratları defosforile eden PTEN' i içermektedir. PTEN, PIP3' den bir fosfat çıkarılmasını sağlayarak PI(4,5)P2 formuna dönüştürür, böylelikle PI3K fonksiyonlarını antagonize eder ve Akt aktivitesini negatif yönde düzenler.

#### **2.6.1.4 JAK/STAT Sinyal İletim Yolağı**

Sitokin dönüştürücü sinyallerin en iyi bilinen şekli bir enzim olan janus kinazlar (JAK) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleridir. Tip I ve Tip II sitokin reseptörleri tarafından kullanılan bu sinyal iletim yolağı hedef hücre üzerindeki spesifik etkilerin ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır. Bu sinyal yolağı üzerinde yapılan çalışmalar, sitokine bağlanan reseptörler ve hedef genlerdeki transkripsiyon arasındaki direkt ilişkiyi göstermektedir

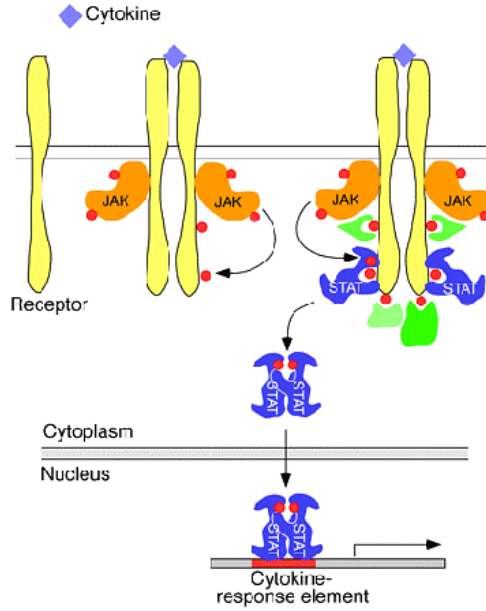
Memelilerde 4 tip JAK bulunmaktadır. Bunlar JAK1, JAK2, JAK3 ve Tirozin kinaz 2 (Tyk2) dir. Sitokinlerin ilişkili reseptöre bağlanması ile ilgili JAK aktive olur. Ardından aktivasyon uygun STAT molekülünün uygun promotör bölgeye bağlanması ile devam etmektedir. STAT molekülleri 7 çeşittir. Bunlar STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak isimlendirilir. Sitokinler ve bağlandıkları ligandlar ve aktive ettikleri JAK ve STAT' lar tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.5)

**Tablo 2.6** JAK/STAT' lar ile etkileşim içinde olan sitokinler

LİGAND	JAK	STAT
<b>γc AİLESİ</b>		
IL-2, IL-9, IL-21	JAK1, JAK3	STAT1, STAT3, STAT5
IL-7, IL-9	JAK1, JAK3	STAT3, STAT5
IL-4	JAK1, JAK3	STAT6
IL-13	JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2	STAT6
<b>βc AİLESİ</b>		
IL-3, IL-5	JAK2	STAT5
<b>Gp130 AİLESİ</b>		
IL-6	JAK1, JAK2	STAT1, STAT3
IL-11	JAK1	STAT1, STAT3
OSM, LIF	JAK1, JAK2, Tyk2	STAT3, STAT5
IL-12	JAK2, Tyk2	STAT4
IL-23	Tanımlanamamıştır	STAT4
<b>IFN AİLESİ</b>		
TİP I IFN	JAK1, Tyk2	STAT1, STAT2
TİP II IFN	JAK1, JAK2	STAT1, STAT5
IL-10	JAK1, Tyk2	STAT3
IL-22	Tanımlanamamıştır	STAT1, STAT3, STAT5
IL-28A, IL-28B	Tanımlanamamıştır	STAT2, STAT3
IL-29	Tanımlanamamıştır	STAT2, STAT3

JAK/STAT sinyal iletim yolağındaki pek çok olay günümüzde yapılan çalışmalarla aydınlatılmıştır. İnaktif JAK enzimleri Tip I ve Tip II sitokinlerin sitoplazmik uçlarına tutunmuştur. Sitokin molekülünün bağlanması ile iki reseptör molekülü bir araya gelir, reseptör ilişkili JAK fosforilasyon yoluyla aktive olur, sonrasında reseptörlerin sitoplazmik bölgelerindeki tirozin rezidülerini fosforile ederler. Reseptörlerin bazı fosfotirozin alanları reseptörüne tutunan monomerik, sitozolik STAT proteinlerinin Src homolog 2 (SH2) uçları tarafından tanınır. Daha sonra STAT proteinleri reseptörle uyarılan JAK kinazlar tarafından fosforile edilirler. STAT proteinlerinin SH2 ucu başka bir STAT proteinin fosfotirozin rezidüsüne bağlanma yeteneğine sahiptir. Sonuç olarak iki STAT proteini birbirine bağlanır ve reseptörden ayrılırlar. STAT dimerleri nükleusa göç eder, sitokine cevap veren genin promotör alanlarındaki DNA sekanslarına bağlanır ve gen transkripsiyonunu aktive ederler. Her bir döngüden sonra yeni STAT proteinleri

sitokin reseptörlerine bağlanabilir, fosforilize olabilir, dimerize olup tekrar nukleusa göç edebilir (Abbas ve Litctman 2003) (Şekil 2.12).



**Şekil 2.12** JAK/STAT sinyal iletim yolağının sitokinlerce uyarımı

Birbirinden farklı pek çok sitokinlerce aktive olan bu sinyal iletim yolağı, reseptöre bağlanan sitokin molekülüne ve aktive olan JAK-STAT proteinlerine bağlı olarak farklı hücresel işlevlerde rol alabilmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar sonucunda JAK ve STAT proteinlerinin eksikliği ya da inhibisyonunun pek çok defekte neden olduğu gösterilmiştir.

### 2.6.1.5 Ras/Raf/Map kinaz Sinyal İletim Yolağı

Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri RAS/RAF/MEK/MAPK sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolağı RAS aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla RAS(MAPKKK), MEK(MAPKK) ve Erk(MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ile ilerler.



RAS, membrana bağılı bir G proteinidir ve birçok tirozin kinaz reseptörünü aktive etmektedir. Serin treonin ve tirozin non-reseptör kinaz kaskadını aktive eder. Erk 1 ve Erk 2 transkripsiyon faktörlerini fosforile ve aktive eder.

Ras proteinlerini aktif hale gelmesi için translasyon ve modifikasyondan sonra membrana yerleşmesi gerekir. İnaktif haldeki hücrelerde RAS proteinleri inaktif (RAS-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP' nin yerine GTP bağlanarak aktif konformasyona dönüşüm (RAS-GTP) tetiklenir. RAS aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Bu aktivasyonda rol oynayan moleküller, SOS (son of sevenless) ve Grb2(Growth-factor-receptor-bound protein 2) adaptör proteinleridir. Bu sinyal iletim yolunun efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici etki ile RAS aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan RAS proteinleri RAF kinazlara yüksek afinite ile bağlanırlar ve RAF kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlar (Kolch vd 2000).

İnsan tümörlerinin %30' unda RAS/RAF/MEK/ERK sinyal iletim yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur (Kolch vd 2000). Bu oran tümörlerdeki RAS mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant RAS proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarımından sorumlu tutulmaktadır.

İnsan tümörlerinde en sık dominant onkogen anormalliği RAS geninde görülen mutasyondur. Büyüme faktörü ile indüklenen mitogenez olayında RAS önemli bir rol oynamaktadır. RAS blokajı büyüme faktörlerinin proliferatif cevabını önler. RAS, büyüme faktörleri ile aktive olur ve RAF' ı hareketlendirir. RAF ise MAP kinaz yolunu uyararak mitogenez başlatır.

Aktive olan RAS diğer protein olan RAF' a bağlanır bu da MAP kinaz (Mitogen activated protein kinase) uyarı sistemi yolunu aktive ederek uyarım nükleusa iletilmiş olur. Uyarı nükleusa girince transkripsiyon faktörleri olan c-jun ve c-fos fosforile olur. Bu uyarılarla siklusun S fazına girmesi sağlanır.

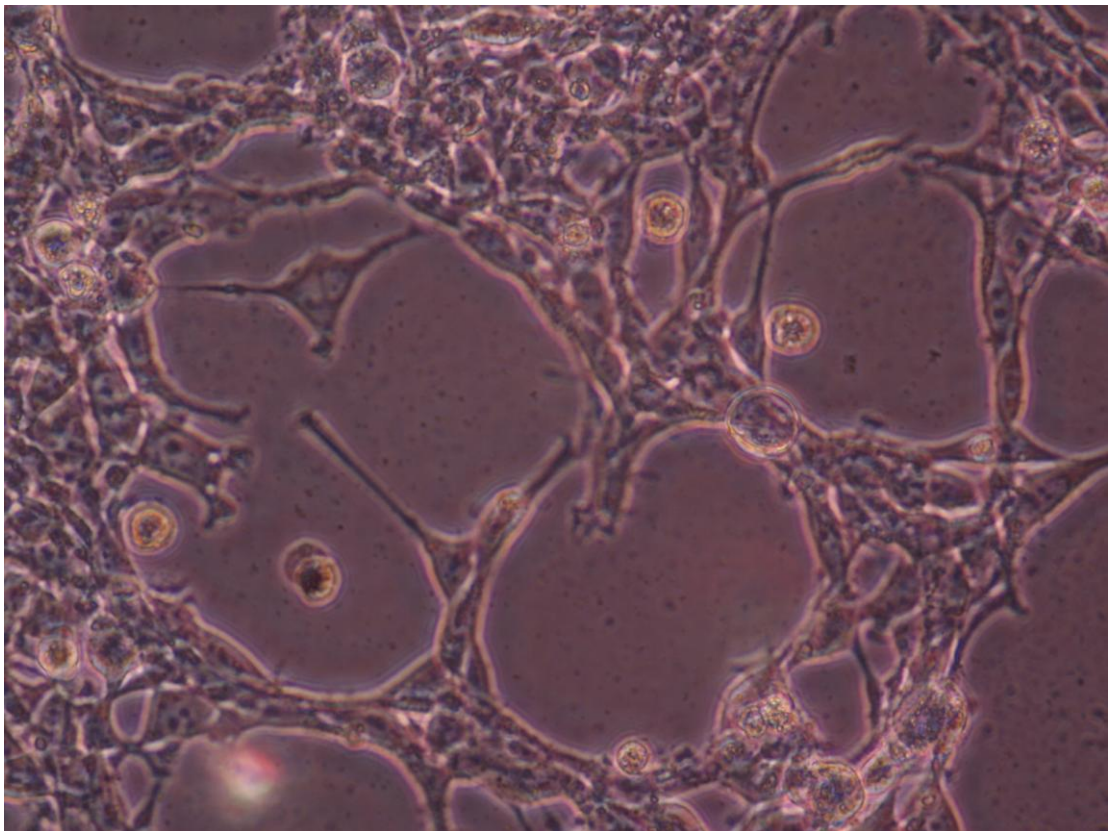
MAP kinazlar, ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan protein ailesi olup hücre membranından nükleusa bilgi aktarılmasında önemli bir rol üstlenmektedirler. Bu sinyal

iletimi kaskadları, embriyogenez, hücre yaşamı, çoğalma, diferansiyasyon ve apoptozis gibi hücresel işlevlerin düzenlenmesinde rol almaktadırlar.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1 Hücreler ve Hücre Kültürü

Bu projede HEK(Human Embriyonic Kidney) 293 hücreleri kullanılmıştır. Hücreler %10 Fetal Calf Serum ve % 0,5'lik penisilin/steptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında inkübe edilmiştir. Hücre kültüründe kullanılan petri kapları Greiner'den temin edilmiştir.



Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan hücre dizisi HEK 293 'ün genel görüntüsü

#### 3.2 Transformasyon

Transformasyon için öncelikle kompetent bakteri hazırlanması gerekmektedir. Kompetent bakteri hazırlanması için 250 ml LB steril besi yeri içerisine stok JM109 E.coli suşundan 100 µl konulmuş ve bir gece 37° C çalkamalı su banyosunda inkübe edilmiştir. Ertesi gün 50 ml steril tüplere transfer edilerek 4000 rpm de 10 dk +4°C santrifüj edilip, süpernetant atılmış ve pellet 10 ml steril 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (soğuk) ile çözülmüştür. Tekrar 4000 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edilip, süpernetant atılmış ve

pellet 1 ml steril 0,1 M CaCl<sub>2</sub> (soğuk) ile çözülmüş ve böylece kompetent hale getirilen JM109 bakterileri steril ependorflara 100 µl olacak şekilde bölünerek daha sonra transformasyon için kullanılmak üzere %10' luk DMSO içerisinde -80 °C'de saklanmıştır.

Transformasyon için 100 µl kompetent bakteri, 1µg vektör DNA steril ependorf içerisine konularak buz içerisinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 42°C'de 90 saniye ve 2 dakika buz içerisinde inkübe edilen bakteriler vektör DNA ile transforme edilmişlerdir. Ardından bakterilerin üzerine 900 µl SOC (Super Optimal Broth) medyum konulmuş ve 37°C'de bir saat inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra transforme bakteriler ml'de 50 µg ampisilin içeren katı besiyerlerine ekilerek bir gece 37°C' de inkübe edilmiş ve koloni oluşumları gözlenmiştir.

### 3.3 Plazmid İzolasyonu

Katı besiyerinden tek koloni ekimi ile alınan transforme bakteriler, 250 ml steril LB besi yerinde ekilerek bir gece çalkalamalı su banyosunda 37°C de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteriler, +4°C'de 15 dakika 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Plazmid izolasyonu için, QIAprep maxi prep plazmid izolasyon kiti kullanılmıştır. Bu kitin P1 (50 mM Tris -HCL pH:8, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNAaz) tamponundan 10 ml konularak bakteri pelleti çözülmüştür. Daha sonra P2 (200 mM NaOH, %1 SDS) tamponundan 10 ml ilave edilip 4-6 kez aşağı-yukarı yapılarak karıştırılarak bakteriler 5 dakika oda ısısında inkübe edilmiş ve bakterileri lize edilmesi sağlanmıştır. İnkübasyon süresini sonunda +4°C'deki P3 (3 M Potasyum Asetat pH: 5,5) tamponundan 10 ml ilave edilip, Q filtresine dökülmüştür. Bakteri lizatı Q filtresi içerisinde 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında 50 ml tüplerin üzerine Q maxi tipler yerleştirilip, 10 ml QBT (750 mM MOPS pH: 7 %15 İsopropanol, % 0,15 Triton- X- 100) tamponu konularak kartuj dengelenerek hazır hale getirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda Q filtresi içerisindeki bakteri içeriği piston yardımıyla Q maxi tipin içerisine aktarılmıştır. Q maxi tipin içerisindeki bakteri lizatı yer çekimi etkisiyle akmıştır. Bu işlemin ardından üzerine 60 ml QC (1M NaCl, 50 mM MOPS pH: 7, %15 İsopropanol) tamponu konulmuştur. Bu tampon da Q maxi tipten geçtikten sonra, Q maxi tipin altındaki 50 ml'lik tüp yerine yeni tüp konulmuştur ve QF ( 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-

HCl pH: 8,5 % 25 İsoopropanol) tamponundan 15 ml tipin üzerine dökülmüştür. Q maxi tipten geçen QF tamponun üzerine 10,5 ml izopropil alkol ilave edilmiştir ve oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 30 ml'lik enjektöre çekilen sıvı Qiagen filtreden geçirilmiştir. Qiagen filtreden 5 ml'lik enjektör yardımıyla 2 ml etanol çekilerek filtreden geçirilmiştir. Enjektörün filtre takılıyken asla geri çekilmemesi gerekmektedir. Bu yüzden enjektör filtre takılıyken geri çekmeden, alkol ve hava ile kurutulmuştur. Daha sonra 1 ml TE (20 mM Tris-HCl pH:8, 1 mM EDTA) tamponu, Qiagen filtreden 4 kez tekrar geçirilip steril ependorflara aktarılarak, plazmit elde edilmiş ve spektrofotometri cihazında 260/280 nm dalga boyunda okutulularak saflığı ve miktarı saptanmıştır.

### **3.4 Agaroz Jel Hazırlanması**

% 0,7 lik agaroz jel hazırlamak için 0,350 gr agaroz tartılıp, 50 ml Tris Asetat EDTA tamponu (TAE) (40 mM tris-base, 20 mM Asetik asit, 1 mM EDTA) içerisinde mikrodalgada çözülmüştür. Üzerine 3 µl Ethidium Bromide (Et-Br) ilave edilerek, agaroz jel tepsisine dökülmüştür. Kuyucuklara numuneler yükleme tamponu (sigma) ile yüklenmiş ve bir kuyucuğa DNA moleküler weight marker konulmuştur. TAE tamponu içerisinde DNA'lar 80 volt'da 30 dakika yürütülmüştür. Örneklerin görüntüleri jel görüntüleme cihazı (UVITEC) üzerinden bilgisayara aktarılmıştır.

### **3.5 Plazmidlerin HEK 293 Hücrelerine Transfekte Edilmesi**

Petri kabında % 80 yoğunluğa ulaşmış olan hücreler 6 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Ardından hücreler %10 Fetal Calf Serum ve % 0,5'lik penisilin/steptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından transfeksiyona başlamadan 1-2 saat önce hücrelerin besiyeri serumsuz besi yeri kullanılarak değiştirilmiştir. Total hacim 100 µml olacak şekilde bir ependorf tüpe DNA + serumsuz besiyeri + 6 µl transfeksiyon ajanı FUGEN HD konulmuştur. DNA üzerine serumsuz besiyeri eklendiğinde ve ardından transfeksiyon ajanı Fugen HD eklendiğinde ayrı ayrı 30' ar kez pipetaj yapılmıştır. Ardından 100 µl lik bu karışım oda sıcaklığında 15 dakika

inkübe edilmiştir. 15 dakika inkübasyon süresinin ardından bu karışım laminar flow da 6 kuyucuklu plaktaki hücrelerin üzerine damla damla verilmiştir. Ardından hücreler % saat serumsuz besi yeri (OPTİMEM) ortamında 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında 5 saat inkübe edilmişler. 5 saat sürenin ardından bu besi yeri çekilerek yerine %10 Fetal Calf Serum ve % 0,5’lik penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri eklenip 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında 24 saat inkübe edilmiştir.

<b>PLAZMİD ADI</b>	<b>2 µg DNA için</b>	<b>OPTİMEM</b>	<b>FUGEN</b>
pcDNA 3.1 (0,215 µg/µl)	9,30 µl	84,7 µl	6 µl
pzip EGFR vII (0,434 µg/µl)	4,61 µl	89,69 µl	6 µl
WT EGFR (0,452 µg/µl)	4,42 µl	89,58 µl	6 µl
E746-A750 del (0,398 µg/µl)	5,03 µl	88,97 µl	6 µl
EGFR L858R ( 0,524 µg/µl)	3,81 µl	90,18 µl	6 µl

### **3.6 Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonlarının Saptanması**

Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonlarının Saptanması için öncelikle stok BSA hazırlanması gerekmektedir. Bunun için ilk olarak 0,025 gram BSA (sigma) tartılıp, 2,5 mg/ml stok hazırlanmıştır. Ana stok 1:10 oranında sulandırılıp, 0,25 mg/ml (250µg/ml) BSA hazırlanmıştır. 250 µg/ml BSA’dan 2 ml alınmış ve üzerine 8 ml distile su ilave edilip, 50 µg/ml BSA ara stok yapılmıştır. 50 µg/ml BSA ara stoktan 1 ml alınıp, üzerine 4 ml distile sudan ilave edilerek, 10 µg/ml BSA hazırlanmıştır. 50 µg/ml BSA ara stoktan 3 ml alınıp, üzerine 3 ml distile sudan ilave edilip, 25 µg/ml BSA hazırlanmıştır. 250 µg/ml BSA stokundan 4 ml alınıp, üzerine 8 ml distile sudan konulup, sonuç olarak 125 µg/ml BSA hazırlanmıştır. Sonuçta, 250 µg/ml BSA, 125 µg/ml BSA, 50 µg/ml BSA, 25 µg/ml BSA 6, 10 µg/ml BSA stokları elde edilmiştir.

Bradford yöntemi uygulanırken aşağıdaki işlemler sırasıyla yapılmıştır. Protein konsantrasyonları saptanacak olan hücre lizatlarından 5 µl alınıp, üzerine 495 µl distile su steril ependorflara konulmuştur (1:100 sulandırma). Daha sonra, 1:100 oranında sulandırılan hücre lizatından 80 µl alınmış, üzerine 720 µl distile su başka bir steril ependorflara konulmuştur (toplamda 1:1000 sulandırma). Kalibrasyon için hazırlanan

BSA konsantrasyonlarından 80 µl alınarak, üzerine 720 µl distile su steril ependorflara konulmuştur (toplamda 1:1000 sulandırma). Bu örneklerin üzerine 200 µl Biorad protein tayin kiti (Biorad Inc.) solüsyonu (1:5 oranında) konulmuş ve 15 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda örnekler vortekslenerek 96 kuyucuklu petrilere 200 µl olacak şekilde konulmuştur. Örnekler, Glomax Multi Detection System (Promega) cihazında kayıtlı olarak bulunan Bradford protokolü seçilerek okunmuştur.

Standart BSA'lar ile oluşan grafiğin eğimi kullanılarak, konsantrasyon aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Konsantrasyon} = (\text{absorbans/eğim}) \times \text{sulandırma katsayısı}$$

### 3.7 SDS-PAGE ve Western Blot

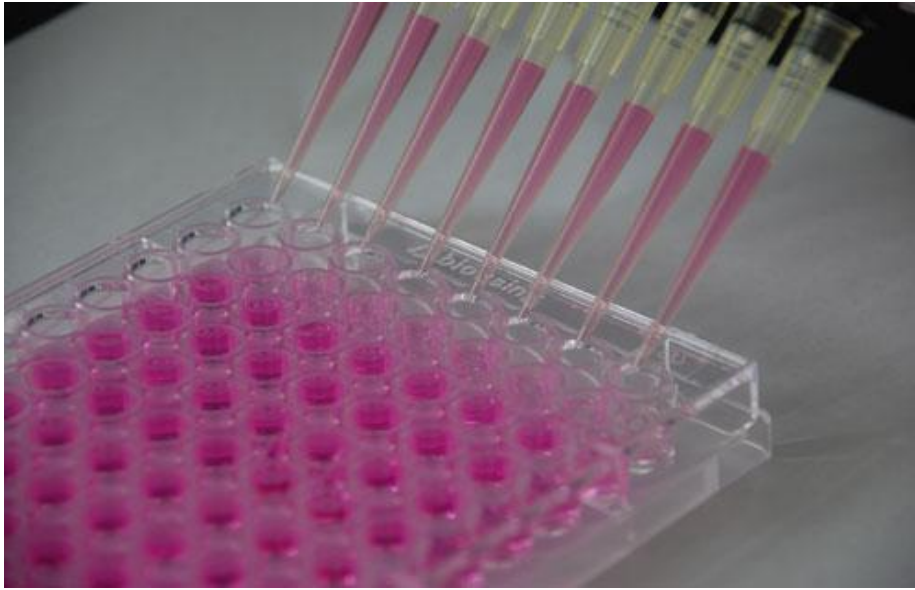
pzip EGFRVIII, pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücreleri 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava içeren ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. Bu hücrelerin protein özütleri RIPA (0.15 molar NaCl, % 10 SDS, 0,05 molar tris-HCl pH: 7,65, % 1 NP-40 ve % 0,5 deoxycholate) tamponu içerisinde toplanmış, örnekler 12000 x g'de, 4 °C'de 3 dakika santrifüj edilerek istenmeyen hücre artıklarının ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Toplanan örneklerden 5'er mikrolitre farklı ependorf tüplere alınmış ve Biorad protein miktarı tayin kiti (Biorad Inc.) kullanılarak bu örneklerin protein miktarları saptanmıştır. Daha sonra örneklerden, mikrolitrede 50 mikrogram protein olacak şekilde alınmıştır. Bunların üzerlerine protein yükleme boyasından da (100 mM Tris-HCL (pH6.8), %12 betamerkaptoetanol, 2% SDS, 1% Bromofenol blue, 20% gliserol) 1:1 oranında eklenerek, örnekler 5 dakika 100°C'de kaynatılmıştır. Kaynatma işleminin hemen ardından 10 mikrolitrelik otomatik pipet kullanılarak, ependorf tüp içindeki örnekler %20-4 gradientli SDS jele (PIERCE) yüklenmiş ve yürüme tamponu ( Tris baz 0.1 M, Hepes 0,1 M, SDS 3 mM) ile 80 voltta 45 dakika elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez işleminin ardından proteinler transfer tamponu (20% metanol, 50 mM Tris, 40 mM glisin ) içinde 4 °C'de 75 mAmp

akım şiddetinde bir gece boyunca immünobolin membran (Thermo) üzerine transfer edilmiştir. Bu işlemden sonra membran, %5'lik kuru süt tozu içeren TBST (34 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH:7,6 %1 Tween 20) çözeltisi içinde oda sıcaklığında 1 saat bloklanmıştır. Ardından aynı membran %5 kuru süt içinde 1:5000 ( EGFR Santa Cruz) , 1:50.000 (GAPDH Santa Cruz) oranlarında bulunan primer antikolarla oda sıcaklığında 1 saat işaretlenmiştir. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin primer antikolarla işaretlemesinin ardından, membran 1 saat TBST ile oda sıcaklığında yıkanmıştır. Yıkama işleminin bitmesiyle membran primer antikoların immünoglobulinlerine karşı spesifik olarak geliştirilmiş olan ve 1:10000 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz Santa Cruz) bağlı sekonder antikor bulunduran %5 kuru sütlü TBST çözeltisi içerisinde tekrar işaretlenmiştir. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL (Enhanced Chemiluminescence) solüsyonu (PIERCE) kullanılarak kemilümines reaksiyonu başlatılmış ve spesifik protein bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak karanlık odada belirlenmiştir.



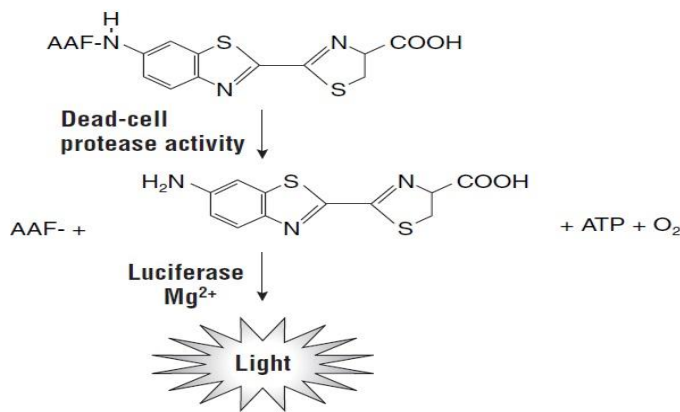
### 3.8 Proliferasyonun Saptanması

pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücreleri 24 saat sonra tripsinize edilerek sayılmış ve 96 kuyucuklu plaklara  $1 \times 10^3$  hücre/ml olacak şekilde ekilmiş ardından bu hücelere 1000-500-250-125-62-32-31-16  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında Gempitabin uygulanmıştır.



**Şekil 3.2** 96 kuyucuklu plaklarda hücre kültürü

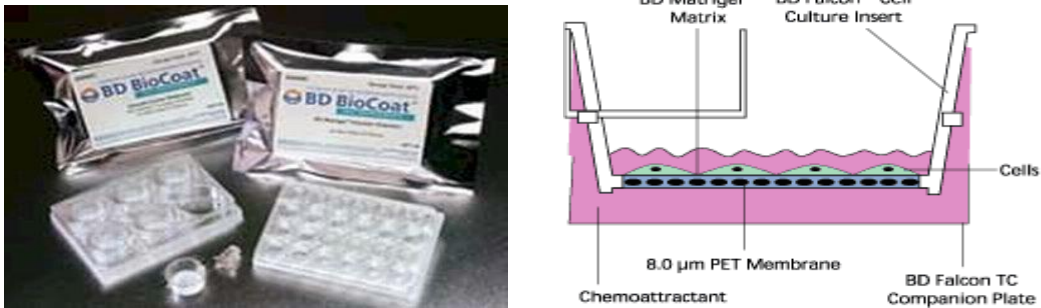
Bu şekilde hücreler  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  ve %95 nemli hava içeren ortamda 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Cytotox Glo kit (Promega firmasından temin edilmiştir) kullanılarak Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı ile 0. ve 72. saatlerdeki hücre proliferasyonu ölçülmüştür.



**Şekil 3.3** Cytotox Glo kitinin Canlı hücreler İçindeki ATP molekülünü saptaması

### 3.9 İnvazyonun Saptanması

Planlanan çalışmada EGFR vIII, E746-A750, L858R mutasyonlarının hücre invazyonuna etkisinin saptanması için BioCoat Matrigel İnvazyon Chamber-invazyon odaları (BD Biosciences, Clontech) kullanılmıştır. Bu invazyon odacıklarının hücelere sağladıkları özel şartlar sayesinde “*in vitro*” koşullar altında hücrelerin invaziv özellikleri saptanabilmektedir. Bu invazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren bir membran ile örtülüdür ve bu porlu membran ayrıca bir matrijel matrix ile kaplıdır. Bu matrijel matrix bazal membranı “*in vitro*” koşullarda oluşturma imkanı sağlamaktadır. Bu membran sayesinde invaziv özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesi engellenmektedir. Bu membrandan diğer yüze ancak invaziv hücreler geçebilmektedir. Dolayısı ile matrijel membran, invaziv olan ve olmayan hücrelerin birbirinden ayırabilme imkanı sunmaktadır.



Şekil 3.4 BD Biocoat Matrigel İnvasyon Chamber Genel Görünümü

EGFR VIII, E746-A750, L858R, WT EGFR ve boş vektör transfekte edilmiş hücreleri transfeksiyondan 24 saat sonra tripsin edilerek thoma lamı ile sayılmış ve her invazyon odasında  $1.25 \times 10^5$  olacak şekilde serum içermeyen 0.5ml RPMI1640 içerisinde konulmuştur. İnvazyon odacığının dışına ise, 0.75 ml %10 FBS içeren RPMI1640 konularak, invazyon odacığının dışının hücreler için kemoatraktan olması sağlanmıştır. Hücreler 24 saat 37C’de CO<sub>2</sub>’li inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon saatinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının membranının dış yüzeyine geçeceklerinden, invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırılmıştır. Ayrıca, iç yüzeyindeki hücreler “kulak temizleme çubuğu” ile kazınarak

uzaklaştırılmıştır. İnvaziv olan dış yüzeydeki hücreler, önce 2 ml metanol ile fikse edilmiş, ardından da 2 ml Toluidine blue (%1) ile boyanıp entellant ile lamel kapatılarak kurutulmuş ve mikroskop altında hücreler sayılmıştır. % İnvazyon hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnvazyon} = \frac{\text{matrijel matriks bazal membranındaki hücre sayısı}}{\text{Kontrol membranındaki hücre sayısı}} \times 100$$

### 3.10. Verilerin Değerlendirilmesi

Proliferasyon ve invazyon deneylerinden elde edilen sonuçlar istatistiksel analiz program olan SPSS'in (Statistical Package for the Social Sciences) 10.0 sürümündeki ilişkilendirilmiş örneklem için T testi (paired sample T test) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu testler sayesinde gruplarımızın hem kontrol hem de birbirleri arasındaki farkın istatistiksel olarak  $p < 0,05$  düzeyinde anlam taşıyıp taşımadığı test edilmiştir.

## 4. BULGULAR

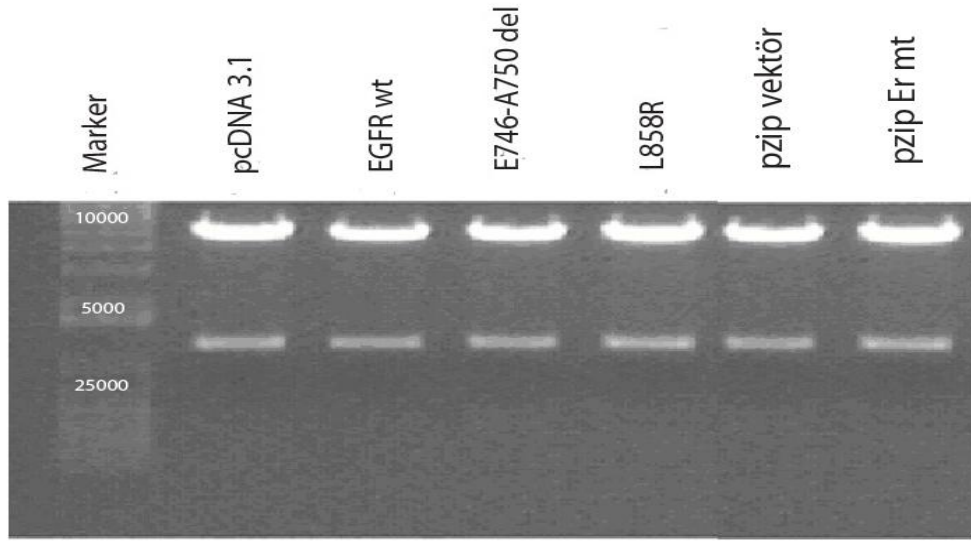
### 4.1 Transformasyon ve Plazmit izolasyonu sonucu elde edilen plazmitlerin agaroz jelde görüntülenmesi

Transformasyon deneyinin ardından QIAprep maxi prep plazmid izolasyon kiti kullanılarak JM109 E.coli suşlarından plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmitlerin konsantrasyonlarını ve kalitesini saptamak amacıyla spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır.

**Tablo 4.1** İzole edilen plazmit DNA'larının spektrofotometrik ölçüm sonuçları

DNA ÖRNEĞİ	260/280 nm ratio	Miktar ng/µl
pcDNA 3.1	1,92	215
EGFR wt	1,94	452
EGFR E746-A750 del	1,96	398
EGFR L858R	1,91	524

Spektrofotometrik ölçüm ardından hazırlanmış olan %0,7' lik agaroz jelle DNA örnekleri TAE tamponu içerisinde 80 volt'da 30 dakika yürütülmüştür. Örneklerin görüntüleri jel görüntüleme cihazı (UVITEC) üzerinden bilgisayara aktarılmıştır.



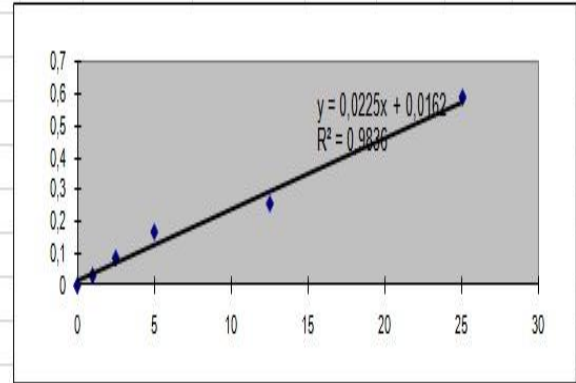
**Şekil 4.1** Plazmid izolasyonundan sonra elde edilen plazmidlerin agaroz jel görüntüsü

#### **4.2 Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonlarının Saptanması**

pzip EGFRVIII, pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücreleri 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava içeren ortamda 24 saat inkübe edilmiş ve bu sürenin ardından hücre lizatları 50 µl RIPA solüsyonu kullanılarak cell scraper yardımıyla toplanmıştır. Toplanan hücre lizatları 30 dakika buzda bekletilmiş ve 30 dakikanın ardından 200 µl, 100 µl ve 20µl’ lik pipetler yardımıyla pipetaj yapılmış olup her pipetajın ardından 5 dakika buzda bekletilmiştir. Son olarak 13000 rpm de 2 dakika sanrifüj yapılmış ve süpernatant toplanmıştır. Toplanan süpernatanta Bradford protein miktarı tayini yöntemi uygulanarak protein miktarları saptanmıştır (Tablo 4.2)

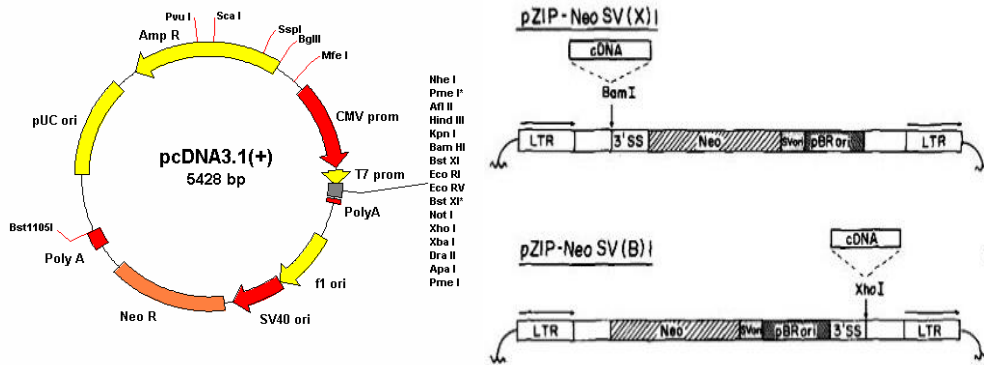
**Tablo 4.2** Bradford Analizi Sonucu Saptanan Protein Miktarları ve R Değeri

BSA conc.	OD(595nm)	OD(595nm)	AVE	AVE-BG
0	0,46	0,428	0,444	0,00000
1	0,48	0,47	0,475	0,03100
2,5	0,535	0,525	0,53	0,08600
5	0,611	0,613	0,612	0,16800
12,5	0,699	0,701	0,7	0,25600
25	1,101	0,965	1,033	0,58900



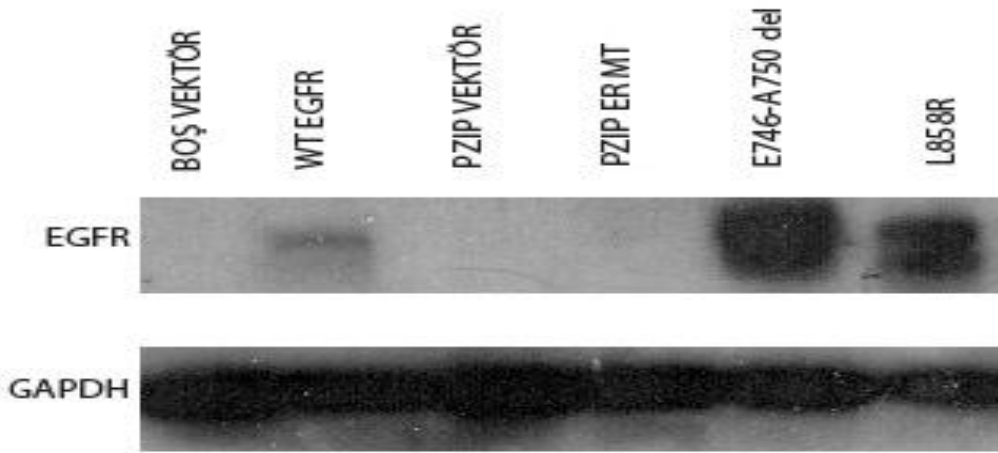
sample	dil ratio	OD595(1)	OD595(2)	AVE	AVE-BG	conc.	dil*conc.(ug/ul)	50 ug	PBS	Lamelli
Boş vektör	1000	0,61	0,607	0,6085	0,16450	6,605	6,605	7,57	7,43	5,0
WT EGFR	1000	0,576	0,575	0,5755	0,13150	5,136	5,136	9,74	5,26	5,0
PZIP VEKTÖR	1000	0,582	0,593	0,5875	0,14350	5,670	5,670	8,82	11,18	5,0
PZIP ER MT	1000	0,588	0,594	0,5910	0,14700	5,826	5,826	8,58	6,42	5,0
E746-A750 del	1000	0,603	0,58	0,5915	0,14750	5,848	5,848	8,55	6,45	5,0
L858R	1000	0,637	0,599	0,6180	0,17400	7,028	7,028	7,11	7,89	5,0

### 4.3 Transfekte Hücrelerde EGFR İfadesinin Gösterilmesi

**Şekil 4.2** HEK 293 hücrelerine transfekte edilen ekspresyon vektörleri

pzip EGFRvIII, pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinden elde edilen ve Bradford yöntemiyle konsantrasyonları saptanan lizatlar bu hücrelerde EGFR ifadesinin varlığını göstermek amacıyla Western Blot analizine tabi tutuldular.

“Materyal metod bölümde” anlatıldığı gibi bradford yöntemi ile protein miktarı tayin edildi. Bu lizatlar, her well’de 50 µg protein olacak şekilde SDS-jel (%4-20 gradientli) elektroforezine tabi tutuldular. Elektroforez işleminin ardından jeldeki proteinler immünobolin blota transfer edildiler. EGFR’e karşı yapılan işaretleme transfektant HEK 293 hücrelerinin EGFR wt, EGFR E746-A750 del ve mutantlarını eksprese ettiğini göstermektedir (Şekil 4.3). Aynı sonuç bize pcDNA 3.1 ve pZIP ekspresyon vektörü transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinde EGFR ifadesinin olmadığını göstermektedir.



**Şekil 4.3** pzip EGFRvIII, pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin EGFR ve GAPDH ekspresyonları

SDS-PAGE sırasında protein örneklerin yüklenmesinde herhangi bir hata olup olmadığını göstermek için membran üzerinden EGFR antikorunu uzaklaştırılarak (strip off) aynı membran GAPDH antikorunu ile tekrar işaretlenmiştir (Şekil 4.3). Bu sonuçta protein yüklemesinin well'lere eşit miktarda yapıldığını gösterir.

#### 4.4 EGFR İfadesinin Proliferasyona Etkisi

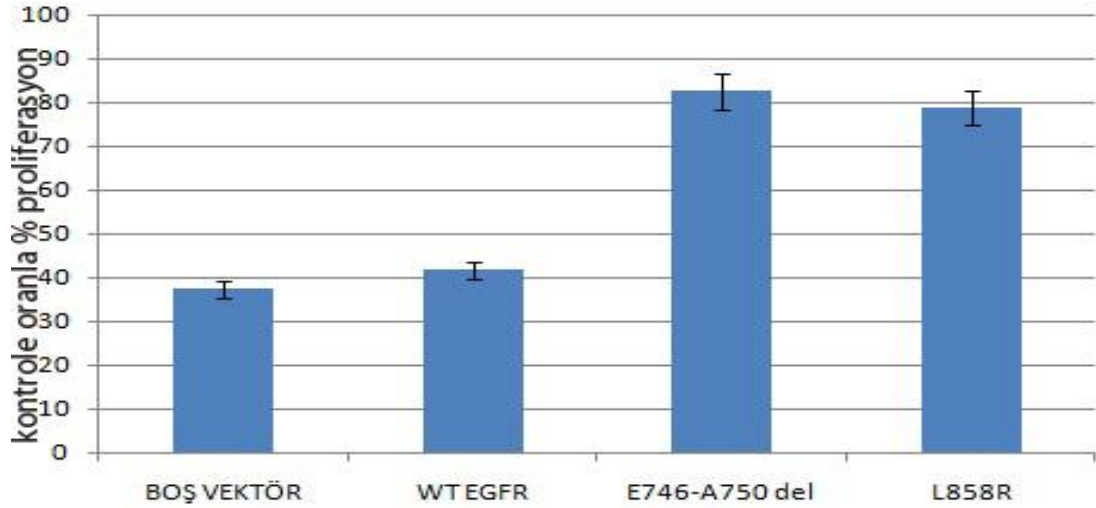
pzip EGFR $\nu$ III, pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücreleri 24 saat sonra tripsinize edilerek sayılmış ve 96 kuyucuklu plaklara  $1 \times 10^3$  hücre/ml olacak şekilde ekilmiş ardından bu hücelere 2000-1000-500-250-125-62-32-31  $\mu$ g/mL konsantrasyonlarında Gemsitabin uygulanmıştır. Bu şekilde hücreler 37°C’de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava içeren ortamda 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Cytotox Glo kit (Promega firmasından temin edilmiştir) kullanılarak Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı ile 0. ve 72. saatlerdeki hücre proliferasyonu ölçülmüştür (Şekil 4.5, Şekil4.6)

0. ve 72. Saatler arasındaki kontrole oranla hücrelerin sağ kalım oranlarına baktığımızda pc DNA 3.1 EGFR E746-A750 ve pc DNA 3.1 EGFR L858R ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin sağ kalım oranları WT EGFR ve pc DNA 3.1 ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş hücelere oranla yaklaşık 2 kat daha yüksek miktarda saptanmıştır. EGFR E746-A750 del ve L858R mutasyonlarını eksprese eden HEK 293 hücrelerin anormal çoğalabilme özelliği kazandıkları gözlenmektedir. WT EGFR ve pc DNA 3.1 ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinde sağ kalım oranı daha düşük oranda saptanmıştır. Bu sonuçlar bize mutant EGFR eksprese eden hücrelerin sağ kalım oranının daha fazla olduğunu göstermektedir.

**Tablo 4.3** pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin 0 ve 72. saatler arasındaki kontrole oranla % proliferasyon oranları (p<0,05)

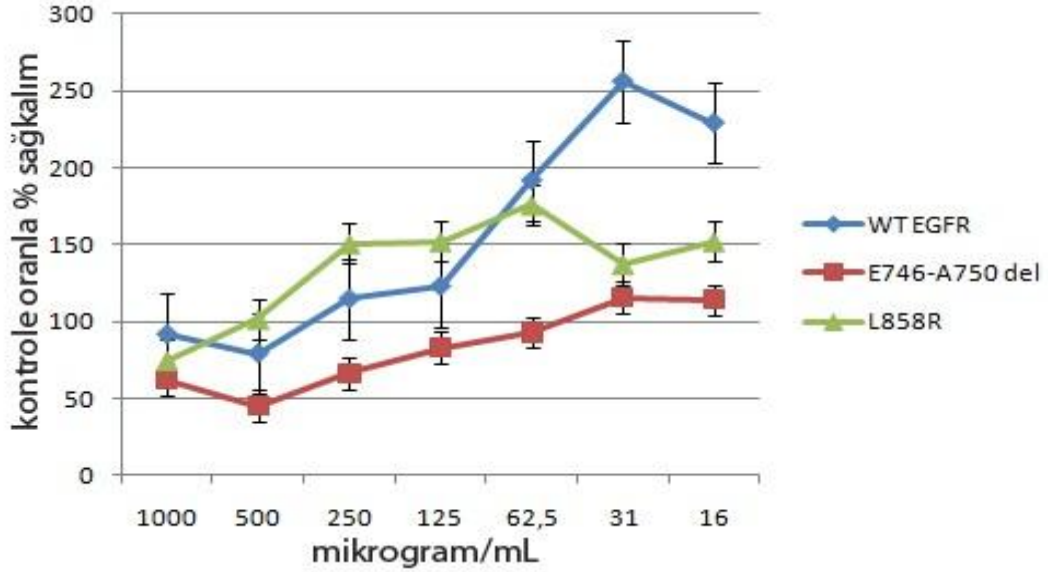
<b><u>Vektör</u></b>	<b><u>% Proliferasyon</u></b>
Boş vektör	<b>38,4</b>
WT EGFR	<b>42,1</b>
E746-A750 del	<b>83,2</b>
L858R	<b>78,6</b>





**Şekil 4.4** pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin 0 ve 72. saatler arasındaki kontrole oranla % proliferasyon oranları ( $p < 0,05$ )

Farklı konsantrasyonlardaki Gempitabinin pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkisine bakıldığında elde edilen sonuçlara göre mutant EGFR eksprese eden hücrelerde sağ kalım oranı WT EGFR eksprese eden HEK 293 hücrelerine kıyasla yaklaşık 2 kat düşük oranda saptanmıştır. Bu sonuçta bize mutant EGFR eksprese eden hücrelerin anti-kanser ilaçlara karşı daha duyarlı bir hale geldiğini göstermektedir.



**Şekil 4.5** Farklı konsantrasyonlardaki Gemcitabinin pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkisi ( $p < 0,05$ )

#### 4.5 Tekrar Yaratılan EGFR İfadesinin Hücre İnvazyonuna Etkisi

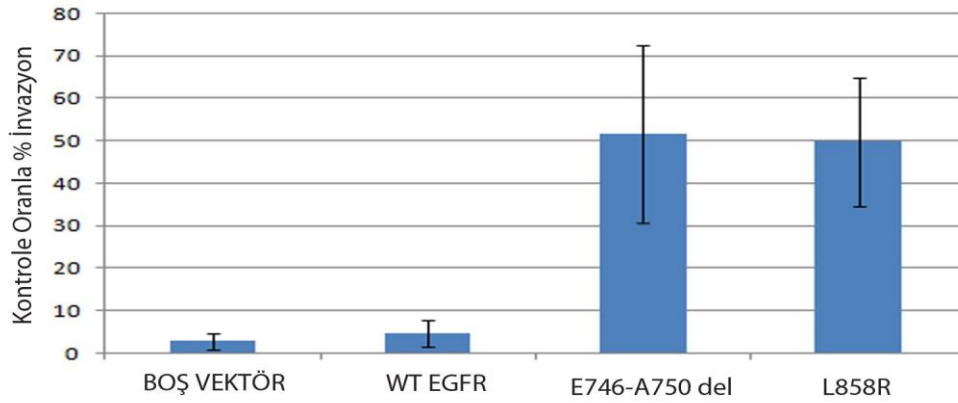
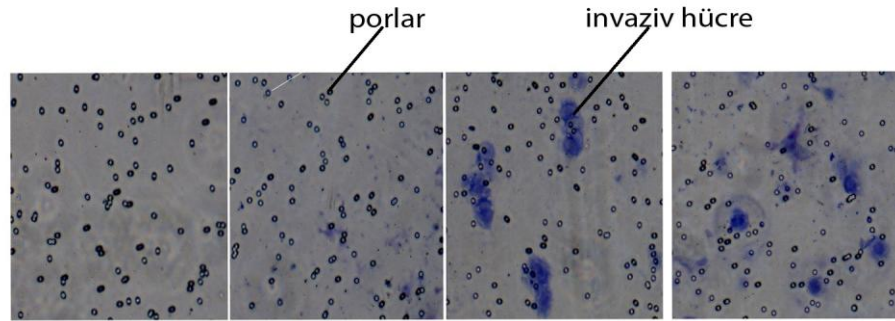
pzip EGFRVIII, pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücreleri, matrijel invazyon odacıklarına serum içermeyen (0,01 BSA) besiyeri içerisinde  $2,5 \times 10^4$  hücre/ml olacak şekilde yerleştirilmiştir. İnvazyon odacığının dışına ise hücrelere kemoatraktan ortam sağlamak için %10 serum (FBS) içeren besiyeri konulmuştur. Bu deney düzeninde hücreler  $37^\circ\text{C}$ 'de  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde 24 saat inkübe edilmişlerdir. Bu durumda invaziv karakterli hücreler seruma kemoatrak yaparak 8 mm çaplı porlar ile örtülü matrijel matriks ortamından diğer yüzeye geçmişlerdir. Matrijel matrikste bulunan dolayısıyla invaziv hücreler öncelikle metanolle fiske edildiler. Ardından toluidine mavisi (%1) ile boyanarak mikroskop altında 40X büyütmede sayılmışlardır.

İnvazyon deneyinden elde edilen sonuçlar aşağıdaki formül uygulanarak hücrelerin % invazyon hesaplandı.

$$\% \text{ İnvazyon} = \frac{\text{matrijel matriks bazal membranındaki hücre sayısı}}{\text{Kontrol membranındaki hücre sayısı}} \times 100$$

**Tablo 4.4** Yeniden yaratılan EGFR ekspresyonunun hücre invazyona etkisi (p<0,05)

<u>Vektör</u>	<u>% İnvazyon</u>
Boş vektör	2,8±1,2
WT EGFR	4,6±2,9
E746-A750 del	51,8±21,2
L858R	49,8±18,3



**Şekil 4.6** Yeniden yaratılan EGFR ekspresyonunun hücre invazyona etkisi (p<0,05)

pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinde kontrol oranla yüzde invazyon değerleri Tablo 4.3 'de verilmiştir.

Bu sonuç bize EGFR E746-A750 del ve L858R mutasyonlarını eksprese eden hücrelerin invaziv bir özellik kazandığını göstermektedir (p<0,05).

## 5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, ülkemizde ve dünyada hastalık sebebi ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarının ardından gelmesi ve gitgide artan insidansı nedeniyle çok önemli bir sağlık sorunudur. Günümüzde gelişen teknolojiye rağmen sağ kalımı arttırıcı yöntemlerin düşük oranda başarı sağlaması nedeniyle bu sağlık sorunu ile ilgili pek çok araştırma yapılmakta ve bu problem farklı yönleriyle ele alınmaktadır.

Akciğer kanserinin temelinde meydana gelen genetik değişimler ve bu genetik değişimlerin sonucu olarak ortaya çıkan kontrolsüz hücre çoğalması yatmaktadır. Kontrolsüz hücre çoğalmasını takiben hücrenin yerleştiği bölgede, gerekse yerleştiği bir başka dokuda beslenebilmek için kendine ait bir damar ağı oluşturmasıdır. Tüm bunların yanında DNA tamirinin ve apoptozun engellenmesi de bu gelişime destek vermektedir.

Kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmaları otokrin, parakrin ve endokrin sinyal iletim yolları aracılığı ile etki eden pek çok molekül tarafından düzenlenmektedir. Tümör büyümesinin bu sinyal iletim molekülleri tarafından düzenlenmesi, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi ile doğrudan veya anjiyogenez ya da konak immünitesi üzerine olan etkileri aracılığıyla indirekt biçimde olabilmektedir.

Akciğer kanseri tedavisinde büyüme faktörlerini hedef alan araştırmalar, bu moleküllerin miktarlarına bağlı bir tanısal ya da prognostik belirteç oluşturma ve bu sinyal iletim moleküllerinin ya da aktive ettikleri sinyal iletim yollarının tümör lokalize dokularda bloke edilmesi konularını ele almaktadır ( Seiji vd 2003, Murphy 2001, Iwasaki vd 2004). Bu tip çalışmalar sayesinde antitümöral ve antianjiyogenik tedavi kavramları daha da belirginleşmiştir. Bu kavramların belirginleşmesi kanserli bir hastada kanser gelişiminin erken ya da ileri evrelerde durdurulmasına yardımcı olabilmektedir.

Kanser gelişiminde pek çok büyüme faktörü ve bu büyüme faktörlerinin reseptörleri önemli rol oynamaktadırlar. Bu büyüme faktör reseptörü genlerinde meydana

gelebilecek olası genetik değişimlerin pek çok kanser türünün gelişiminde önemli rol oynadıkları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin, EGF' ün hücre yüzeyindeki reseptörü olan EGFR' ünde meydana gelen mutasyonların akciğer kanseri, meme kanseri ve mesane kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde rol oynadığı daha önce literatürde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kosaka vd 2004, Yoshida vd 2007, Normanno vd 2006, Roskoski 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında KHDAK' lerinde yaklaşık olarak % 20 oranında *EGFR* geninde bir mutasyon olduğu saptanmıştır ( Shigematsu vd 2005). EGFR' ın tirozin kinaz domaininde meydana gelen bu mutasyonlar klinikte önemli bir rol oynamaktadır. EGFR' ın tirozin kinaz domaininde meydana gelen bu mutasyonlar kanser gelişiminin erken evresinde progresyonunda önemli rol oynamaktadır ( Akça vd 2006).

EGFR geninin 21. ekzonunda, 858. pozisyonunda yer alan lösin-arjinin aminoasit substitasyonu, 19. ekzonundaki karakterize aminoasit 747-750 delesyonları, 20. Ekzonunda yer alan 790. pozisyonunda yer alan treonin-metionin aminoasit substitasyonu ile aynı ekzondaki insersiyon tipi delesyonlar ile çok sık rastlanmamakla beraber 18. Ekzon mutasyonları gen üzerinde saptanmış mutasyonlardır (Kosaka vd 2006, Tokumo vd 2006) ve EGFR'nin aşırı aktivitesine neden olan bu genetik değişimler arasında görülen EGFR VIII ve E746-A750 delesyon mutasyonları ile L858R nokta mutasyonları sık görülen EGFR mutasyonları olup yapılan çalışmamızda kullanılan mutasyonlardır.

Araştırmamızda HEK 293 hücrelerine pzip EGFRvIII, pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş ve EGFR ifadesi Western Blot analizi ile gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.3). Western Blot analizi sonucu bize HEK 293 hücrelerin gerçekleştirdiğimiz transfeksiyon işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Western Blot analizi sonucunda pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR transfekte edilen HEK 293 hücrelerinde EGFR ekspresyonları gözlenmiştir. Ancak pzip EGFRvIII ekspresyon vektörü transfekte edilen HEK 293 hücrelerinde Western Blot analizi sonucunda herhangi bir EGFR ekspresyonu saptanmamıştır. Bu durumun nedeni olarak ise transfekte edilen pzip EGFRvIII geninin

promotor bölgesinde meydana gelen bir nokta mutasyonunun *EGFR* gen ifadesinin baskıladığı düşünülmektedir.

Lynch ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada pc DNA 3.1 EGFR E746-A750 ve pc DNA 3.1 EGFR L858R transfekte edilen HEK 293 hücrelerinde EGFR ekspresyon düzeyi wt EGFR eksprese eden hücrelere oranla fazla olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, Western Blot analizi sonucunda pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR transfekte edilen HEK 293 hücrelerinde EGFR ekspresyonlarının literatüre paralel veriler sunduğunu göstermektedir ( Akça vd 2005, Lynch vd 2004, Nishio vd 2004).

pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinde tekrar yaratılan EGFR ekspresyonunun hücre proliferasyonu üzerine etkisi 0. ve 72. Saat verileri elde edilerek saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre bize pc DNA 3.1 EGFR E746-A750 ve pc DNA 3.1 EGFR L858R ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinde kontrole oranla % proliferasyonu pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin % proliferasyonu daha yüksek bulunmuştur. pc DNA 3.1 EGFR E746-A750 ekspresyon vektörü transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinde kontrole oranla % proliferasyon en yüksek oranda bulunmuştur. Literatürde yapılan bir çalışmada, mutant EGFR eksprese eden akciğer kanseri hücre dizilerinde AKT, p44/42 MAPK ve STAT3 sinyal iletim yolları aktive edildiği ve bunun sonucu olarak ta kanser hücrelerinin proliferasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Akça vd 2005). Bu çalışmanın da gösterdiği gibi EGFR aktivasyonu artmış hücrelerin sağ kalımında artış gözlenmektedir. Bu sonuçlar ışığında mutant EGFR eksprese eden hücrelerde EGFR aktivasyonunun Western Blot deneyinde gösterildiği gibi artmış olmasına paralel olarak hücre sağ kalımına katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Gemcitabin akciğer kanseri tedavisinde kullanılan bir EGFR inhibitörüdür. EGFR inhibitörü olan gemcitabin doz bağımlı olarak kanser hücrelerinin sağ kalımı üzerine etki göstermektedir. Gemcitabin ayrıca diğer antikanser ilaçlarıyla kombine olarak kullanılabilir. Pankreatik kanserlerin tedavisi gibi pek çok kanser tedavisinde cisplatin ile kombine edilerek tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Caio vd 2007). Gemcitabin akciğer kanseri tedavisinde 1250 mg/m<sup>2</sup> dozunda hastaya verilmektedir.

Bizde bu çalışmamızda altılı plaklarda pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerine 1000-500-250-125-62-32-31-16 µg/mL dozlarında gempitabin uygulayarak hücre sağ kalımı üzerine etkisi olup olmadığını amaçladık. Sonuçlarımıza göre mutant EGFR eksprese eden hücrelerde doz bağımlı olarak gempitabin hücre sağ kalımı üzerine negatif bir etki göstermektedir. Yine elde edilen sonuçlar ışığında wt EGFR eksprese eden HEK 293 hücrelerinde gempitabin hücre sağ kalımı üzerine herhangi bir negatif etki göstermemektedir. EGFR E746-A750 del mutasyonu eksprese eden hücrelerin anti-EGFR ilaçlara karşı daha duyarlı bir özellik gösterdiği literatürde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Nishio vd 2004). Yine aynı çalışmada EGFR E746-A750 del mutasyonuna sahip PC 9 hücrelerinin ZD6474 ve gefinitibe karşı duyarlılığında artış olduğu gösterilmiş olup wt EGFR eksprese eden hücrelerde ZD6474' ün büyümeyi baskılayıcı bir etkisi olduğu gösterilmiştir.

Transfeksiyon sonucu olarak tekrar yaratılan EGFR ifadesinin HEK 293 hücrelerinin invazyonuna etkisine bakıldığında elde edilen sonuç bize EGFR E746-A750 del ve L858R mutasyonlarını eksprese eden hücrelerin invazyon yapabilme yeteneği kazandığını göstermektedir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.4). Sonuçlarımıza göre pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR transfekte edilen HEK 293 hücrelerinde invazyon yapabilme etkisi anlamlı bulunmamıştır. EGFR' in aşırı ekspresyonu pek çok kanser türünde invazyon, metastaz ve proliferasyon gibi çeşitli hücreler olaylarda rol oynamaktadır. *EGFR* geninde meydana gelen mutasyonlar EGFR aktivitesini arttırdığı bunun da sonucu olarak hücrelerin invazyon yeteneklerinde bir artış olduğu görülmektedir. İnvazyon deneyi sonucunda elde ettiğimiz veriler literatürde daha önce yapılan çalışmalarla paralel yönde bulunmuştur (Xu vd 2010, Cai vd 2009).

Biz çalışmamızda E746-A750 del ve L858R EGFR mutasyonlarının, HEK 293 hücre dizisi üzerinde sağ kalımı, gempitabin uygulaması ardından hücre sağ kalımı ve invazyon yeteneği üzerine olan etkilerini gösterdik (Şekil 4.4, Şekil 4.6). Mutant EGFR eksprese eden HEK 293 hücrelerinin invazyon yapabilme yeteneği kazandığını ve sağ kalım oranının arttığını gözlemledik. Gempitabin uygulamasının ardından elde edilen sağ kalım oranı ise mutant EGFR eksprese eden hücrelerde wt EGFR eksprese eden HEK 293 hücrelere kıyasla daha düşük saptanmıştır. Bu sonuçlar E746-A750 del ve

L858R EGFR mutasyonlarının, kanser gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir.



## 6. SONUÇ

Bu çalışmada HEK 293 hücrelerine pzip EGFRVIII, pc DNA 3.1 EGFR E746-A750, pc DNA 3.1 EGFR L858R, pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiştir. Ardından hücrelerdeki EGFR ifadesi Western Blot yöntemi ile gösterilmiştir.

pc DNA 3.1 EGFR E746-A750 ve pc DNA 3.1 EGFR L858R ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinin invazyon yeteneğinde pcDNA 3.1 ve pcDNA 3.1 wt EGFR ekspresyon vektörleri transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerine oranla belirgin bir fark olduğu saptanmıştır. Bu sonuç bize mutant EGFR eksprese eden HEK 293 hücrelerinin invazyon yeteneği kazandığını göstermektedir. Yaptığımız bu çalışma literatürde bu konu üzerine yapılan ilk çalışmadır.

Tekrar yaratılan EGFR ifadesinin hücre sağ kalımına etkisi olduğu 0. ve 72. Saat verileri kullanılarak ve farklı dozlarda uygulanan gemsitabinin hücre sağ kalımı üzerine etkisinin olup olmadığına bakılarak gözlenmiştir. Mutant EGFR eksprese eden hücrelerin sağ kalım oranı daha yüksek saptanmıştır. Ayrıca gemsitabin uygulamasının ardından hücre sağ kalımı incelendiğinde mutant EGFR eksprese eden hücrelerin anti-EGFR ilaçlara karşı duyarlılığının fazla olmasının sonucu olarak wt EGFR eksprese eden hücrelerin sağ kalım oranı daha yüksek miktarda saptanmıştır.

Kanser gelişiminde *EGFR* geninde meydana gelen genetik değişimler önemli rol oynamaktadır. Bu gende meydana gelen genetik değişimler kanserin daha agresif olmasına neden olabilmektedir. *EGFR* geninde meydana gelen genetik değişimlerin kanser gelişiminde nasıl rol oynadığını saptamak amacıyla yapılacak çalışmaların artması sonucunda üretilebilecek tedavi stratejilerinin kanser gelişimini erken evrede yavaşlatılması ya da durdurulması aşamasında önemli katkıları olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abbas, A. K, A.H. Lichtman, J.S. Pober. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia; 2003.
- Abraham J., Allegra C. J. and Gulley J. (2009) Klinik Onkoloji El Kitabı, Cem Parlak ve Alpaslan Mayadağı, *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 35s.
- Akca H., Tani M., Hishida T, Matsumoto T, Yokota J. (2006) Activation of the AKT and STAT 3 pathways and prolonged survival by a mutant EGFR in human lung cancer cells. *Lung Cancer* 54,25-33.
- Alberts B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., *The molecular biology of the cell*, 2002, Third Edition, Garland Publishing Inc.,New York&London
- Alroy I., Yarden Y: The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997;410: 83–86.
- Arao T., Fukumoto H, Takeda M, Tamura T, Saijo N, Nishio K. (2004). Small in-frame deletion in the EGFR as a target for ZD6474. *Cancer Res* 64: 9101–9104.
- Bogenrieder T. and Herlyn M. (2003) Axis of Evil: Molecular Mechanisms of Cancer Metastasis. *Oncogene*, 22: 6524–6536.
- Burgess A.W., Cho H.S., Eigenbrot C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.(2003), An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell* 12, 541–552.
- C Q Cai, Y Peng, M T Buckley., J Wei, F Chen, L Liebes, W L Gerald, M R Pincus, I Osman & P Lee(2007) . Epidermal growth factor receptor activation in prostate cancer by three novel missense mutations, *Oncogene* 27, 3201–3210
- Cappuzzo F. Predictive factors for response and for resistance to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007;2(5 Suppl): p. 12-14.
- Castaneda CA., Cortes-Funes H., Gomez HL, Ciruelos EM (2010). PI3K/Akt signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 29(4): 751-9
- Chang H., Riese D.J., Gilbert W., Stern D.F. & McMahan, U.J. (1997) Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*, 387, 509±512
- Ciardello F., De Vita, F., Orditura M., Tortora G., 2004, The role of inhibitors in nonsmall cell lung cancer, *Lippincott Williams&Wilkins*, 16: 130- 135, 5 p.
- Cohen S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 237, 1555-1562.

- Cooper M., 1997, *The cell, a molecular approach*, ASM Press Washington ,D.C.
- Das M., (1982). Epidermal growth factor: mechanism of action. *Int. Rev. Cytol.*, 78, 233-256.
- Demirağ F., Atalay EÖ, CrissWE; Analysis of K-ras Oncogene Codon-12 Mutations; *Tr J Medical Sciences*, 30: 129-134, 2000.
- Demuth T. and Berens M. E. (2004) Molecular Mechanisms of Glioma Cell Migration and Invasion. *Journal of Neuro-Oncology* 70: 217–228.
- Engelman J. A., Luo J. and Cantley L. C. (2006) The Volution of Phosphatidylinositol 3-Kinases as Regulators of Growth and Metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 7: 606-619
- Ferguson K.M., Berger M.B., Mendrola J.M., Cho H.S., Leahy, D.J., and M.A. (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* 11, 507–517.
- Goustin A.S., Leof, E.B., Shipley G. D., Moses H. K., 1986, Growth Factors and Cancer, *Cancer Research*, 46: 4015-1029, 14 p.
- Gözü O (2001), Akciger Kanserde Etiyoloji. *Akciger Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel Uygulamalar (1. basım)*, sayfa:47-49 Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Sti. Yayınları
- Grenle, R.T., Murray T., Bolden S., Wingo P.A., 2000, Cancer statistics 2000.CA, *Cancer J.Clin.*, 50, 7-33 p.
- Gschwind A., Fischer O.M., Ullrich A., 2004, The discovery of receptor tyrosine kinaes: targets for cancer therapy, *Nature*, 4: 361-370, 9 p.
- Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer*. 2002 Mar 1;94(5):1593–611.
- Iwasaki A., Kuwahara M., Yoshinaga Y., Shirakusa T. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels, as prognostic indicators in NSCLC. *European Journal of Cardio-Thoractic Surgery*; 25: 443-448 (2004).
- Jiang B. H. and Liu L. Z. (2008) PI3K/PTEN Signaling in Tumorigenesis and Angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784:150–158.
- Jin H. and Varner J. (2004), Integrins: roles in cancer development and as treatment target. *British journal of cancer* 90(3): 561-5.
- Jorissen R.N., Walker F., Pouliot N., Garrett, T.P.J., Ward, C.W., Burgess, A.W., 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* 284, 31–53.

- Kaneko T. and Okubo T.,1986, Smoking and lung diseases. *Kokyu to junkan*, 34(12): 1248-58
- Kligerman S. and White C (2011) Epidemiology of lung cancer in women: risk factors, survival and screening. *American Journal of Roentgenology*, 196: 287-295
- Kolch W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* 351, 289–305.
- Köktürk N., Kırışlıoğlu C.E., Öztürk C., 2003, *Akciğer kanseri moleküler biyolojisi*, Solunum,5,3,127-238p
- Krause M. and Baumann M. (2004) Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanism, precilical and clinical results. *Radiotherapy and Oncology*, 72(3): 257-66
- Kufe, Pollock, Weichselbaum, Bast, Gansler, Holland, Frei, 2003, *Cancer Medicine 6*.
- Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.L., Robbins *Temel Patoloji*, 2003, (Çev: Çevikbaş U.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 172-195 s.
- Lodish Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E, 2000; *Molecular Cell Biology*, Fourth Edition.
- Lynch TJ., Bell DW., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto RA., Brannigan BW., Harris PL., Haserlat SM., Supko JG., Haluska FG., Louis DN., Christiani DC., Settleman J., Haber DA (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129–2139
- Martin P., Kelly C.M.A., Carney, D., 2006, Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Agents for Lung Cancer, *Cancer Control*, 13(2): 129-140, 11 p.
- Merlo LM., Pepper JW., Reid BJ.,(2006). Cancer as an evolutionary and ecological process (Evrimsel ve ekolojik bir süreç olarak kanser). *Nat Rev Cancer*, 6: 924-935.
- Miller VA. *EGFR mutations and EGFR tyrosine kinase inhibition in non-small cell lung cancer*. *Semin Oncol Nurs*. 2008;24(1): p. 27-33.
- Murphy PM: Chemokines and the molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*; 345: 833 (2001).
- Morabia A, Wynder EL. Cigarette smoking and lung cancer cell types. *Cancer*; 21: 754-768 (1970)
- Nair P., 2005, Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression, *Current Science*, 88: 890-898, 8 p.

- Nakamura H., Saaji H., Ogata A., Hosaka M., Hagiwara M., Kawasaki N., Kato H., 2003, Correlation between encoded protein overexpression and copy number of the HER2 gene with survival in non-small cell lung cancer, *Journal Cancer*, 103: 61-66 44.
- Nave K.A., Probstmeier R., Ssachner M: Epidermal Growth Factor does not Cross the Blood - Brain Barrier, *The Journal of Investigative Dermatology*. 94 (5) 624-62 (1985)
- Newcomb PA and Carbone PP. (1992), The health consequences of smoking. *The medical clinics of North America*, 76(2): 305-31
- Normanno N., Bianco, C., De Luca, A., and Salomon, D. (2001). The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front. Biosci.* 6, D685–D707.
- Nugent MN, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. *IJBCB*; 32 :115-120 (2000).
- Nussbaum R. L, McInnes, R., R., Willard, H., F., *Thompson&Thompson Tibbi Genetik*, 2005, Güneş Kitabevi, 312-313p.
- Pateras I.S., Apostolopoulou K., Koutsami M., et al., 2006, Downregulation of the KIP family members p27 and p57 by SKP2 and the role of methylation in p57 inactivation non small cell lung cancer, *International Journal of Cancer*, 119, 11, 2546-2556 p.
- Pines G., Köstler WJ, and Yarden Y (2010). Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett* 584, 2699–2706.
- Pratt R. M. 1987. Role of epidermal growth factor in embryonic development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 22: 175-192.
- Roskoski Jr R (2004) The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1–11
- Sahai E. (2005) Mechanisms of Cancer Cell Invasion. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15: 87–96.
- Salomon DS., Brandt R., Ciardiello F et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995 Jul;19(3):183–232
- Shigematsu H., Lin L., Takahashi T., Nomura M., Suzuki M., Wistuba I.I., Fong K.M., Lee H., Toyooka S., Shimizu N, et al. (2005a). Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 339–346.

- Shukla S., MacLennan G. T., Hartman D. J., Fu P., Resnick M. I. and Gupta S. (2007) Activation of PI3K-Akt Signaling Pathway Promotes Prostate Cancer Cell Invasion. *Int. J. Cancer*, 121:1424–1432.
- Seiji Y, Yasuhiko N, Hisatsugu G, Saburo S. Molecular mechanisms of angiogenesis in non-small cell lung cancer and therapeutics targeting related molecules. *Cancer Sci* June. Vol. 94 no.6 479-485 (2003).
- Sporn M. B., A. B. Roberts, L. M. Wakefield, and B. De Crombrughe. 1987. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-P. *J. Cell Biol.* 105:1039-1045.
- Strachan, Tom; Read, Andrew P; 1999, *Human Molecular Genetics 2*, Garland Science
- T. Kosaka, Y. Yatabe, H. Endoh et al., “Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with nonsmall cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib,” *Clinical Cancer Research*, vol. 12, no. 19, pp. 5764–5769, 2006.
- Tokumo M., Toyooka S., Kiura K., et al: The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 11: 1167-1173, 2005
- Vert, V., Kenneth, W. K., 2004, Cancer genes and the pathways they control, *Nature Medicine*, 10, 789-799p.
- Voldborg BR., Damstrup L., Spang-Thomsen M., et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol.* 1997 Dec;8(12):1197–206.
- Yarden Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer*, 37(Suppl. 4), S3–8.
- Yoshida K., Yatabe Y., Park JY., et al. Prospective validation for prediction of gefitinib sensitivity by epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007;2:22-28.
- Xu L., Nilsson MB., Sintigny P., Cascone T., Herynh MH., Du Z., Nikolinakos PG., Yang Y., Prudkin L., Liu D., Lee JJ., Johnson FM., Wong K-K., Girard L., Gazdar AF., Minna JD., Kurie JM., Wistuba II and Heymach JD (2010). Epidermal growth factor regulates MET levels and invasiveness through hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 29,2616-2627
- William S., K., Cummings M., R., *Genetik Kavramlar*, 2000, (Çev.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara, 635-636p

Web 1: <http://www.who.it>

Web2: <http://www.celalkarlikaya.trakya.edu.tr/accaders.htm>

Web3:<http://www.elsevierimages.com>

## ÖZGEÇMİŞ

Onur TOKGÜN 1985 yılında Şişli' de doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2005-2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2009 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.