



**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSER HÜCRE DİZİSİ
ÜZERİNDE PTEN TÜMÖR BASKILAYICI GENİNİN İNVAZYON,
PROLİFERASYON VE APOPTOZ ÜZERİNDEKİ OLASI
ETKİLERİNİN MEKANİZMALARI İLE ARAŞTIRILMASI**

Aydın DEMİRAY

**Temmuz 2009
DENİZLİ**

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSER HÜCRE DİZİSİ
PC 14 ÜZERİNDE PTEN TÜMÖR BASKILAYICI GENİNİN
İNVAZYON, PROLİFERASYON VE APOPTOZ ÜZERİNDEKİ OLASI
ETKİLERİNİN MEKANİZMALARI İLE ARAŞTIRILMASI**

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

Aydın DEMİRAY

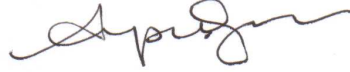
Danışman: Doç. Dr. Hakan AKÇA

**TEMMUZ 2009
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Aydın DEMİRAY tarafından, Doç. Dr. Hakan AKÇA yönetiminde hazırlanan **“Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Dizisi Üzerinde Pten Tümör Baskılayıcı Genin İnvazyon, Proliferasyon Ve Apoptozis Üzerindeki Olası Etkilerinin Mekanizmaları İle Araştırılması”** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

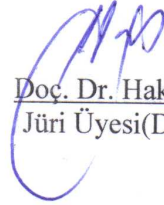
Prof. Dr. Ayşe ÖZER
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Üyesi




Doç. Dr. Hakan AKÇA
Jüri Üyesi (Danışman)



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
ve 09/14-4 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

18.08.2023 tarih

Doç. Dr. A. Ceylan TUFAN
Müdür

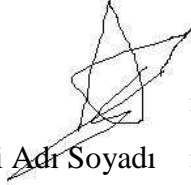


TEŐEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren değerli tez danışman hocam Doç. Dr. Hakan AKÇA'ya teőekkür ederim. Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgilerini benden esirgemeyen başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Gülseren BAĞCI ve tüm bölüm hocalarıma teőekkürü borç bilirim. Hayatımın her daima yanında olan anneme ve bundan sonra yanımda bulunacak olan değerli eşime de 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 : Aydın DEMİRAY

ÖZET

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSER HÜCRE DİZİSİ PC 14 ÜZERİNDE PTEN TÜRÖR BASKILAYICI GENİNİN İNVAZYON, PROLİFERASYON VE APOPTOZ ÜZERİNDEKİ OLASI ETKİLERİNİN MEKANİZMALARI İLE ARAŞTIRILMASI

Demiray, Aydın
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji ABD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Hakan AKÇA

Temmuz 2009, 59 sayfa

İnsan karsinogenezinin çok adımlı bir oluşum olduğu ve kanser gelişimi süresince meydana gelen fenotipik değişikliklerin hücre içindeki genetik değişiklik birikimlerinin yansıması olduğu günümüzde yaygın olarak kabul edilir. Böylece kanser hücrelerindeki metastatik fenotiplerin kazanılma süreçlerini anlamak için kanser hücrelerinin metastatik fenotipleri ile ilişkili olan ve kanser gelişimi süresince değişikliklerinin çoğaldığı gözlenen genlerin tanımlanması zaruridir. Bu sebeple araştırmacılar, metastatik kanser hücrelerinde prenatal değişmiş ve kanser hücrelerinin metastatik potansiyellerini düzenleme aktivitesine sahip genleri araştırmaktadırlar. Akciğer kanserinde PTEN/MMAC1 geni sık olarak inaktiftir. Bununla beraber bu genin akciğer kanser hücrelerinin metastatik potansiyellerinin düzenlenmesine karışıp karışmadığı hala açık değildir. Bu literatür bilgilerine rağmen henüz akciğer kanser metastazını kontrol eden bir gen bulunamamıştır. Bu çalışma da yeniden yaratılan PTEN wt ekspresyonun küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre dizisi PC14 hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozisi üzerine herhangi bir etkisi olmamasına rağmen hücre invazyonunu PI3K-AKT yolağını inhibe ederek kontrole göre %67±3.2 (p<0.001) oranında baskıladığı açıkça gösterilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, PTEN, İnvazyon

ABSTRACT

A STUDY ON THE PTEN TUMOR SUPPRESSOR GENE POTENTIAL EFFECTS OF NON SMALL CELL LUNG CANCER CELL PC 14 CELL PROLIFERATION, INVASION AND APOPTOSIS WITH POTENTIAL MECHANISMS

Demiray, Aydın
M. Sc. Thesis in medical biology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan AKÇA

July 2009, 59 page

It is now widely accepted that human carcinogenesis is a multi-step process and phenotypic changes during cancer progression reflect the sequential accumulation of genetic alteration in cells. Thus, in order to understand the process of acquisition of metastatic phenotypes in cancer cells, it is indispensable to identify genes whose alterations accumulate during cancer progression and correlate with metastatic phenotypes of cancer cells. For this reason researchers have been searching for genes that are pregenetically altered in metastatic cancer cells and have activities to regulate their metastatic potentials. In lung cancer PTEN/MMAC1 gene is frequently inactivated. However, it still remains unclear whether this gene is involved in the regulation of metastatic potential in lung cancer cells. In spite of above knowledge we do not know any gene which can control lung cancer metastasis. In this study it is clearly shown that although recreated PTEN wt expression suppresses non small lung cancer cell lines on PC14 cells invasion at % 67 ± 3.2 though PI3K-AKT pathway, has no effects on proliferation and apoptosis when compared with control cells.

Key Words: Lung cancer, PTEN, invasion

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İçindekiler	vi
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini.....	viii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	ix
1. GİRİŞ.....	1
2.KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI.....	6
2.1. Akciğer Kanserleri.....	6
2.2. İnvazyon ve Metastaz	9
2.3. Apoptozis	11
2.4. PI3kinaz/AKT/PTEN Yolağı	14
2.4.1. PI3K.....	14
2.4.2. AKT.....	17
2.4.3. PTEN.....	22
3. MATERYAL ve METOD.....	27
3.1. Hücreler ve Hücre Kültürü.....	27
3.2. Transformasyon.....	28
3.3. Plazmid İzolasyonu	28
3.4. Agaroz Jel Hazırlanması.....	29
3.5. Plazmidlerin Kalıcı Transfeksiyon Yöntemi ile PC 14 Hücrelerine Aktarılması.....	30
3.6. Bradford Yöntemi ile Protein Konsatrasyonun Saptanması.....	31
3.7. SDS-PAGE ve Western Blot.....	32
3.8. Proliferasyonun Saptanması	33
3.9. Apoptozisin Belirlenmesi	34
3.10. İnvazyonun Saptanması	35
3.11. Odak Testi (Koloni Formasyonu).....	36
3.12. Verilerin Değerlendirilmesi.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Transfekte Hücrelerin Seçilimi.....	37
4.2. Transfekte Hücrelerde PTEN İfadesinin Gösterilmesi	39
4.3. Tekrar Yaratılan PTEN İfadesinin Hücre İnvazyonuna Etkisi.....	41
4.4. PTEN İfadesinin Proliferasyona Etkisi.....	43
4.5. PTEN İfadesinin Apoptozis Üzerine Etkisi	46
4.6. PTEN İfadesinin Koloni Formasyonu Üzerine Etkisi	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	54
7. KAYNAKÇA	55
8. ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Bağırsak adenomunun kanser hücreğine dönüşün süreci	2
Şekil 2.1 Fas reseptör aracılığı ile apoptozisin uyarılması	12
Şekil 2.2 Apoptozun mitokondriden sitokrom c salınımı ile aktive edilmesi	13
Şekil 2.3 PI3 kinaz, fosfoinositol (4,5) di fosfatı fosfarlayarak fosfoinositol (3,4,5) Tri fosfata dönüştürür.	14
Şekil 2.4 PI3K sınıf 1A'nın aktifleşme mekanizması	16
Şekil 2.5 Sınıf 1B'nin aktifleşme mekanizması	16
Şekil 2.6 Akt fosforillenmesi	18
Şekil 2.7 Akt izoformlarının fosforlanma bölgeleri	18
Şekil 2.8 Fosfoinositol 3 fosfat kinaz/Akt yolağı	21
Şekil 2.9 PTEN Gen Yapısı	23
Şekil 2.10 PTEN protein yapısı ve bağlanma bölgeleri	24
Şekil 2.11. Fosfoinositol 3 fosfatın PI3 kinaz tarafından fosforilasyonu ve PTEN tarafından defosforilizasyonu	25
Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre dizisi PC14'ün genel görüntüsü	27
Şekil 3.2 Plazmid izolasyonundan sonra elde edilen plazmidlerin görüntüsü	30
Şekil 3.3 MTT'nin yaşayan hücrelerde formazan tuzu oluşturması	34
Şekil 3.4 TUNEL testinin çalışma prensibi	34
Şekil 4.1 Boş vektör,PTEN wt, PTENG129R ve PTENG129E kalıcı transfekte edilen PC14 hücrelerinin Blastosidin ve zeosin ile seleksiyonu	38
Şekil 4.2 TETON sisteminin çalışma mekanizması	39
Şekil 4.3 Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücrelerinin PTEN ve GAPDH ekspresyonları	41
Şekil 4.4 Yeniden yaratılan PTEN ekspresyonunun hücre invazyona etkisi	43
Şekil 4.5 PTEN G129R ifadesinin PC 14 hücre proliferasyonuna etkisi	44
Şekil 4.6 PTEN G129E ifadesininPC 14 hücre proliferasyonuna etkisi	45
Şekil 4.7 PTEN wt ifadesinin PC 14 hücre proliferasyonuna etkisi	45
Şekil 4.8 Apoptozise uğrayan PC14 hücreleri kahverengi boyanırken, apoptozise uğramayanlar mavi renkte boyanmaktadırlar	46
Şekil 4.9 Boş vektör, PTENwt, PTEN G129E ve PTEN G129R transfekte edilen PC 14 hücrelerinin 0.-72. saatler arasında apoptotik hücre sayısının normal hücre sayısına oranı	48
Şekil 4.10 Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücrelerinin koloni fotoğrafları	49
Şekil 4.11 Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücrelerinin koloni sayıları.....	49

TABLolar DİZİNİ**Sayfa**

Tablo 2.1 Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde genetik mutasyonlar	.6
Tablo 2.2 Akciğer kanserlerinin DSÖ'nün sınıflandırılması7
Tablo 4.1 Hücre Protein Örneklerinin SDS-PAGE için Hazırlanması40
Tablo 4.2 Hücrelerin Kontrole Oranla Yüzde İnvazyon43
Tablo 4.3 Hücrelerin Büyüme İndüksiyon Oranı44
Tablo 4.4 Hücreleri Yüzde Apoptosis Oranları47
Tablo 4.5 Hücrelerin Oluşturdukları Koloni Sayıları48

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

APC:	Adenomatöz Poliposis Koli
APAF 1:	Apoptotik Aktivatör Faktör 1
C-MET:	Hepotosit Büyüme Faktör Reseptörü
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR:	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FOXO:	Forkhead Transkripsiyon Faktörü
GPCR:	G Protein İlişkili Reseptör
GSK 3:	Glikojen Sentetaz Kinaz 3
HMD 2:	İnsan Double Minute 2 Proteini
IKB:	Nükleer faktör kappa B'nin İnhibitörü
IKK:	Nükleer faktör kappa B'nin inhibitörünün Kinazı
NSCLC:	Küçük Hücreli olmayan Akciğer Kanseri
MMP:	Matriks Metalloproteaz
NF-KB:	Nükleer Faktör Kappa B
PDK:	Fosfoinositol Bağımlı Kinaz
PI3K:	Fosfoinositol 3 Kinaz
PI2P:	Fosfoinositol (4,5) iki fosfat
PI3P:	Fosfoinositol (3,4,5) üç fosfat
PTEN:	10 kromozomdan fosfat ve tensin delesyonlu
RTK:	Reseptör Tirozin Kinaz
SDS-PAGE:	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez
TNFR:	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü

1.GİRİŞ

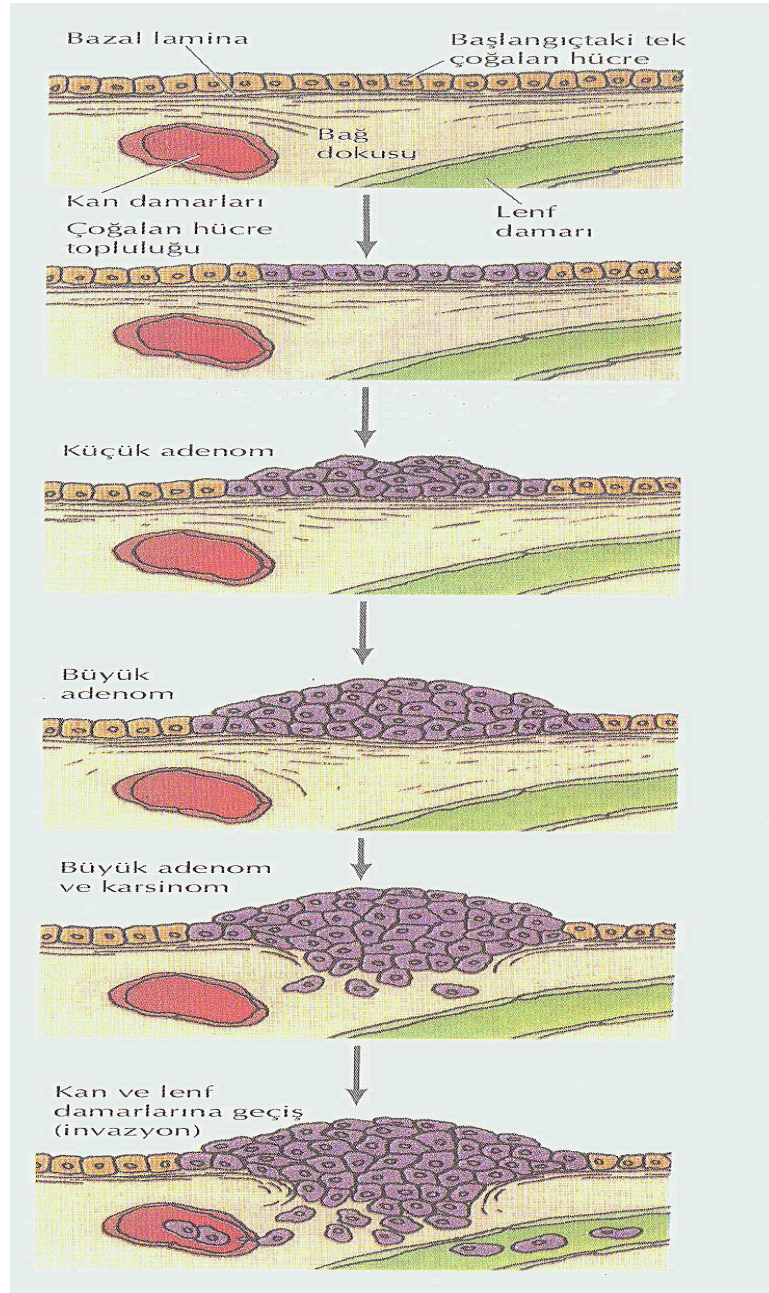
Bilim ve teknolojik gelişmelerin baş döndürücü hızla ilerlediği günümüzde hala bazı konularda aydınlatılamayan noktalar mevcuttur. Bunların başında ise büyük ölüm oranına sahip olan kanser hastalığı gelmektedir. Kanser alanında dünya genelinde birçok araştırmacı geniş bütçelerle çalışmasına rağmen halen cevap bekleyen birçok soru bulunmaktadır.

Kanser üzerine yapılan araştırmalarda elde edilen sonuçlar ışığında, kanserleşen hücrelerin, normal vücut hücrelerine göre birçok değişim geçirdiğini anlayabilmekteyiz. Ancak bu değişimler her kanser tipinde aynı olmadığı gibi aynı kanser tipinin ilerleyen dönemlerinde de farklılık arz etmektedir. Ayrıca aynı kanser tipi insandan insana da farklılık göstermektedir. Dolayısıyla bu durum hastalığın tedavisini oldukça güçleştirmektedir.

Normal hücreden, kanser hücresine dönüşüm için geçen süre karsinogenez olarak adlandırılmaktadır. Bu değişim hücrenin genetik materyalinde meydana gelen mutasyonların birikimi ile oluşur. Hücre döngüsünü kontrol eden genlerde oluşan mutasyon ile hücre sürekli olarak bölünmeye başlar ve bir süre sonra bölünme kontrolünün kaybı sonucu oluşan aşırı çoğalma eğilimi kanser gelişimine zemin hazırlar (Aparicio vd 2007)

Karsinogenezis çok basamaklı bir süreçtir. Bir hücrede meydana gelen genetik mutasyon eğer düzeltilmeden hücre çoğalmaya başlar ve apoptozise uğramaz ise oluşan transforme hücre bölünerek çoğalmaya başlar. Ancak bu çoğalma monoklonal kitle oluşturmaz aksine yeni mutasyonlar ile daha büyük, invaziv yeteneği olan ve uzak yayılım yapabilen hücrelere dönüşür. Örneğin barsak epitel hücresi Adenomatöz poliposis coli (APC) tümör baskılayıcı genin ifadesinin kaybı sonucu epitel hücreler polip oluşturur. Oluşan bu polip bağırsak duvarına yapışık olarak iyi huylu tümör olarak çoğalır. Bu polip daha sonra K-ras geninin aktivasyonu ile kontrolsüz bölünmeye başlar ve geniş bir polip oluşturur ve sınıf II adenom adını alır. Sınıf II adenom kolorektal kanserlerde mutasyonlu (DCC) tümör baskılayıcı genin ifade kaybı ile sınıf III adenom olarak adlandırılır. Bu adenom prekanseröz olarak adlandırılır. Üç mutasyon geçiren

adenom, tümör protein 53 (p53) tümör süpresör gen kaybı ile karsinoma adını alır ve invaziv yetenek kazanır. Bazal laminayı parçalayarak (Albert vd 2007) metastatik etki ile yayılım gerçekleştirir (Şekil 1.1)



Şekil 1.1 Bağırsak adenomunun kanser hüresine dönüşüm süreci (Cooper ve Hausman, 2005)

Kanseri köken aldığı hücre tipine göre üç ana grupta toplayabiliriz. İnsan kanserlerinin çok büyük kısmını oluşturan epitel hücre kaynaklı karsinomlar, kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku kaynaklı sarkomlar ve kan veya immün sistem hücrelerinden kaynaklanan lösemi veya lenfomalar. Ayrıca kanser köken aldığı hücre haricinde oluştuğu hücreye göre de değişiklik göstermektedir. Aynı kanser türü ayrı coğrafyaya,

insan ırklarına, yaşam koşullarına ve beslenme alışkanlıklarına göre de değişiklikler göstermektedir.

Bugün ölüm sebebi olarak kanser, ikinci sırada yer almaktadır (web1, web2). Kanser nedenli ölümlerin başında %30 oranla akciğer kanseri gelmektedir (web3). Kanser vakalarının görülme oranında ise, prostat ve meme kanserlerinden sonra akciğer kanserleri üçüncü sırada yer almaktadır (web3). Akciğer kanserinin beş yıllık sağ kalım oranı ise % 15 olarak bilinmektedir (web4, web5).

Normal hücreler bölünmek için bölünmeyi uyarıcı uyarılara ihtiyaç duyarlar. Bu uyarılar ilgili reseptörlere bağlanarak bölünmeyi uyarır. Kanser hücrelerinde ise böyle bir ajana gerek duymadan ilgili reseptörün mutasyonu veya ikinci mesajcının aktif bölgesinin mutasyonu sürekli hücre bölünmesini uyarır. Buda kanser hücresinin proliferasyonuna ve kontrolsüz bir şekilde bölünmesine neden olmaktadır. Örneğin fosfoinositol 3 kinaz (PI3K) proteinin p110 α katalitik alt ünitesinin birçok kanser türünde mutasyona uğradığı saptanmıştır (Jiang ve Liu 2007). Bu mutasyon PI3K'ın hücrede sürekli aktif olmasına neden olur. Bu durumda PI3K sürekli aktif durumdadır ve bu da hücrenin sürekli olarak bölünmesini indükler (Jiang ve Liu 2007).

Kanser hücreleri, çeşitli etmenlerin proliferasyonu artırıcı etkiler ile bölünme sürecini devam ettirirken bulunduğu organın veya dokunun konumuna göre belli bir kitle halini aldıktan sonra çevre dokulara doğru baskı yapmaya başlar. Önceleri mekanik stres olduğu düşünülen invazyon mekanizmasının bugün böyle olmadığı bilinmektedir. Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ile aktive olan matriks metalloproteaz 7 (MMP-7) ekstraselüler matriks bileşenlerini parçalamaktadır (Liu vd 2007). Bu sayede hücre ekstraselüler matrikste ilerleyebilmektedir. Bu ilerlemesini kendi ekstraselüler matriks bileşenlerine integrin ile tutunarak ve miyozin ile kasılarak gerçekleştirmektedir. Bu da hücreye invazyon yeteneği kazandırmaktadır.

Invazyon yeteneği kazanan hücre aynı zaman da metastatik fenotipe de sahip olabilir. Çünkü tutunmadan yaşayabilen hatta hareket eden hücre aynı zaman da uzak organlara yayılım yapabilir.

Bilindiği gibi birçok kanser tipinde EGFR mutasyona uğramaktadır (Jiang ve Liu 2007). Bu durumda EGFR kendi kendini otofosforillip aktifleşerek hem proliferasyonu hem de invazyonu indükleyebilir.

Elbetteki normal bir hücre belli bir yaşam sürecinden sonra programlı bir şekilde kendini yok etmektedir. Bu süreç apoptozis ya da programlı hücre ölümü olarak bilinmektedir. Bu süreç ile yaşlanmış hücreler ortadan kalkarken genç ve yeni hücreler ile organizma devamını sağlar. Apoptozis hücrenin kendi kendini yok ettiği bir süreçtir. Bu süreç enerji gerektiren belli proteinlerin aktifleşmesi ile başlar. Bu durumun en belirgin özelliği DNA'nın 50-200 baz çifti ve katları şeklinde kesilmesidir. Bu işlem aktif kaspaz ile sağlanmaktadır (Franke vd 2003).

PI3K'ın aktifleştirdiği AKT'nin (protein kinaz B) apoptozisi engellediği bilinmektedir (Song vd 2006). Bu karginogenezis oluşumunda ve sürekliliğinde önemli rol oynamaktadır. Bu şekilde hücreler apoptozisten kurtularak kendilerine büyük bir avantaj elde etmektedirler.

Karsinogenez sadece bir genden sorumlu bir mekanizma olmadığı gibi birçok genin etkisi ile oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu süreçte bir genin mutasyonu, aşırı ifadesi hücre içinde başka yolakların aktiflenmesine neden olmaktadır. Ya da tümör baskılayıcı genler olarak bilinen genlerin, delesyonu, promotor metilasyonu veya mutasyonu ile bu genlerin ifadelerinin ortadan kaybolması karginogenezisi artırıcı etkiye sahip moleküllerin artışına neden olmaktadır. Böylece hücre proliferasyonunu indükleyerek, kontrolsüz büyüyen hücre yeni mutasyonlar geçirerek normalden tamamen farklı bir hücre haline gelir (Jiang ve Liu 2007).

Hücre, genetik mutasyonlar ile metastatik fenotipe sahip olduğunda birçok tümör baskılayıcı proteinleri inaktif olduğu kadar onkogenleri de sürekli aktiftir. Bu da kanser tedavisini zorlaştıran etmenlerdendir. Bu amaçla tümör baskılayıcı genlerin yokluğu yada onkogenlerin aşırı ifade edilmesi evreleme amaçlı olarak kullanılmaktadır. Örneğin tümör baskılayıcı gen olan kromozom 10'dan fosfat ve tensin delesyonlu (PTEN) yokluğu prostat kanserinde gleason skorlamasında 8-10 olarak ifade edilir (Shukla vd 2007), bu durum tümörün en agresif evresi olarak tanımlanmaktadır. Bu da

moleküler temelli çalışmaların kanser evrelemesine yardım etmesi sayesinde tedavi yaklaşımlarını değiştireceğini göstermektedir.

Bu çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre dizisi PC 14 üzerinde PTEN tümör baskılayıcı geninin invazyon, proliferasyon ve apoptoz üzerindeki olası etkilerinin mekanizmaları ile araştırılması planlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Akciğer Kanserleri

Akciğer kanserleri, kanser nedenli ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Akciğer kanseri, olduğu organ sıklığına göre prostat ve meme kanserlerinden sonra gelmektedir (Ohashi vd 2005). Akciğer kanserlerin % 80'i küçük hücreli olmayan akciğer (NSCLC) kanserleridir (Ohashi vd 2007). NSCLC yaklaşık %65'i heterojenite gösterirken, %45'i adeno ve skuamoz tipi ncsclc tipidir (Kandasamy vd 2002). Evre 1 ve 2 olan hastalara cerrahi girişimde bulunulurken, evre 3 hastalarının bazılarında cerrahi girişim, bir kısmına ise radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır (Lim vd 2006). Yinede 3 yıllık yaşam ömrü evre 2 hastaları için %35-50, evre 3 hastaları için ise % 28 iken (Liu vd 2007), 5 yıllık sağ kalım NSCLC hastalarında %15 dir (Tang vd 2006). Yani erken evre hastalarının cerrahi girişim, kemoterapi ve radyoterapi uygulanması ile sağ kalım oranı artmaktadır. Ancak ileri evre hastalarının büyük bir kısmı operasyona alınamamaktadır. Bu durum sağ kalım oranını da etkilemektedir. Ayrıca ileri evre hastaların kemoterapiye ve radyoterapiye olan dirençleri nedeniyle sağ kalım oranı azalmaktadır (Ohashi vd 2007). NSCLC moleküler mekanizmaların tam olarak bilinmemektedir (Tablo 2.1). Ancak diğer kısmının açıklığa kavuşması ile hem ilaç dirençliliğinin düşürülmesine hem de yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine katkısı olacaktır.

Tablo 2.1 Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde genetik mutasyonlar (Abraham vd 2009)

Resesif Onkogen		Baskın Onkogenler	
Rb mutasyonu	%20	ras mutasyonu	%30
P53 mutasyonu	>%50	Her 2/neu aşırı ifadesi	%50
3p delesyonu	>%50	myc aşırı ifadesi	%50
mikrosatellit değişimi	var	bcl-2 aşırı ifadesi	%50
		telomeraz ifadesi	%90

Akciğer parankimi veya solunum yollarından kaynaklanan tümörler akciğer kanserlerini oluşturur. Akciğer kanserlerinin histopatolojik sınıflandırılması Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) önerisine göre yapılmaktadır. Buna göre temel olarak akciğer

kanserleri küçük hücreli akciğer kanserleri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri (NSCLC) olarak iki gruba ayrılır. Bu iki grup tüm akciğer kanserlerinin %95'ini teşkil eder. Geri kalan %5'lik oran akciğerlerden kaynaklanan diğer tümörlerdir (Bireroğlu 1994), (Tablo 2.2)

Tablo 2.2 Akciğer kanserlerinin DSÖ'nün sınıflandırılması (Abraham vd 2009)

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

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

Evre1A; En geniş çapı <3 cm, akciğer veya viseral plevra ile çevrili, lob borunu proksimaline invazyon yapmamış tümörler.

Evre1B; En geniş çapı >3cm ana bronşa invaze ancak kareneya invaze olmayan tümörler

Evre IIA; En geniş çapı <3 cm, akciğer veya viseral plevra ile çevrili ve hiler veya intrapulmoner lenf nodu metastazı yapmış tümörler

Evre IIB; En geniş çapı >3cm ana bronşa invaze ve hiler veya intrapulmoner lenf nodu metastazı yapmış tümörler

Evre IIIA; Herhangi büyüklükte olup, mediastene direk invaze olan ve hiler veya intrapulmoner lenf nodu metastazı yapmış tümörler

Evre IIIB; Herhangi büyüklükte olup, mediastene direk invaze ve aynı taraf medastinal, hiler veya karşı taraf supraklaviküler lenf bezi metastazı

Evre IV; Herhangi büyüklükte tümör ve uzak metastaz

Akciğer kanserlerinde tedavi, kanserin evre ve tipine göre değişir. Buna göre evre I, II cerrahi girişime uygun iken bazı evre IIIA hastaları cerrahi girişime uygundur. Diğer evre IIIB ve IV hastaları yayılımın yaygın olması nedeniyle cerrahi girişimde bulunulamamaktadır. Bütün hastalara radyoterapi ve kemoterapi uygulanabilmektedir (Abraham vd 2009).

2.2 İNVAZYON ve METASTAZ

Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümeleri devam ederken buldukları dokuda diğer dokuları itmeye başlarlar. Bu süreçte mutasyonlar da devam etmektedir. Çok önceleri geleneksel görüş içerisinde bu baskıya maruz kalan dokunun daha sonra tümörün büyümesi ile invazyonun gerçekleştiği varsayılmıştır. Ancak bugün bu görüş geçerli değildir. Kontrolsüz bölünen kanser hücreleri 4 basamakta invazyon ve metastazı gerçekleştirmektedir (Sahai 2005).

Kanser hücrelerinde yapılan araştırma da kadherin ailesinden E kadherinin ifadesinin azaldığı ve N kadherinin ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Bogenrieder ve Herlyn 2003). E kadherin ifadesinden yoksun olan kanser hücresi, bazal laminaya $\alpha 5\beta 3$ integrin proteini ile fibronektin aracılığıyla tutunmaktadır (Demuth ve Berens 2003). Bu tutunma hareketi sabit olmayıp, hücre hareketliliği kazanmış olan kanser hücresi amoboid hareket yapmaktadır. Bu hareketliliği aktin proteininin yeniden organize olarak yalancı ayak oluşumu, fillipoda oluşumu ve lamellipoda oluşumları ile sağlanarak sitoplazma, miyozin kasılmaları ile kasılıp gevşeyerek 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.

Ekstraselüler matrikste bulunan kanser hücresi damar endoteline ulaştığında tümör ilişkili makrofaj (tumor associated macrophage) ile arasında parakrin bir ilişki oluşur. Tümör ilişkili makrofaj epidermal büyüme faktörü salgılayarak 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 ilmik oluşumu ile hücre endotelden damar içine ekstravaze olur.

Damar içine ekstravasyon yapan tümör hücresi, alt ana toplar damar da 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 yayılım yapar (Sahai 2005).

Tüm bu süreç tümör hücresinin uğradığı mutasyonlara bağlı olduğu kadar bulunduğu ortamda varolan mikro çevre ile de ilişkilidir. Ortamda plazminin varlığının invazyon yapma yeteneğini artırdığı yapılan deneylerde gösterilmiştir (Bogenrieder and Herlyn 2003).

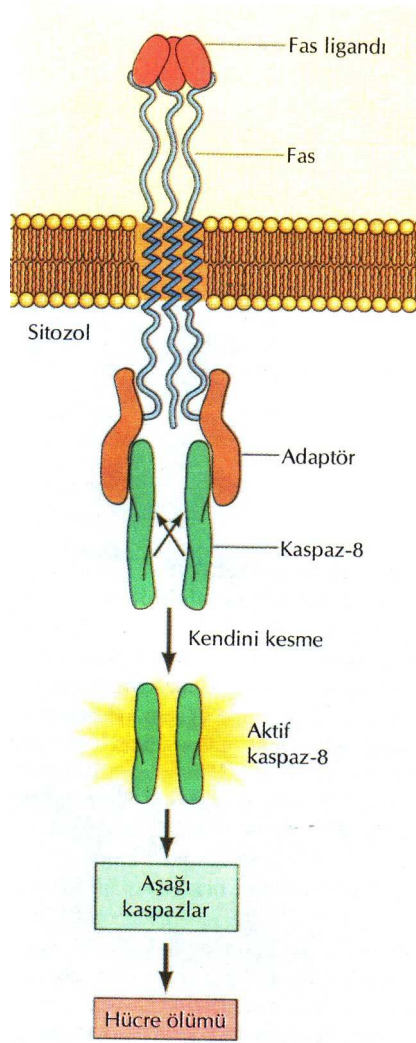
2.3 APOPTOZİS

Apoptozis, Latince kelime anlamı olarak sonbaharda yere düşen yaprağı tanımlar. Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis sürecinde hücre zarı cepçikler (bleb) yapar, DNA kromatinler deşragasyona uğrar ve kondanse olur. Hücre küçük cisimciklere ayrılır ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek yok edilir.

Apoptotik süreçte iki protein ailesi rol alır. Bunlarda biri Bcl-2 ailesi diğeri ise kaspazlardır. Bcl-2 ailesi, zıt etkili iki gruptan oluşur. Birinci grup apoptotik süreci indüklerken diğeri baskılamaktadır. Apoptotik indükleyici grup bax, bcl-Xs, Bad, Bak ve Bid baskılayıcı grup ise bcl-2 ve bcl-XL üyelerinden oluşur. Normal bir hücrede bu iki grup arasında bir denge mevcuttur. Eğer indükleyiciler de artış olursa hücre apoptoza gider baskılayıcılar da artış olursa hücre yaşamaya devam eder.

Apoptozda yer alan proteazlar ise kaspazlardır. Kaspazlar, zimojen olarak sitoplazmada bulunan aktif merkezde sisteinlerin yer aldığı proteazlardır. Kaspazlar, başlatıcı kaspazlar 2, 8, 9, 10 ve efektör kaspazlar 3, 6, 7 olmak üzere iki gruba ayrılır (Franke vd 2003).

Hücrede apoptozis, dış (ekstrinsik) yolaklar ve iç yolaklar (intrinsik) olarak bilinen iki yolla indüklenir. Dış yolaklar aracılığıyla apoptozun aktivasyonunda örneğın, tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ailesinden olan Fas reseptör ligandına (FasL), Fa bağlandıktan sonra reseptör membranda dimerize olur ve aktifleşir. Böylece reseptörün stoplazmik kısmında yer alan bölgelerine prokaspaz 8 bağlanır. Prokaspaz 8'in kendi kendini kesmesi ile aktifleşen kaspaz 8, prokaspaz 3'ü keserek aktifleştirir ve böylece kaspaz kaskatı oluşturarak (Şekil 2.1) hücreyi apoptozise uğratar (Song vd 2006).

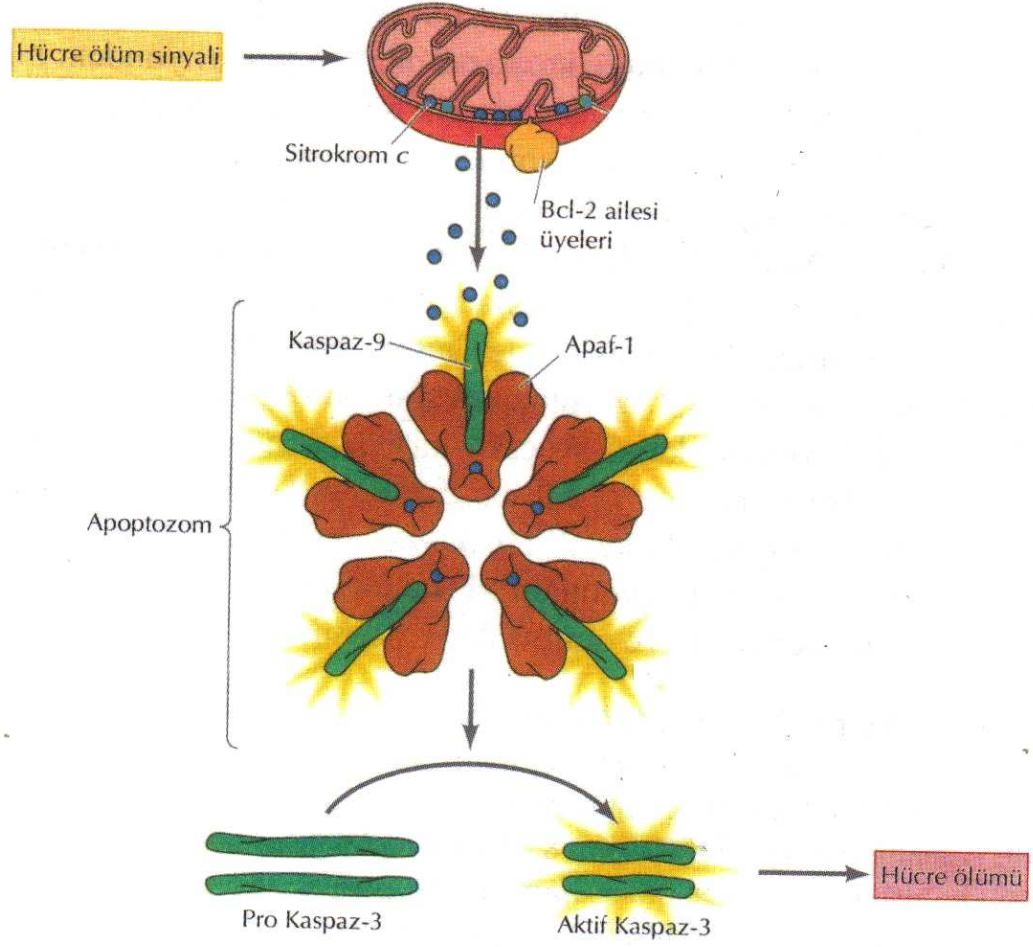


Şekil 2.1 Fas reseptör aracılığı ile apoptozisin uyarılması (Cooper ve Hausman 2006)

İç yolakta ise Bcl-2 ailesi proteinlerinin proapoptotik üyelerinin artışı veya p53'ün aktivitesi ile mitokondriden sitokrom c çıkışı sonucu apoptotik aktivatör faktör 1 peptidaz (Apaf-1) aktif hale gelir. Aktif Apaf-1, prokaspaz-9'u aktif kaspaz 9 haline getirir. Aktif kaspaz 9, prokaspaz 3'ü aktifleştirerek kaspaz kaskatının oluşmasına (Şekil 2.2) dolayısıyla apoptozise neden olur (Song vd 2006).

Apoptozis sürecinde Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadelerinin artışı ya da azalışı önemlidir. Ayrıca Bad proapoptotik molekülü fosforlandığında diğer bad moleküllerine bağlanarak mitokondri zarında bad/bcl-2 heterodimer yapısına katılamamakta ve hücre apoptozise

uğrayamamaktadır. Birçok kanser türünde fosforlanmış bad miktarında artış olmaktadır.
(Web 6)

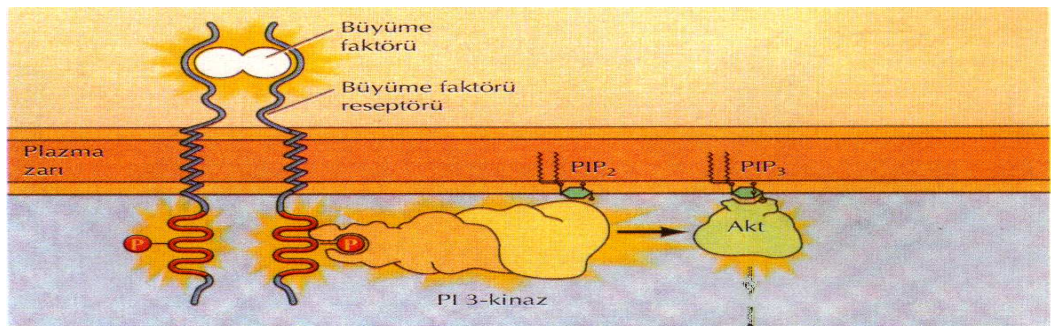


Şekil 2.2 Apoptozun mitokondriden sitokrom c salınımı ile aktive edilmesi (Cooper ve Hausman 2006)

2.4 PI3K/AKT/PTEN Yolağı

2.4.1 PI3K

Fosfoinositol 3 kinaz (PI3K), hücre içi lipid kinazdır (Chen vd 2009). PI3K, katalitik ve düzenleyici olmak üzere iki alt üniteden oluşan heterodimer bir proteindir (Shukla vd 2007). PI3K hücre zarında yer almaktadır (Shukla vd 2007). PI3K, büyüme faktörünün bağlandığı tirozin kinaz reseptörleri veya diğer tirozin kinazlar tarafından aktifleşir (Jing ve Liu 2008). Aktif PI3K, Fosfoinositol (4,5) di fosfat'ın (PI2P), inositol halkasını 3' ucundan fosfatlayarak fosfoinositol 3,4,5 tri fosfat oluşur (PI3P) (Engelman vd 2006) (Şekil 2.3). PI3 fosfat, fosfoinositol bağımlı protein kinaz 1 ve 2'yi (PDK1 ve 2) aktifleştirerek, protein kinaz B/ Akt'yi treonin 308. ve serin 473.'den fosfatlar. Bu sayede hücrenin yaşamsal olaylarını kontrol eden Akt'nin aktifleşmesinde rol alır (Shukla vd 2007). Hücreler, PI3K'ın 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'ın katalitik alt ünitesi aşırı ifade edilmektedir, bununla birlikte PI3K'ın 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 bağılı olarak hücrede sürekli aktif olarak bulunur (Jing ve Liu 2008).



Şekil 2.3 PI3 kinaz, fosfoinositol (4,5) di fosfatı fosfarlayarak fosfoinositol (3,4,5) tri fosfata dönüştürür ve Akt aktivasyonuna aracılık eder.

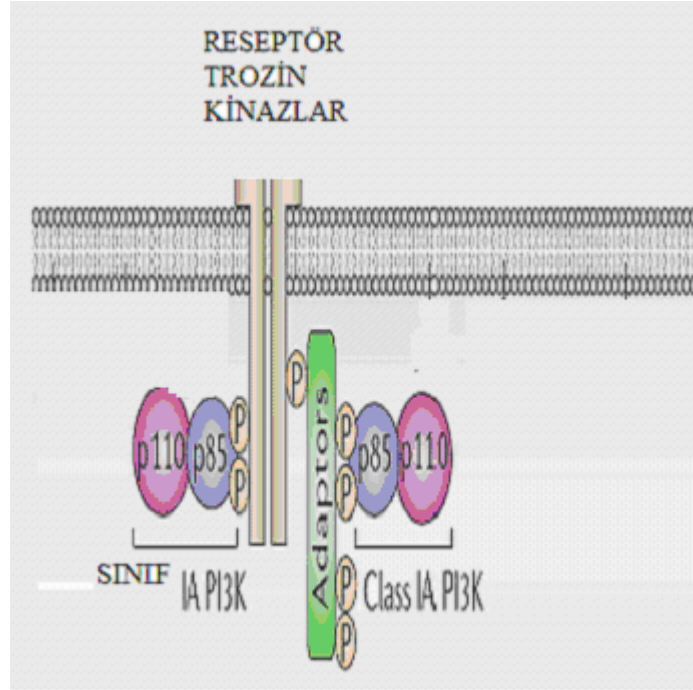
PI3K'lar sınıf 1, 2 ve 3 olmak üzere üç sınıftır. Sınıf 1 kendi arasında sınıf 1A ve 1B olmak üzere kendi içerisinde ikiye ayrılır. Sınıf 1A PI3K'lar reseptör tirozin kinazlar (RTKs) tarafından aktifleştirir. Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), trombosit

büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), fibroblast büyüme faktör reseptörü (FGFR), insülin benzeri büyüme faktör 1 reseptörü (IGF-1R), interlökin reseptörleri, vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü (VEGFR), interferon reseptörü ve integrin reseptörünün üyesi olduğu RTK'lar büyük bir reseptör ailesidir (Jing ve Liu 2008). Sınıf 1A p110 katalitik alt ünite ve p85 regülasyonunu sağlayan alt ünite olmak üzere 2 alt üniteden oluşur (Jing ve Liu 2008). p110 katalitik alt ünite heterodimer yapıdadır. p100 katalitik alt ünitenin 3 izoformu bulunmaktadır. Bunlar p110 α , p110 β ve p110 γ olarak bilinir ve sırasıyla PIK3CA, PIK3CB ve PIK3CD genlerinden kodlanırlar (Jing ve Liu 2008). p85 düzenleyici alt ünitesinin de 3 izoformu bulunur. Bunlar p85 α , p85 β ve p85 γ olarak bilinir ve sırasıyla PIK3R1, PIK3R2 ve PIK3R3 genlerinden kodlanırlar. Ancak PIK3R1, p55 ve p50 α kısa izoformlarına sahiptir. Bu izoformları alternatif splicing mekanizması ile oluşmaktadır (Engelman vd 2006). Bu p85 alt ünitesinin izoformları, p110 katalitik alt ünite ile bağlandığı bölgede yanlardan iki tane SH2 (src homolojisi 2 ye sahip) domain içerir p85 α ve p85 β izoformları ise N terminal bölgede yanlardan SH3 (src homolojisi 3'e sahip) ve BCR homolojisi (BH) sahip bölge içerirler. Bu iki bölgede proline zengindir (Engelman vd 2006). p85 düzenleyici bölgen SH2'si ile RTK'ların fosfo-tirozin rezidülerine bağlanır.

Sınıf 1B, p101 düzenleyici alt ünite ve p100 γ katalitik alt üniteden oluşan heterodimer bir yapıdadır. p100 γ sınıf 1A' da yer alan p110 ile homoloji gösterir. Diğer düzenleyici alt ünitesi p84 ve p87PIKAP olarak tanımlanmıştır (Engelman vd 2006).

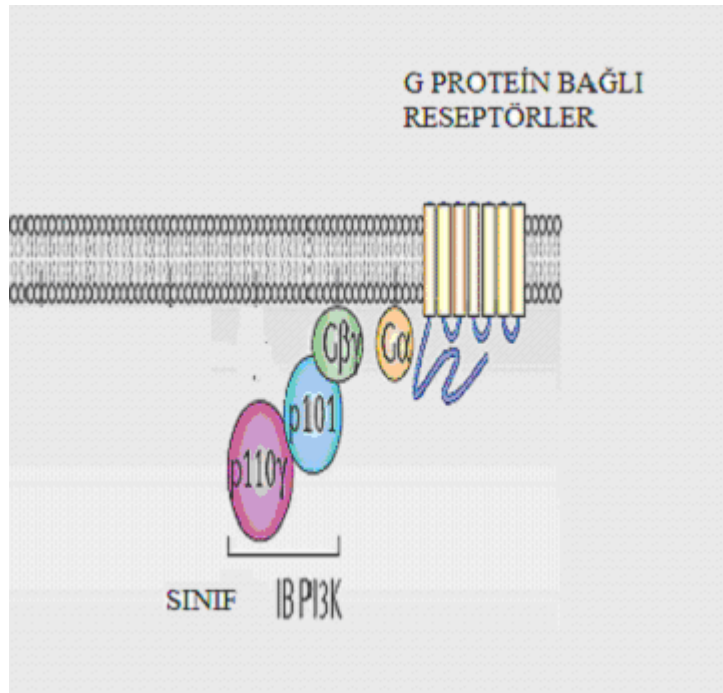
Sınıf 2'de yer alan PI3K'ların üç izoformu vardır. Bunlar PIK3C2 α , PIK3 β ve karaciğer spesifik PIK3C γ 'dır. Bu sınıf N terminal bölgesinde C2 domain içerir. Sınıf 2 PI3K'lar tirozin kinaz, sitokin reseptörleri ve integrinler tarafından aktiveleştirilirler.

PI3 Kinazlar sınıf 1A hem RTK lar ile hem de G protein ilişkili reseptörler (GPCRs) ile aktiveşebilmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 PI3K sınıf 1A'nın aktifleşme mekanizması

Sınıf 1B üyeleri PI3 kinaz yalnızca GPCR'ler ile aktifleşebilmektedir (Şekil 2.5). Bunun nedeni sınıf 1b üyelerinde p85 alt ünitesi olmadığı için RTKs ile etkileşime girememeleridir.



Şekil 2.5 Sınıf 1B'nin aktifleşme mekanizması

PI3 kinazların son sınıfı olan 3. sınıf üyeleri ise rapamisin aktifitesinde rol alırlar (Meng vd 2006)

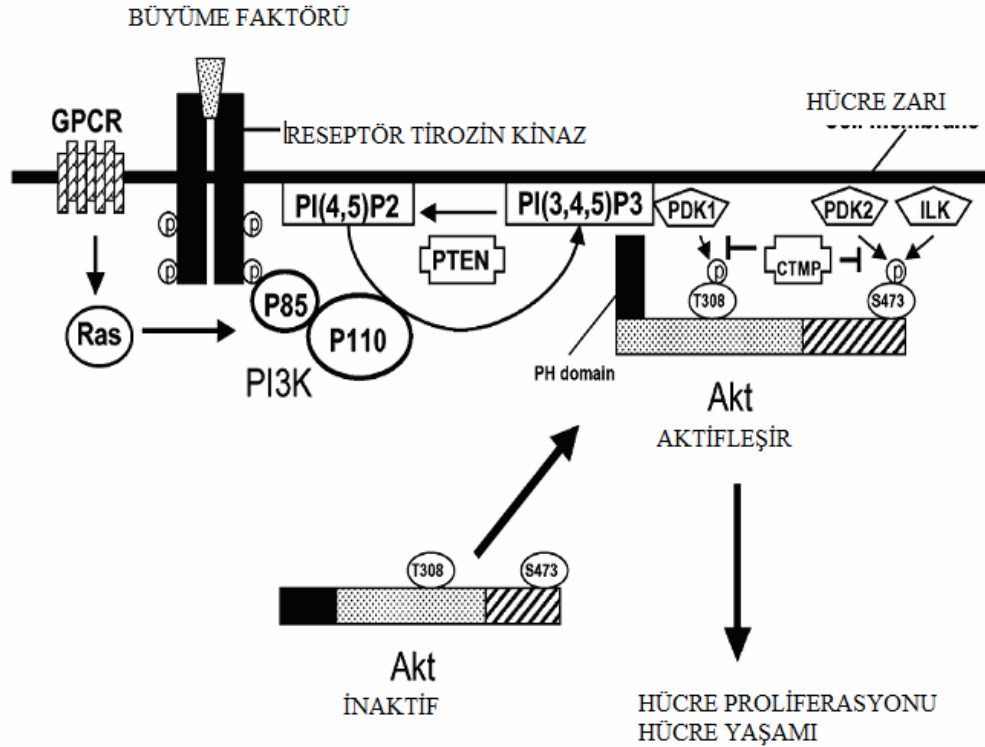
Sınıf 1 PI3K üyeleri RTKs veya GPCRs tarafından fosfatlandıktan sonra fosfoinositol 4,5 di fosfatın (PI2P) D3 pozisyonundaki inositol halkasına fosfat bağlar. Bundan sonra fosfoinositol 3, 4, 5 tri fosfat (PI3P) oluşur (Maehama ve Dixon 1998). PI3P hücrede ikinci mesajcı gibi hareket eder. PI3P'nin en büyük substratı protein kinaz B olarak bilinen AKT proteindir.

Yapılan bilimsel araştırmalarda, kanser hücrelerinde PI3K alt ünitesi olan p110 α 'nın amplifikasyona (Meng vd 2006) ve somatik mutasyona uğradığı tespit edilmiştir (Meng vd 2006). Somatik mutasyonlu PI3K literatürde PI3KCA veya PIK3R1 olarak gösterilmektedir. PI3KCA'nın delesyonu sonucu, p85 α alt ünitesinin inhibisyonu ortadan kalkarak sürekli aktif PI3K haline gelmektedir (Jing ve Liu 2008). Bu da kanser hücrelerinde proliferasyonu artırmaktadır. PI3KCA somatik mutasyonu, kolorektal kanserlerde %40 (Meng vd 2006), glioblastomada %27 (Meng vd 2006), gastrik kanserlerde %25 (Meng vd 2006), meme kanserlerinde %18-40 (Samuels ve Ericson 2007), akciğer kanserlerinde (Samuels ve Ericson 2007), % 4 tespit edilmiştir. PI3K'ın amplifikasyonu ise endometrium kanserlerinde, kolon kanserlerinde, lösemi ve merkezi sinir sistemi malign tümörlerinde tespit edilmiştir (Jing ve Liu 2008). PI3K'nın mutasyonu yada delesyonu sonucu sürekli aktif olması tümörün prognozunu kötü yönde etkilemektedir.

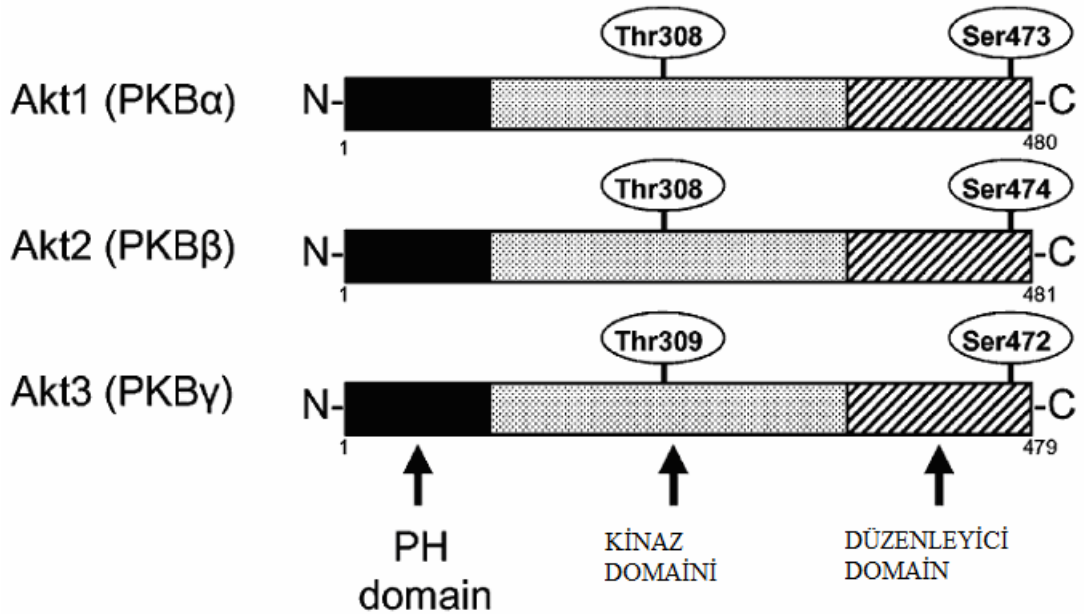
2.4.2 AKT

Akt, protein kinaz B olarak da bilinen bir serin-treonin kinazdır (Shukla vd 2007). Akt'nin 3 izoformu vardır (Meng vd 2006). Bu izoformları Akt1, Akt2 ve Akt3 olarak isimlendirilmiştir. Akt ailesi merkez domaini serin ve treonin rezidüleri substratlarına sahip bir kinazdır. Akt'nin N terminal bölgesi plekstrin homoloji bölgesi içerir (Ferraro vd 2005). Bu domain lipid-protein veya protein-protein etkisinden sorumludur (Ferraro vd 2005). Akt'nin N terminal bölgesi inositol bağlı kinazi, PDK1 tarafından 308.treonin aminoasitinden fosforlanır (Şekil 2.6), C terminal bölgesi ise, PDK2 tarafından 473. serin aminoasitinden fosforlanır (Chen vd 2009). Bu ikinci fosforillenme

ile Akt, hücre zarından ayrılarak stoplazmada serbest olarak hareket edebilme yeteneği kazanır (Jing ve Liu 2007). Akt'nin 3 izoformu da aynı bölgelerden fosfatlanır (Şekil 2.7).



Şekil 2.6 Akt fosforillenmesi



Şekil 2.7 Akt izoformlarının fosforlanma bölgeleri

Yaşamsal protein olan Akt, karsinogenezin merkez sinyal ileticisidir. Akt, apoptozisten kaçışı, proliferasyonu artırıcı ve hücre döngüsü için protein sentezini artırıcı etkisi ile tümör büyümesi ve ilerlemesini artırıcı etkiye sahiptir. Akt'nin birçok protein hedefi vardır. Bunlar, mTOR (rapamisininin memeli hedef proteini), tuberin, glikojen sentetaz kinaz 3 (GSK3) ve forkhead transkripsiyon faktörlerinin alt üniteleridir (FOXO) (Samuels ve Ericson 2007).

Akt, murine double minute 2 (MDM2) proteinini 166. ve 186. aminoasitinden fosfatlayarak p53 ün degradasyona uğramasını indükler (Knobbe vd 2002). Bu da hücrenin genom bekçisinin bloke olmasını dolayısıyla hücre döngüsü kontrol noktasından kontrolsüz olarak geçmesine neden olur. Bu şekilde de Akt sayesinde bloke olan p53 karsinogenezde hatalı DNA ya sahip kanser hücresinin bölünmesine olanak sağlamaktadır.

Akt, glikojen sentezini artırıcı etkisini ve hücre metabolizmasını düzenlemesini FOXO ve GSK3 inhibisyonu ile gerçekleştirmektedir (Jing ve Liu 2008). Akt ayrıca FOXO inhibisyonu ile proapoptotik Bcl-2'yi inhibe ederken, anti apoptotik protein BAD'ı fosforlar (Jing ve Liu 2008). Bu fosforlanma bad'ın diğer Bad'ler ile birleşmesini indükler ve mitokondriye bad girişi engeller. Akt, apoptotik yolaktaki insan double minute 2 proteini (HMD2) aktifleştirmesi sonucu p53'ün degrave olmasına neden olur. Ayrıca Akt, nükleer faktör kapp B'nin (NF-kB) inhibitörünün kinazını fosforlar. Fosfatlanan nükleer faktör kapp B'nin inhibitörünün kinazı (IKK), nükleer faktör kapp B'nin inhibitörünü (IKB) fosfatlayarak yıkımına neden olur. Böylece nükleer faktör kapp B'nin aktivitesini indükler. Nükleer faktör kapp B hedef genlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir (Dey vd 2008). Bu yolla kanser hücreleri apoptozise karşı direnç kazanabilmektedirler.

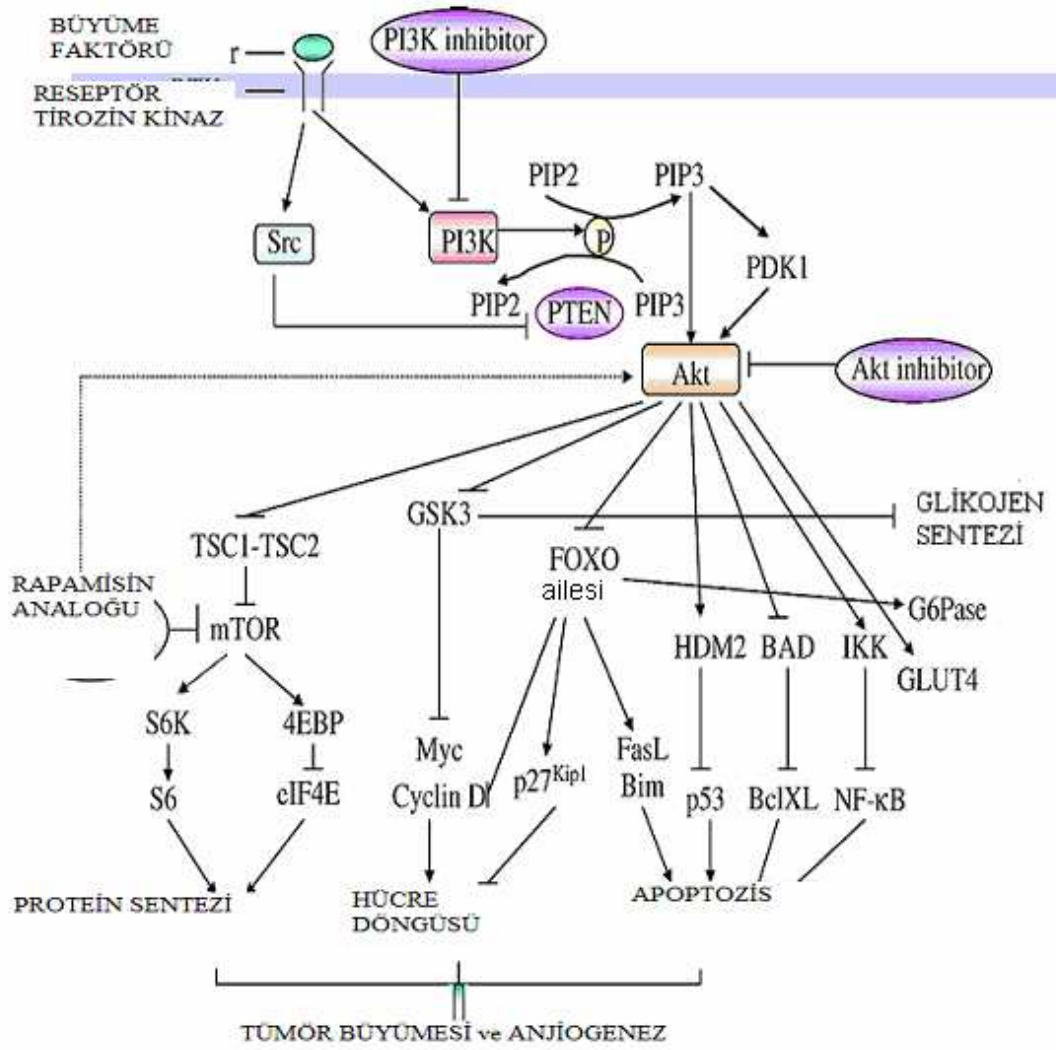
Akt, G1-S fazı hücre döngüsü inhibitörlerini FOXO molekülünü bloke ederek, FOXO ilişkili transkripsiyon faktörlerini inhibe etmektedir (Jing ve Liu 2008). Bu bloklama ile p27 kip fosforlanarak inhibe olmaktadır (Jing ve Liu 2008). Ayrıca Akt, GSK3 inhibisyonu ile hücre döngüsü proteinlerinden c-Myc ve siklin D1'i bloke ederek hücre döngüsü üzerine etki gösterir (Jing ve Liu 2008). Bu sayede hücrenin, kontrol noktalarından geçerek bölünebilmesine olanak sağlar.

Akt, protein sentezini de düzenler. Akt, Tüberküloz sklerozu 1 ve 2 (TSC1-2) inhibe ederek Rheb'nin (Ras homolog enriched in brain) aktifleşmesine olanak sağlar (Jing ve Liu 2008). Aktifleşen mTOR (mammalian target of rapamycin) kompleksi ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 4E, 4B ve 4A'nın ekspresyonlarını indükleyerek (Şekil 2.8) protein sentezini düzenler (Jing ve Liu 2008)

Akt, hücre yaşamsal olaylarında anahtar moleküldür. Aktif Akt varlığında hücre apoptozisten kaçmakta ve kontrolsüz bölünebilmektedir. Bu da tümör hücrelerinin büyümesine, invazyonuna ve metastazına yol açabilecek ana basamaktır. Deneysel çalışmalar aktif akt varlığında kemoterapi ile radyoterapiye direnç olduğunu gösterilmiştir. Dolayısıyla Akt aktivitesi karsinogeneizde önemlidir.

Akt, alt sınıflarının çeşitli kanser tiplerinde aşırı ifade edildiği saptanmıştır. Örneğin, akt-1 gastrik kanserlerde (Knobbe vd 2002), akt 2 meme kanserlerinde, yumurtalık kanserlerinde ve pankreas kanserlerinde (Samuels ve Ericson 2007), akt-3 kolorektal kanserlerde (Samuels ve Ericson 2007) aşırı ifade edilmektedir.

PI3K ve Akt karsinogeneizde aktif olarak agresif kanser prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Bu yolağın negatif kontrolü tümör süpresör gen olan PTEN tarafından düzenlenmektedir (Engelman vd 2006).



Şekil 2.8 Fosfoinositol 3 fosfat kinaz/Akt yolu

2.4.3 PTEN

PTEN (kromozom 10'dan fosfat ve tensin homolog delesyonlu (**Phosphatase and Tensin homolog deleted from chromosome ten**)), MMAC1 (ileri çoklu kaner proteini (**Mutated in Multiple Advanced Cancer**)) veya TEP1 (TGF- β düzenleyici ve epitelyal hücre genişletici fosfataz (**TGF- β regulated and Epitelial cell-enriched Phosphatase**)) olarak bilinen 10. kromozomun 10q23 bölgesinde bulunan bir tümör baskılayıcı gendir (Maehama ve Dixon 1998). PTEN'in birçok kanser tipinde ve genetik hastalıklarda ifadesi kaybolmuştur (Strumane vd 2008).

Genetik hastalıklardan; Cowden's hastalığı, Humartoma sendromu, Bannayan-Riley-Ruvalcaba sendromu (Banana-Zonana sendromu), genç polipozis sendromunun bir alt tipi, lhermitte-Duclos hastalığı, Proteus ve Proteus sendromları PTEN geninin yokluğuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Knobbe vd 2002).

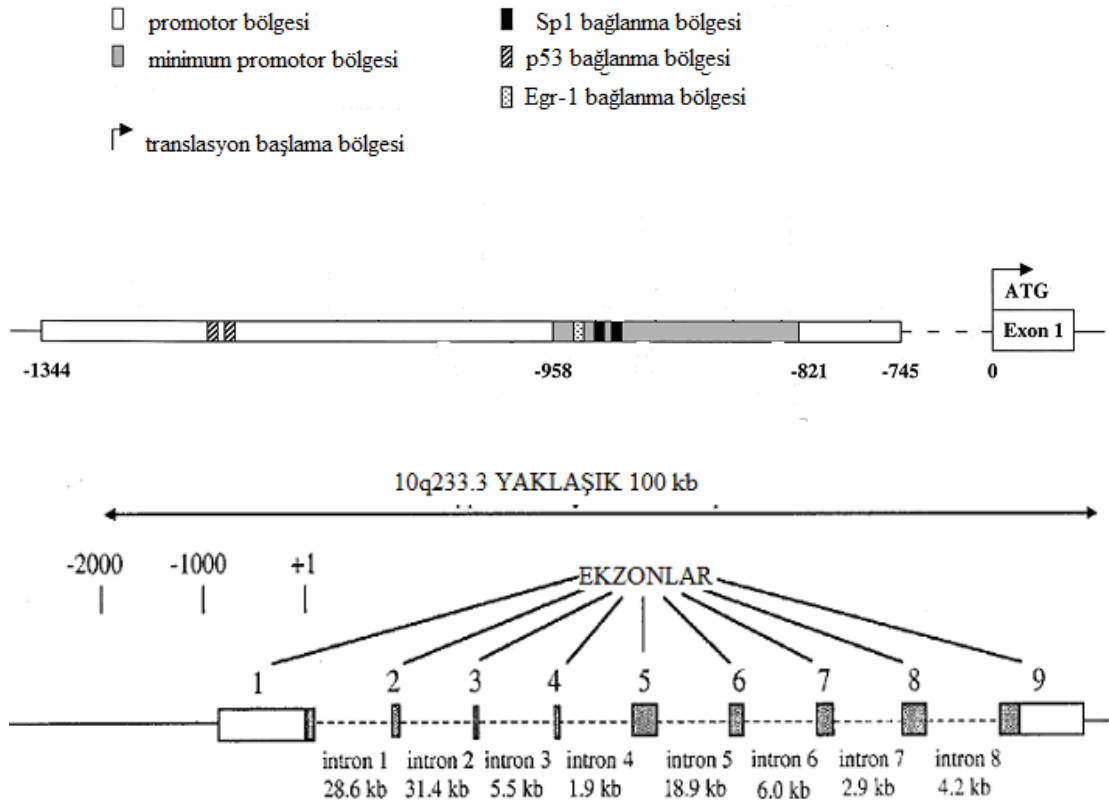
PTEN hem lipid fosfataz hem de protein fosfataz aktivitesine sahip çift etkili bir fosfatazdır (Knobbe vd 2002). Lipid fosfataz aktivitesi protein fosfataz aktivitesinden daha fazladır. PTEN hücre döngüsünün kontrolünde, proliferasyonun kontrolünde ve apoptoziste rol alan bir tümör baskılayıcı gendir.

Li ve arkadaşları 1997 yılında glioblastoma ve prostat kanserlerinde homozigot delesyona uğrayan 10q23 kromozomunda PTEN genini tanımlamışlardır (Knobbe vd 2002). Aynı geni Steck ve arkadaşları ileri kanserde çoklu mutasyon MMAC1 geni olarak tanımlamışlarsa da (Knobbe vd 2002), bu gün insan genom organizasyonu tarafından bu gen PTEN olarak adlandırılmaktadır.

İnsan PTEN geni 10. kromozom üzerinde 10q23 bölgesinden kodlanan ve 9 ekzon içeren gendir (Şekil 2.9). Yaklaşık 100 kb genomik uzunluğu vardır. Transkripsiyonel bölgesi -951. ve -925. nükleotid bölgesinden başlar, pozitif regülasyonu -1001 ve -427 nükleotid dizisinde rol alır (Knobbe vd 2002).

PTEN'in promotörü -947 ve -939 arasındaki GCGGCGGCG dizisine Egr1 transkripsiyon faktörü tarafından indüklenmesi ile PTEN transkripsiyonu başlar

(Knobbe vd 2002). PTEN promotörü, CpG dinükleotidleri yönünden zengindir. Bu yüzden DNA metilasyonu bu bölgede oluşmaktadır (Knobbe vd 2002).

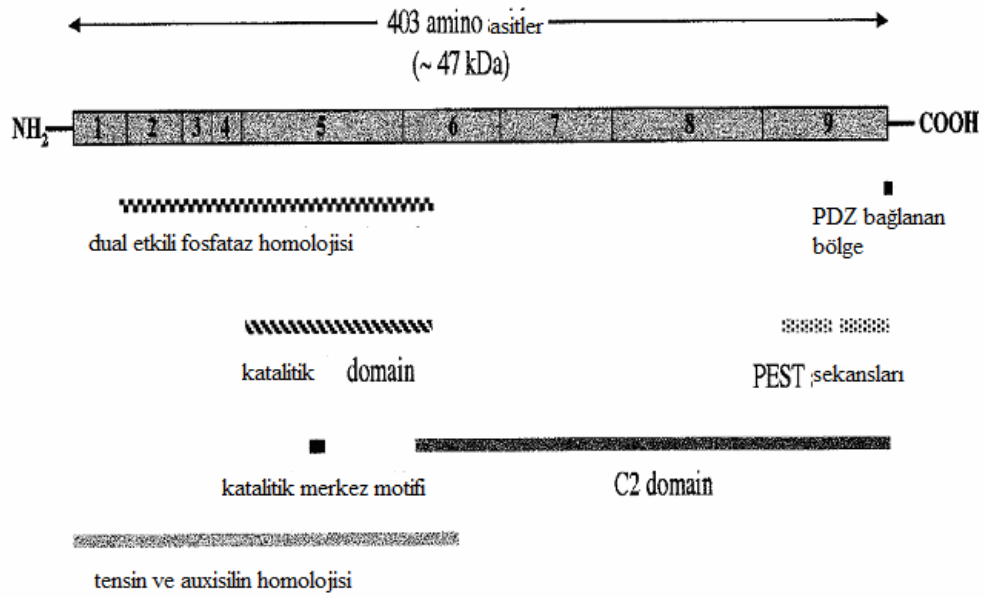


Şekil 2.9 PTEN gen Yapısı

PTEN C terminal bölgesi fosforilasyonu düzenleyen, prolin-glutamik asit, serin-treonin gibi zengin sekanslara sahiptir ve PDZ (Postsnaptik protein PSD95/sap90, Drosophila da tümör baskılayıcı gen Dlg-A, hücre bağlantı proteini ZO-1) bölgesini de içerir (Knobbe vd 2002). PTEN'in mRNA sından sentezlenen protein, 403 aminoasit içerirken, moleküler ağırlığı ise 47 kDa dur. PTEN in N terminal bölgesi tensin ve auxilin (Şekil 2.10) ile homoloji gösterir (Knobbe vd 2002).

PTEN'in kristal yapısı incelendiğinde fosfoinositol substratı ile protein fosfataz yapısı benzerlik gösterir. C terminal bölgesi katalitik aktivite göstermez iken protein stabilizasyonunu, yarı ömrünü ve fonksiyonel aktiviteyi düzenler ayrıca lipid bağlanma bölgesi C2 domaini bu bölgededir (Knobbe vd 2002). Bu domain hücre zarı ile ilişkilidir. PTEN in, 2 prolin, glutamik asit, serin ve treonin aminoasitlerinden zengin sekans içeren C terminal bölgesi protein deragasyonunda ve stabilizasyonunda etkilidir (Knobbe vd 2002).

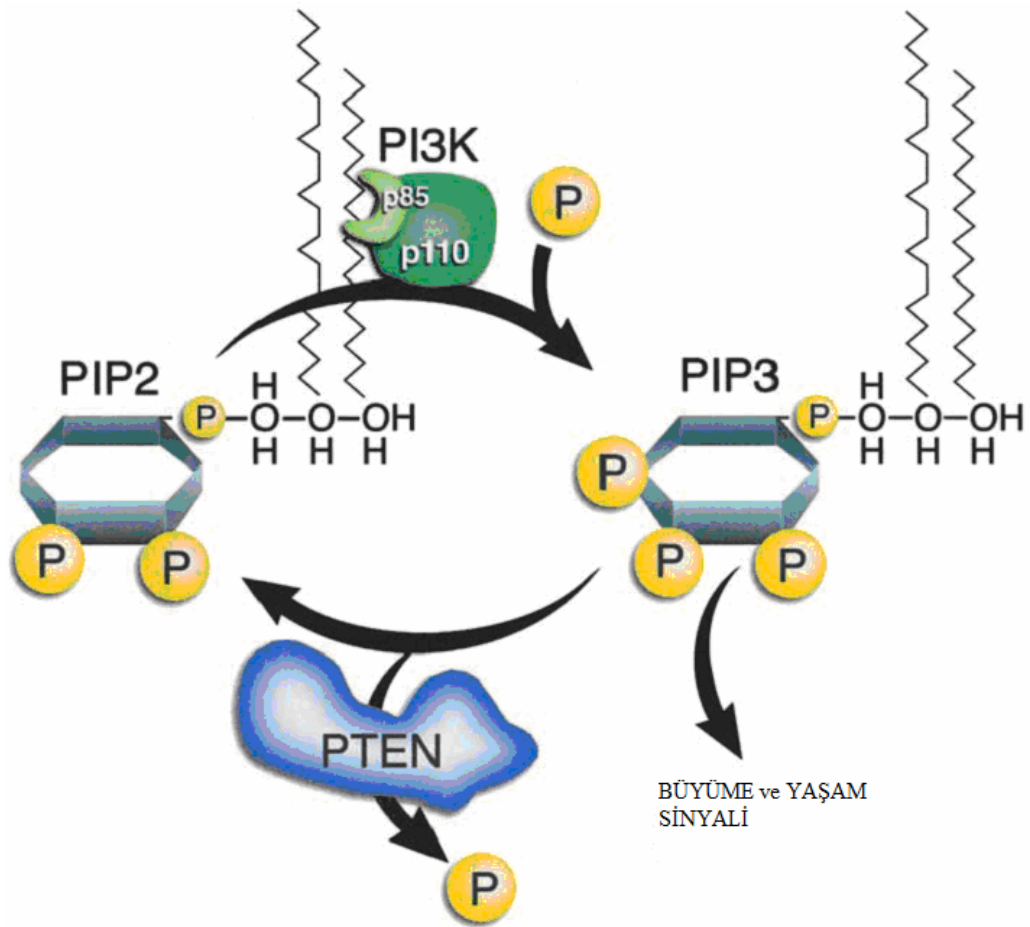
PDZ bağlanma bölgesi, Postsnaptik protein PSD95/sap90, Drosophila da tümör baskılayıcı gen Dlg-A, hücre bağlantı proteini ZO-1 içeren üç domaine sahiptir. PDZ bağlanma bölgesi 401-403 aminoasit içerir. PDZ bağlanma bölgesi protein protein etkileşimi ile ilişkilidir (Knobbe vd 2002). PDZ bağlanma bölgesine sahip PTEN, Membran birleşik guanilat kinaz ailesinin üyeleri (MAGI) ve mikrotübül birleştirici serin/treonin kinaz MAST2005 ile de ilişkilidir (Knobbe vd 2002). MAGI proteinlerine bağlanan PTEN, Akt aktivasyonunu baskılar (Knobbe vd 2002).



Şekil 2.10 PTEN protein yapısı ve çeşitli bağlanma bölgeleri

PTEN, PI3P'ın inositol halkasındaki 3 OH pozisyonundaki fosfatı (Şekil 2.11) defosforile eder (Maehama ve Dixon 1998), PI3K'ın antogonistidir. PIP3 hücrede ikinci mesajcı bir moleküldür. Akt'nin aktivasyonunda önemli rol oynar. PIP3, Akt'nin plazma zarına translokasyonunda rol alır. Akt'yi, PDK1 308.treonin amino asidinden, PDK2 ise 473.serin aminoasidinden fosfatlar. Ancak PIF (PDK1 interacting fragment) bağlı PDK1, PDK2'ye gerek kalmadan 473.serin aminoasidinden Akt'yi fosfatlayabilir. Gerek PDK1 gerekse PDK2, PIP3 tarafından aktive edilir (Engelman vd 2006). PTEN, fosfoinositol 3,4,5 tri fosfat'ın 3'OH pozisyonundaki fosfatı defosforile ederek Akt'nin membran lokalizasyonunu ve Akt'nin aktivitesini inhibe ederek düzenler.

PTEN, yalnızca PIP3/Akt yolağı ile ilişkili değildir. Birkaç yolda da etkisi vardır. Örneğin; PTEN, MAPK (mitojen aktivite eden protein) ilişkili integrin ve büyüme faktörü yolağının aktivasyonunu da durdurur (Knobbe vd 2002). PTEN ayrıca Shc ve insülin reseptör substratı 1 (IRS1) gibi adaptör proteinleri de defosforile eder (Knobbe vd 2002). Aynı zamanda fokal adezyon kinaz molekülünü de defosforile ettiğini gösteren yayınlar mevcuttur (Tang vd 2006).



Şekil 2.11 Fosfoinositol 3 fosfatın PI3 kinaz tarafından fosforilasyonu ve PTEN tarafından defosforilasyonu

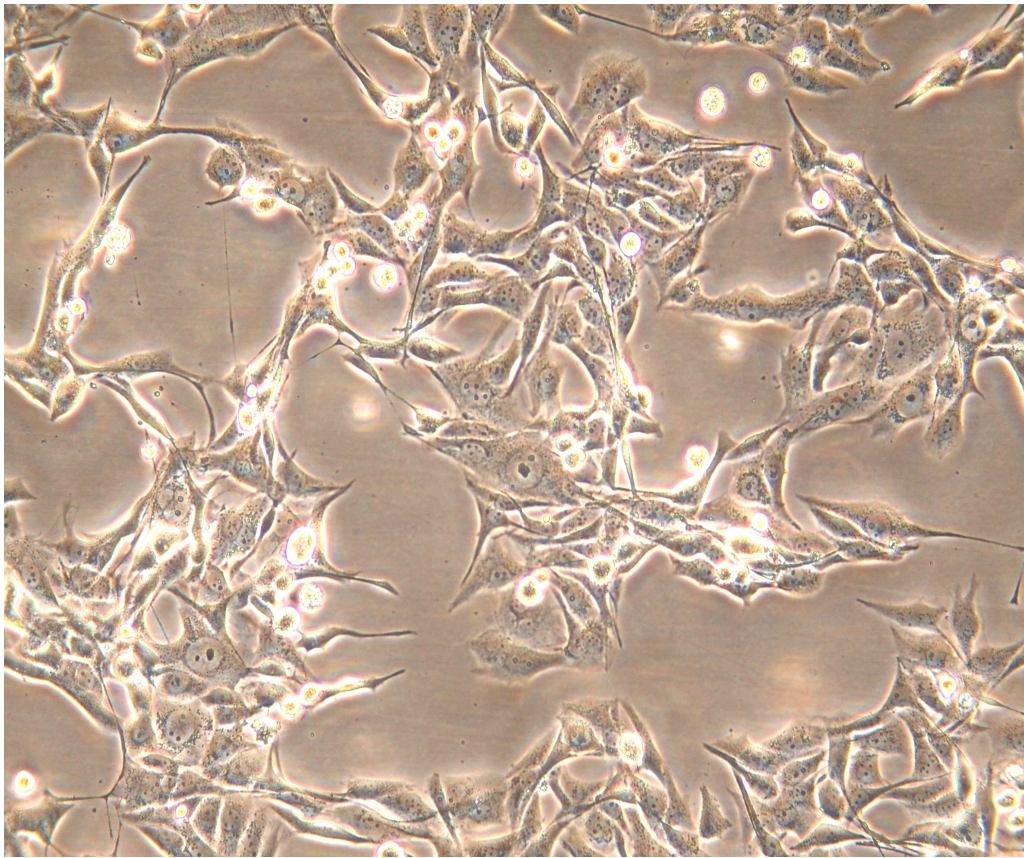
Literatüre göre PTEN cDNA'sının 129. aminoasitini kodlayan GAA dizisinde yapılan iki nokta mutasyonu PTEN aktivitesini oldukça etkilemektedir. Buna göre PTEN G 129R yani 129. aminoasit glisin (GAA) yerine arjinine (AGA) dönüştüren mutasyon katalitik olarak inaktif PTEN yaratır. PTEN G129E yani 129. aminoasit glisin (GGA) yerine glutamik asite (GAA) dönüştüren mutasyon ise PTEN'in sadece lipid

defosforilaz etkisinin kaybolmasına sebep olur (Kandasamy ve Srivastava 2002). Dolayısı ile bu mutant PTEN formları araştırcıların PTEN'in etki mekanizmasının hangi yolak üzerinden olduğunu anlamalarına olanak sağlamaktadır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Hücreler ve Hücre Kültürü

Projede kullanılan NSCLC hücre dizisi PC14 Prof. Dr. Jun Yokota'dan (Ulusal Kanser Araştırma Merkezi, Tokyo/JAPONYA) temin edilmiştir (Şekil 3.1). Hücreler %10 Fetal Calf Serum ve % 0,5'lik penisilin/steptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava ortamında inkübe edilmiştir. Hücre kültüründe kullanılan petri kapları Greiner'den temin edilmiştir.



Şekil 3.1 Çalışmada kullanılan küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre dizisi PC14'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 buz içerisinde 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından, 4000 rpm de 10 dk +4°C santrifüj edilip, süpernetant atılmış ve pellet 10 ml steril 0,1 M CaCl₂ (soğuk) ile çözülmüştür. Tekrar 4000 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj edilip, süpernetant atılmış ve pellet 1 ml steril 0,1 M CaCl₂ (soğuk) ile çözülmüş ve böylece kompetent hale getirilen JM109 bakterileri steril ependorflara 100 µl olacak şekilde bölünerek daha sonra tranformasyon için kullanılmak üzere -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.

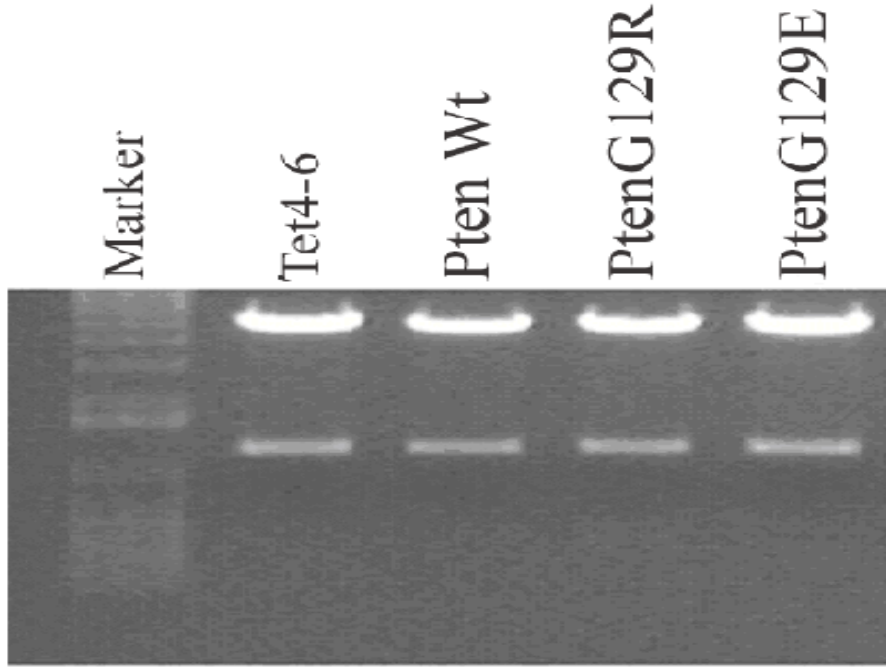
3.3 Plazmid İzolasyonu

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 İsoopropanol, % 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 İsoopropanol) 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 edilmiştir.

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 (Şekil 3.2)



Şekil 3.2 Plazmid izolasyonundan sonra elde edilen plazmidlerin görüntüsü

3.5 Plazmidlerin Kalıcı Transfeksiyon Yöntemi ile PC14 Hücrelerine Aktarılması

Araştırmada kullanılan ekspresyon vektörleri “TETON” sistem vektörleridir (Invitrogen). Bu vektör sistemleri, klonlanan genin ekspresyonunun hücre içinde sadece tetrasiklin ilavesi ile gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca, bu vektör sistemleri araştırmacı tarafından tümör baskılayıcı gen ekspresyon ve fonksiyon çalışmalarının istenilen zamanda yapılmasına olanak sağladığından uygundur.

Çalışmada kullanılan PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E ekspresyon vektörleri, Doç. Dr. Hakan AKÇA tarafından TÜBİTAK 108S187 nolu proje kapsamında klonlanmıştır. Bu bağlamda, boş vektör (pcDNATETON) ve PTENwt (pcDNATETON-PTENwt), PTEN G129E (pcDNATETON-PTENG129E) ve PTEN G129R (pcDNATETON -PTEN G129R) ekspresyon vektörleri, PC 14 hücrelerine FUGEN HD (roche) transfeksiyon ajanı kullanılarak kalıcı transfeksiyon yöntemi ile 2 µg DNA olacak şekilde transfekte edilmiştir. Transfeksiyon prosedürü aşağıda kısaca gösterilmektedir;

PLAZMİD ADI		2 µg DNA için	OPTİMEM	FUGEN
pc DNA 4	(0,375µg/µl)	5,27 µl	88,73 µl	6 µl
Pten WT	(0,337µg/µl)	5,93 µl	88,07 µl	6 µl
Pten R	(0,492µg/µl)	4,06 µl	89,94 µl	6 µl
Pten E	(0,278µg/µl)	7,19 µl	86,81 µl	6 µl

Plazmidlerin Kalıcı Transfeksiyon Yöntemi ile PC14 Hücrelerine Aktarılması için Önce optimem (invitrogen) besiyeri 37°C inkübe edilmiştir. Ardından steril ependorflara yukarıdaki miktarlarda konulmuş ve sonra belirtilen miktardaki plazmitler steril ependorflara konulmuştur. Daha sonra, 3 kez pipetle köpürtmeden pipetaj yapılmıştır. Ardından, transfeksiyon ajanı olan fugen HD 6 µl ilave edilip, 15 kez pipetaj yapılmıştır. Daha sonra optimem-lipozom-plazmid karışımı 15 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından plazmid içeren lipozomlar 2 ml tam besiyeri içeren hücrelere damla damla aktarılmıştır. Bu işlemin ardından 5 saat sonra mevcut besiyeri uzaklaştırılarak, yeni tam besiyeri ile bir gece inkübe edilmiştir. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra seçim ajanları hücrelerin bulunduğu besiyerine eklenmiştir. Seçim ajanları, blastosidin (invitrogen) 1 ml besiyerine 100 µg, zeosin (invitrogen) 1 ml besiyerine 10 µg olacak şekilde konularak seleksiyonu başlanmış ve seleksiyona 26 gün devam edilmiştir.

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, eliza reader (XL 808) cihazında 630 nm’de okunmuştur. Standart BSA’lar ile oluşan grafiğin eğimi kullanılarak, konsantrasyon aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

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

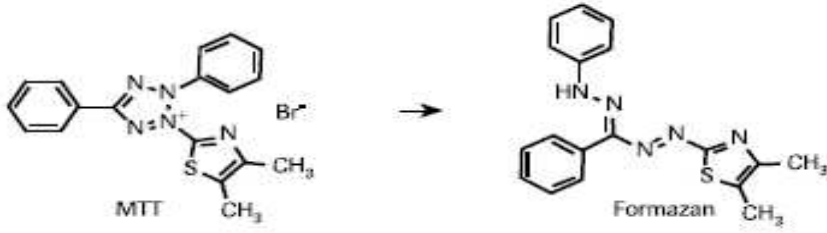
3.7. SDS-PAGE ve Western Blot

Wild tip PTEN, PTENG129R, PTENG129E ve boş vektör kalıcı transfekte edilmiş PC 14 Hücreleri tripsinize edilerek, kontrol grubu ve tetrasiklin grubu olmak üzere 10 cm petrikaplarına ekilmiştir. Ertesi gün, tetrasiklin grubuna, TETON sisteminin çalışması için 2µm/ml tetrasiklin ilave edilmiştir. Kontrol grubuna ise tetrasiklin ilave edilmemiştir. Bu şekilde hücreler 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava içeren ortamda 24 saat inkübe edilmiştir. Bu iki grup hücre 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 3.5 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, Hapes 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 işlemde 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 2 saat bloklanmıştır. Ardından aynı membran %5 kuru süt içinde 1:5000 (PTEN Santa Cruz) ve 1:50.000 (GAPDH Santa Cruz) oranlarında bulunan primer antikörlerle oda sıcaklığında 1 saat işaretlenmiştir. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin primer antikörlerle işaretlenmesinin ardından, membran 1 saat TBST ile oda sıcaklığında yıkanmıştır. Yıkama işleminin bitmesiyle membran primer antikörlerin immünoglobulinlerine karşı spesifik olarak geliştirilmiş olan ve 1:10000 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz Santa Cruz) bağlı sekonder antikör 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

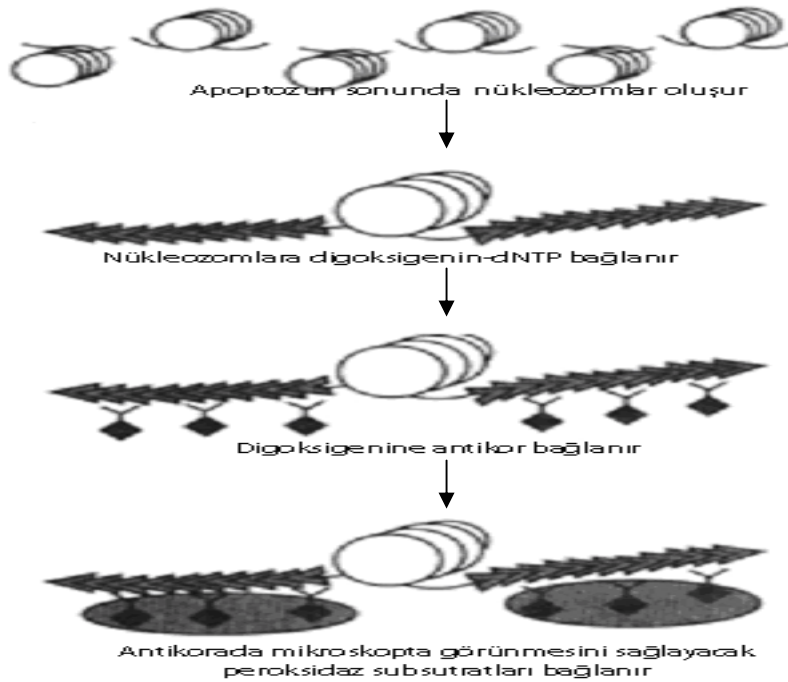
Wild tip PTEN, PTENG129R, PTENG129E ve boş vektör kalıcı transfekte edilmiş PC 14 Hücreleri tripsinize edilerek sayılmış, kontrol grubu ve tetrasiklin grubu olmak üzere 96 kuyucuklu petri kaplarına 1×10^3 hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir. Ertesi gün, tetrasiklin grubuna, TETON sisteminin çalışması için 2µm/ml tetrasiklin ilave edilmiştir. Kontrol grubuna ise tetrasiklin ilave edilmemiştir. Bu şekilde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava içeren ortamda 96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda MTT kit (Roche firmasından temin edilmiştir) kullanılarak Formazan boya rengi oluşunca (Şekil 3.3) 590 nm'de eliza reader (XL 808) cihazı ile proliferasyon saptanmıştır.



Şekil 3.3 MTT'nin yaşayan hücrelerde formazan tuzu oluşturması

3.9. Apoptosisin Belirlenmesi

PC 14 Hücreler (Wild tip PTEN, PTENG129R, PTENG129E ve boş vektör kalıcı transfekte edilmiş) tripsinize edilerek sayılmıştır, kontrol grubu ve tetrasiklin grubu olmak üzere 25 cm² lik flasklara 1x10⁵ hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir. Tetrasiklin grubuna, TETON sisteminin çalışması ve PTEN ekspresyonunun sağlanması için 2µm/ml tetrasiklin ilave edilmiştir. Kontrol grubuna ise tetrasiklin ilave edilmemiştir. Bu şekilde 37°C de %5 CO₂, %95 nemli hava içeren ortamda 96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) testi uygulanarak (Invitrogen) apoptotize uğrayan hücreler belirlenmiştir (Şekil 3.4) .



Şekil 3.4 TUNEL testinin çalışma prensibi

3.10 İnvazyonun Saptanması

Planlanan çalışmada PTEN'in hücre invazyonuna etkisinin saptanması için BioCoat Matrigel İnvazyon Chamber-İnvazyon 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 matrigel 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.

pc DNA 4 ve Stable PTEN ekspres eden (PTENwt (pcDNATETON-PTEN), PTEN G129E (pcDNATETON -PTEN G129E), PTEN G129R (pcDNATETON -PTEN G129R)) PC14 hücreleri, her invazyon odasında 1.25×10^5 olacak şekilde serum içermeyen 0.5ml RPMI1640 içerisine konulmuştur. İnvazyon odacığının dışına ise, 0.75 ml %10 FBS içeren RPMI1640 konularak, invazyon odacığının dışının kemoatraktan olması sağlanmıştır. Hücreler 24 saat 37C'de CO₂'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 “cell scaper” 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.

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

3.11. Odak Testi (Koloni Formasyon)

Öncelikle, PC 14 Hücreler (Wild tip PTEN, PTENG129R, PTENG129E ve boş vektör kalıcı transfekte edilmiş) tripsinize edilerek sayılmıştır. Kontrol grubu ve tetrasiklin grubu olmak üzere 10 cm'lik petri kaplarına 1×10^3 hücre/ml olacak şekilde ekilmiştir. Bir gruba sadece normal besiyeri, diğer gruba ise tetrasiklin konmuştur (2 µg/ml). Tetrasiklin her gün hücrelere eklenmiştir. Besiyeri, 2-3 gün içerisinde değiştirilmiştir. 3 hafta sonra koloniler oluşmuştur. Koloniler, toluiden mavisi (boraks %1, toluiden mavisi %1) ile boyanmıştır.

Boyama işlemi için öncelikle hücrelerden besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından, hücreler izotonik su ile yıkanmış ve izotonik su uzaklaştırılıp, ardından 5 ml metanol ile 2 dakika inkübe edilerek fiksasyon sağlanmıştır. Daha sonra, hücreler 2 ml toluiden mavisi içeren solüsyon ile 2 dakika boyanmış ve distile su ile iki ayrı kaptaki yıkanıp kurutulmuştur. Ardından dijital fotoğraf makinesi (canon E1) ile kolonilerin fotoğrafları çekilerek, koloniler sayılmıştır.

3.12. Verilerin Değerlendirilmesi

Proliferasyon, apoptozis 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 Transfekte Hücrelerin Seçilimi

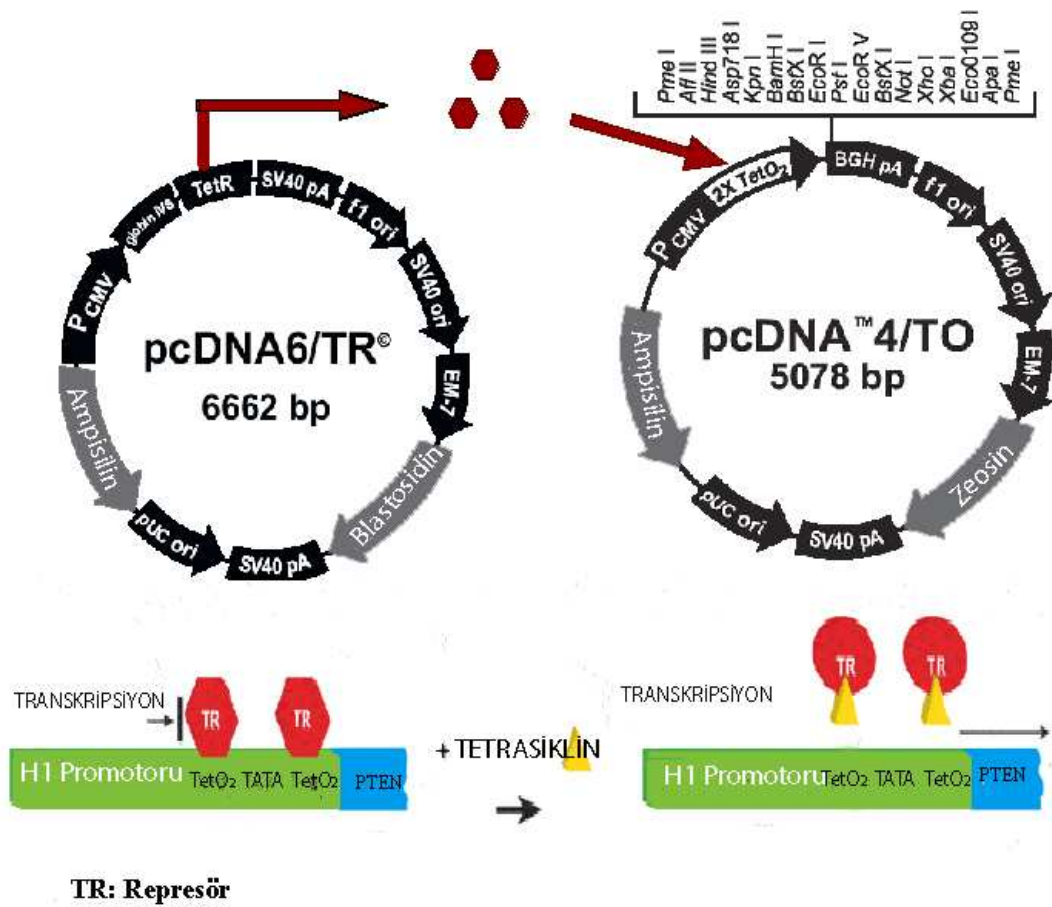
İnsan NSCLC hücre dizileri PC-14'ler, materyal ve metot kısmında anlatıldığı gibi tet6 ve tet4 vektör sistemleri ile birlikte transfekte edilmişlerdir. Transfeksiyon işleminden 24 saat sonra besiyerine blastosidin (100µg/ml) ve zeosin (10 µg/ml) ile muamele edilerek seleksiyona başlanmıştır. Üç günde bir besiyeri tazelenmek suretiyle seleksiyona 26 gün devam edilmiştir. Transeksiyon işleminden 26 gün sonra boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E ifade ettiğini düşündüğümüz koloniler belirmişlerdir (Şekil 4.1). PTEN wt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücrelerinde PTEN ekspresyonunu tekrardan yaratıp yaratmadığını anlayabilmek için western blot analizi yapılmıştır.



Şekil 4.1 Boş vektör, PTEN wt, PTENG129R ve PTENG129E kalıcı transfekte edilen PC14 hücrelerinin Blastosidin ve zeosin ile seleksiyonu

4.2 Transfekte Hücrelerde PTEN İfadesinin Gösterilmesi

Teton sistemi iki vektörden oluşmaktadır. Bunlardan tet6 vektörü blastosidin direnç geni taşıırken, tet4 vektörü zeosin direnç geni taşımaktadır. Koloni seçilimi, blastosidin ve zeosin seçim markerları ile gerçekleştirilmiştir. PC 14 NSCLC hücre dizisine transfekte ettiğimiz tet6 vektörü, sürekli olarak represör ifade etmektedir (TetR). TetR, tet4 vektörünün promotorunu baskılamaktadır. Bu baskıyı ortadan kaldırmak için hücreler tetrasiklin ile muamele edilir. Tetrasiklin, TetR'a bağlanarak tet4 vektörünün promotorunun baskılanmasını inhibe eder. Bu sayede klonlanan PTEN gen ifadesi sağlanır (Şekil 4.2)



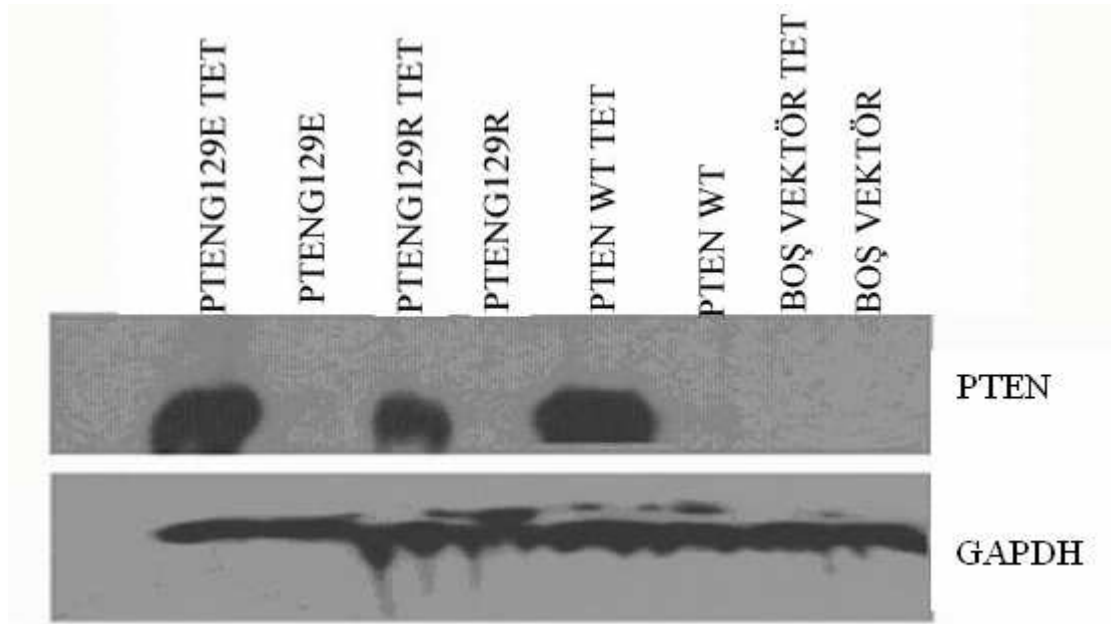
Şekil 4.2 TETON sisteminin çalışma mekanizması

Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilen PC14 hücrelerinden RIPA buffer ile elde edilen lizatlar bu hücrelerde PTEN ifadesinin varlığını göstermek ve TETON sisteminin düzgün çalışıp çalışmadığını anlamak amacı ile western blot analizine tabi tutuldular.

Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücreleri 2 µg/ml tetrasiklin ile muamele edilen ve edilmeyen iki gruba ayrılarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası RIPA buffer ile hücreler lize edildiler. “Materyal metod bölümde” anlatıldığı gibi bradford yöntemi ile protein miktarı tayin edildi. Bu lizatlar, her well’de 100 µg protein olacak şekilde SDS-jel (%4-20 gradientli) elektroforezine tabi tutuldular (Tablo 4.1). Elektroforez işleminin ardından jeldeki proteinler immünobolin blota transfer edildiler. PTEN’e karşı yapılan işaretleme transfektant PC 14 hücrelerinin PTEN wt ve mutantlarını eksprese ettiğini göstermektedir (Şekil 4.3). Aynı sonuç bize PTEN ekspresyonunun sadece tetrasiklin varlığın da olduğunu da gösterir.

Tablo 4.1 Hücre Protein Örneklerinin SDS-PAGE için Hazırlanması

	Protein Konsantrasyonu (µg/ml)	100 µg protein için alınan lizat (µl)	PBS (µl)	2X lamelli buffer (µl)
PC14 tet4/6	16,22	6,17	3,83	10
PC14 tet4/6 tetrasiklin	19,32	5,17	4,83	10
PTEN wt	17,21	5,81	4,19	10
PTEN wt tetrasiklin	11,89	8,41	1,59	10
PTENG129R	15,14	6,61	3,39	10
PTENG129R tetrasiklin	11,96	8,36	1,64	10
PTENG129E	16,26	6,15	3,85	10
PTENG129E tetrasiklin	18,47	5,41	4,59	10



Şekil 4.3 Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücrelerinin PTEN ve GAPDH ekspresyonları

SDS-PAGE sırasında protein örneklerin yüklenmesinde hata olup olmadığını göstermek için membran üzerinden PTEN antikorunu uzaklaştırılarak (strip off) aynı membran GAPDH antikorunu ile tekrar işaretlenmiştir (Şekil 4.3). Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücrelerinin hepsinde eşit oranda GAPDH ifadesi olduğu gösterilmiştir. Bu da sonuçta protein yüklemesinin well'lere eşit miktarda yapıldığını gösterir.

4.3. Tekrar Yaratılan PTEN İfadesinin Hücre İnvazyonuna Etkisi

Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücreleri, matrijel invazyon odacıklarına serum içermeyen besiyeri içerisinde $2,5 \times 10^4$ hücre/ml olacak şekilde yerleştirilmiştir. İnvazyon odacığının dışına ise %10 serum (FBS) içeren besiyeri konulmuştur. Bu deney düzeneğinde hücreler 37°C 'de 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 geçmişlerdir. Matrijel matrikste bulunan dolayısıyla invaziv hücreler toludine mavisi (%1) ile boyanarak mikroskop altında 40X büyütmede sayılmışlardır.

Boş vektör transfekte edilen PC 14 hücrelerinin ortalama invazyon sayısı 31.6 ± 2.5 hücre, PTENG129R transfekte edilen PC 14 hücreleri ortalama invazyon sayısı 52.4 ± 7.0 hücre, PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücreleri ortalama invazyon sayısı 47.8 ± 8.1 hücre iken, PTEN wt transfekte edilen PC 14 hücrelerinde bu sayı düşerek invaziv hücre sayısı 1.4 ± 0.5 hücre bulunmuştur.

Yüzde invazyonu hesaplayabilmek için hücre migrasyonu da saptamak gerekmektedir. Bu sebeple BD Biosciences firmasından kontrol odacıkları satın alınmıştır. Yüzde invazyon tespit edilmesi amacıyla invazyon deneyinde kullanılan aynı hücreler, aynı ortam koşullarında $2,5 \times 10^4$ hücre/ml hücre olacak şekilde kontrol odacıklarına ekilmişlerdir. Bu deney düzeneğinde hücreler 37°C 'de CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edilmişlerdir. Kontrol deneyi sonuçları şu şekilde bulunmuştur; Boş vektör transfekte edilen PC 14 hücrelerinin kontrol odacığının diğer tarafına göç eden hücrelerin ortalama sayısı 55 ± 3.8 hücre, PTENG129R transfekte edilen PC 14 hücrelerinin kontrol odacığının diğer tarafına göç eden hücrelerin ortalama sayısı 76.8 ± 5.8 hücre, PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücrelerinin kontrol odacığının diğer tarafına göç eden hücrelerin ortalama sayısı 73.6 ± 4.4 hücre iken, PTEN wt transfekte edilen PC 14 hücrelerinin kontrol odacığının diğer tarafına göç eden hücrelerin ortalama sayısı 7.4 ± 0.8 hücre bulunmuştur.

İnvazyon ve migrasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar aşağıdaki formül uygulanarak hücrelerin % invazyon hesaplandı.

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

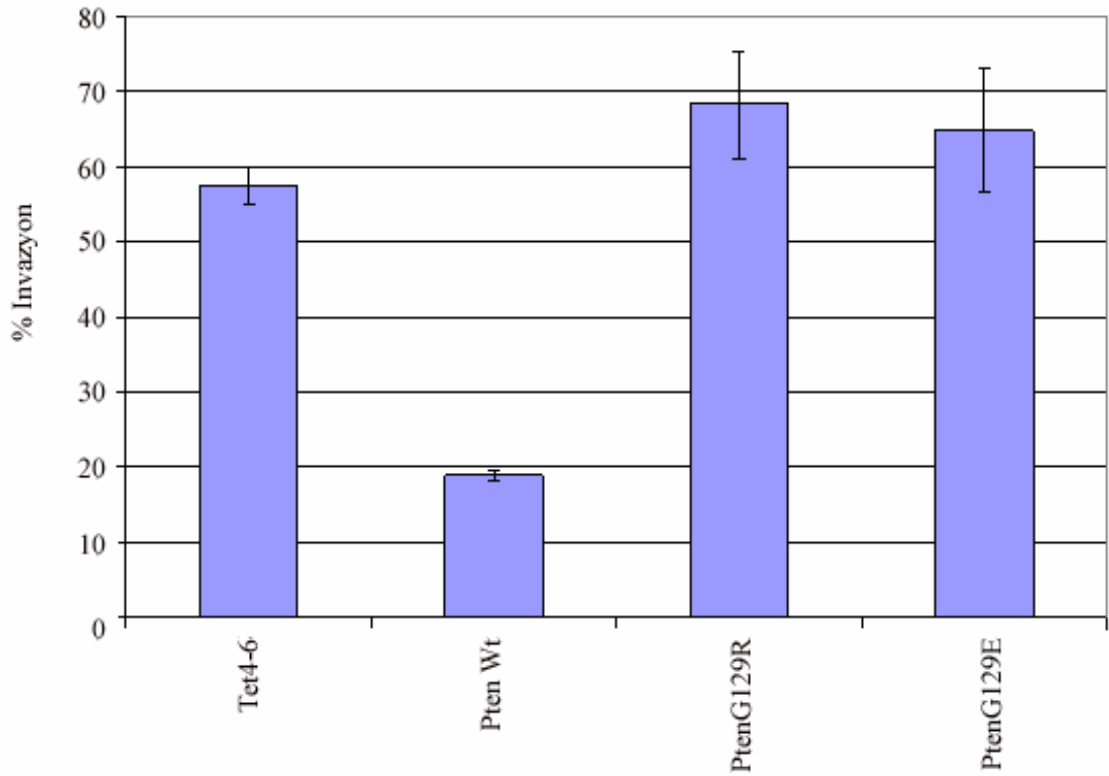
Buna göre hücrelerin % invazyonu boş vektör transfekte edilen PC 14 hücrelerinde $\%57.45 \pm 12.7$, PTENG129R transfekte edilen PC 14 hücrelerinde $\% 68.22 \pm 14.2$,

PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücrelerinde $\% 64.94 \pm 14.9$ iken PTEN wt transfekte edilen PC 14 hücrelerinde $\% 18.91 \pm 3.2$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.2), (Şekil 4.4). Kalıcı transfekte edilen PC 14 PTEN wt hücrelerinde ifade edilen PTEN

geni, boş vektör transfekte edilen hücelere oranla invazyonu 67 ± 3.2 oranında baskılamaktadır ($p < 0,05$).

Tablo 4.2 Hücrelerin Kontrole Oranla Yüzde İnvazyon

Tet4-6	57.45±12.7
Pten Wt	18.91±3.2
Pten129R	68.22±14.2
Pten129E	64.94±14.9



Şekil 4.4 Yeniden yaratılan PTEN ekspresyonunun hücre invazyona etkisi

4.4. PTEN İfadesinin Proliferasyona Etkisi

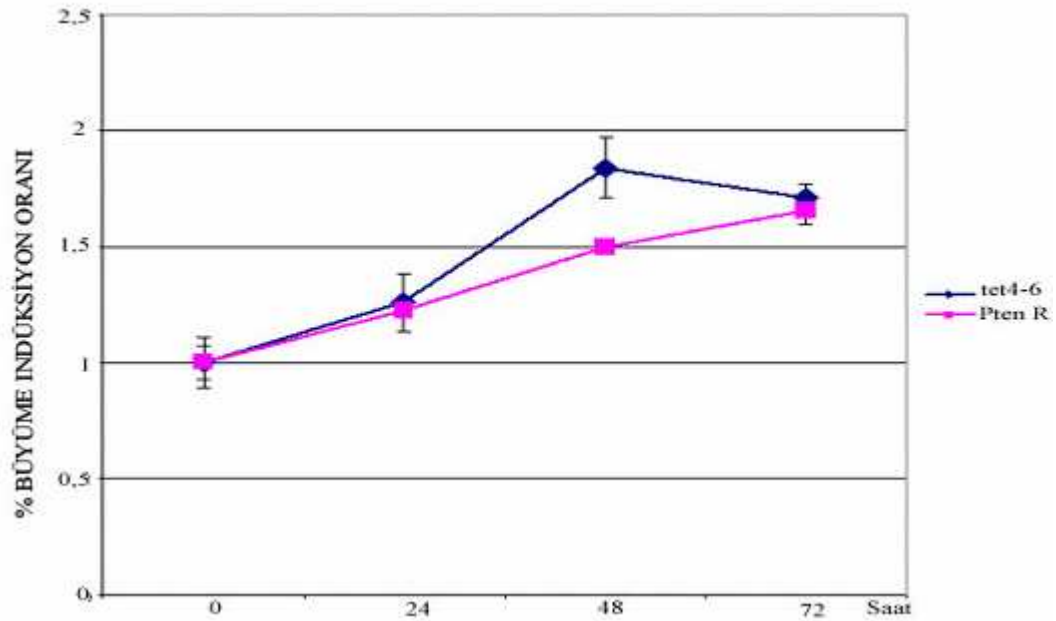
Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücreleri, başlangıçtaki sayıları 1×10^3 hücre/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere ekilmiştir. PTEN wt ve mutantlarının ifadelerinin PC 14 hücrelerinin proliferasyona etkisi mtt kit ile 0, 24, 48 ve 72. saatlerde ölçülmüştür. Elde edilen verilerden 0. saatteki ölçüm ile diğer saatteki ölçümler oranlanarak büyüme induksiyon grafiği elde edilmiştir (Tablo 4.3).

Sıfırncı saate oranla hücre proliferasyonun kaç kat arttığını saptamak amacı ile 24, 48 ve 72 saat mtt ölçümleri 0. saate oranlandı. Böylece sıfırncı saate oranla % hücre proliferasyonu saptandı. Buna göre; boş vektör transfekte edilen PC14 hücrelerinin 0, 24, 48 ve 72. saatteki ölçümlerinin proliferasyon sonuçları sırası ile 1 ± 0.10 ; 1.26 ± 0.12 ; 1.83 ± 0.12 ve 1.71 ± 0.05 iken PTENG129R transekte edilenler sırası ile 1 ± 0.07 ; 1.22 ± 0.01 ; 1.49 ± 0.01 ve 1.65 ± 0.08 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5), PTENG129E kalıcı transfekte edilen PC 14 hücrelerinin 0, 24, 48 ve 72. saatteki proliferasyon sonuçları sırası ile 1 ± 0.01 ; 1.33 ± 0.01 ; 1.96 ± 0.16 ve 2.06 ± 0.08 olarak bulunurken (Şekil 4.6) PTEN wt kalıcı transfekte edilen PC 14 hücrelerinin 0, 24, 48 ve 72. saatteki ölçümleri ise sırası ile 1 ± 0.03 ; 1.42 ± 0.13 ; 1.11 ± 0.01 ve 1.64 ± 0.13 olarak bulunmuştur (Şekil 4.7).

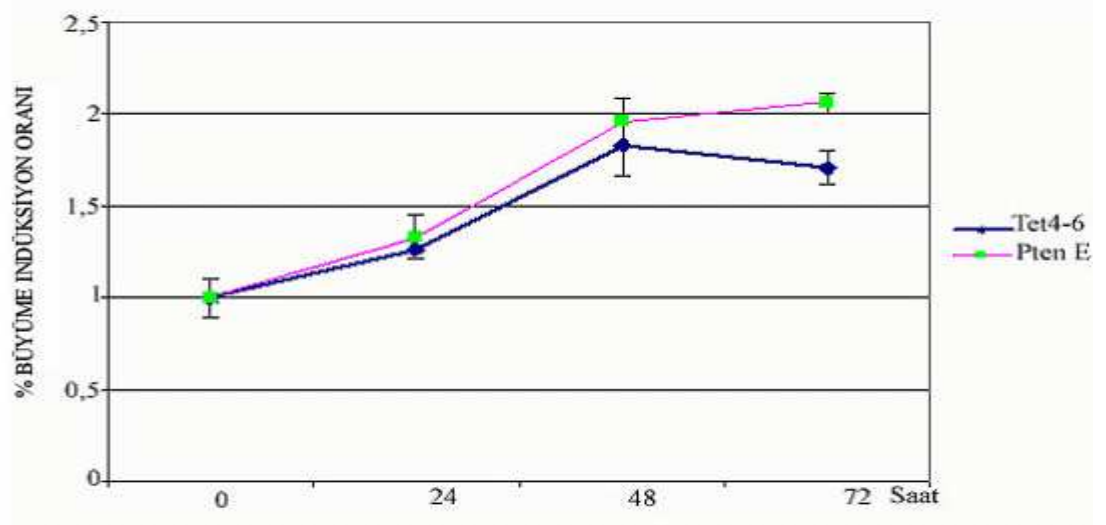
Bu sonuçlar ile yapılan istatistiksel çalışmada tüm gruplar arasında proliferasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,15$; $p>0,05$).

Tablo 4.3 Hücrelerin Büyüme İndüksiyon Oranı

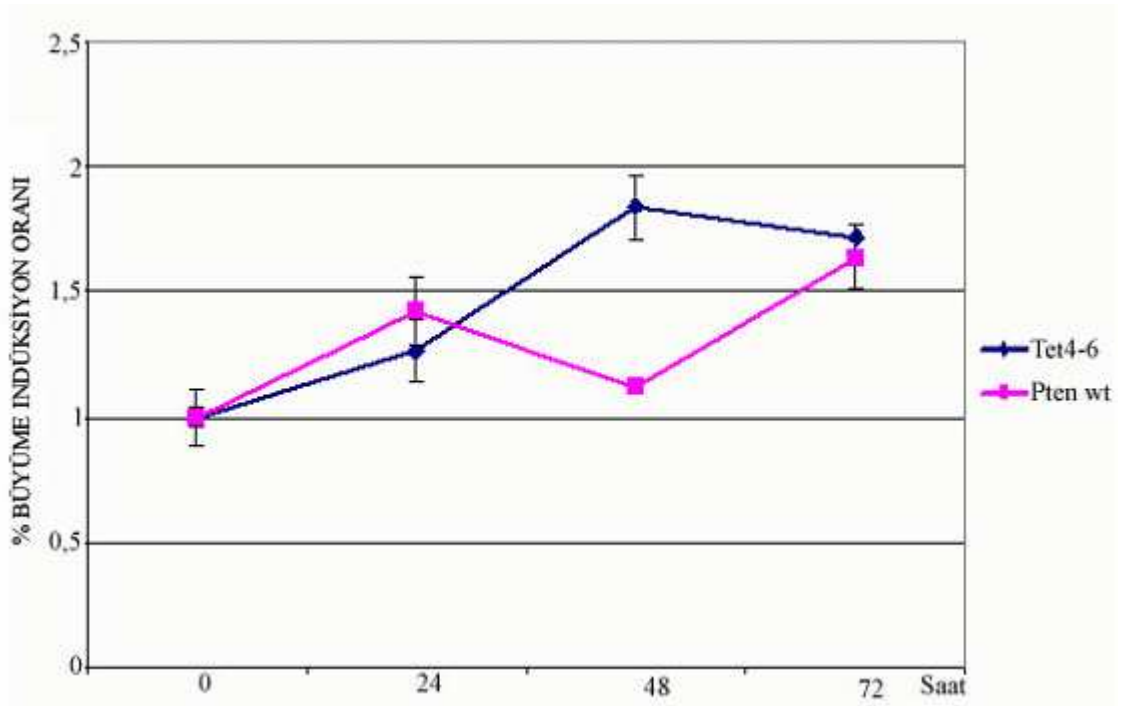
Büyüme İndüksiyon Oranı	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat
TET4/6	$1 \pm 0,10$	$1,263003 \pm 0,12$	$1,839174 \pm 0,12$	$1,713021 \pm 0,05$
PTEN WT	$1 \pm 0,03$	$1,423629 \pm 0,13$	$1,118143 \pm 0,01$	$1,64135 \pm 0,13$
PTEN129R	$1 \pm 0,07$	$1,227626 \pm 0,01$	$1,494964 \pm 0,01$	$1,657842 \pm 0,08$
PTEN129E	$1 \pm 0,01$	$1,332885 \pm 0,01$	$1,964558 \pm 0,16$	$2,064154 \pm 0,08$



Şekil 4.5 PTEN G129R ifadesinin PC 14 hücre proliferasyonuna etkisi



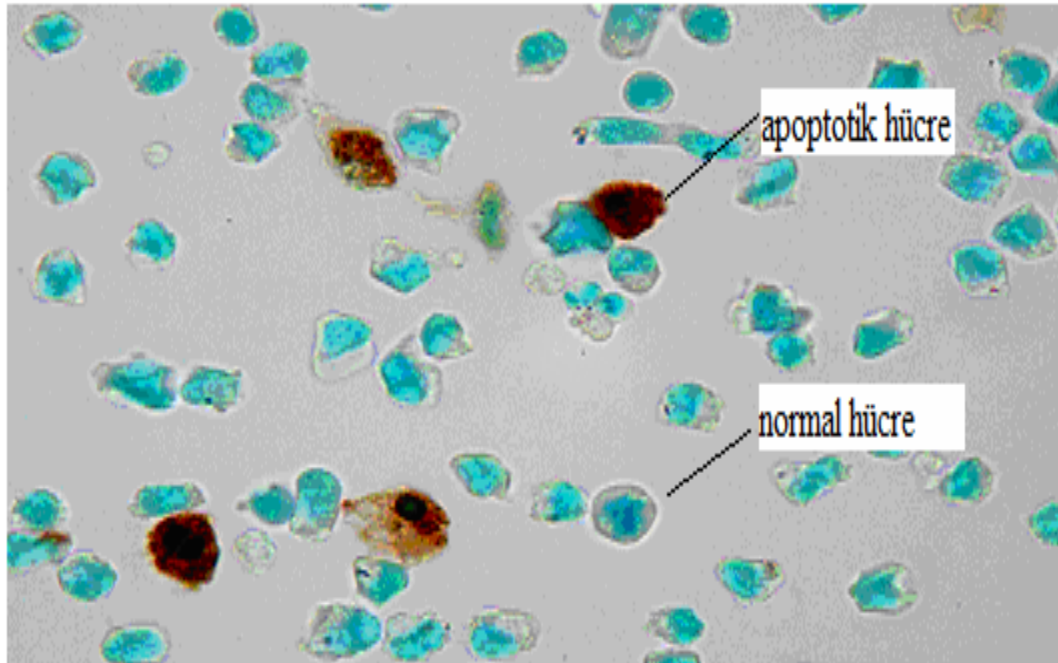
Şekil 4.6 PTEN G129E ifadesinin PC 14 hücre proliferasyona etkisi



Şekil 4.7 PTEN wt ifadesinin PC 14 hücre proliferasyona etkisi

4.5 PTEN İfadesinin Apoptozis Üzerine Etkisi

Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücrelerindeki PTEN ifadelerinin apoptozis üzerine etkisi de araştırılmıştır. Başlangıçtaki sayıları 1×10^4 hücre/ml olan boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücreleri tetrasiklin ile muamele edilen ve edilmeyen iki grup oluşturularak 0, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) testi uygulanarak apoptotik hücreler belirlenmiştir (Şekil 4.8). Canlı hücreler, apoptotik hücrelere oranlanarak yüzde apoptozis bulunmuştur.



Şekil 4.8 Apoptozise uğrayan PC14 hücreleri kahverengi boyanırken, apoptozise uğramayanlar mavi renkte boyanmaktadır

Boş vektör transfekte edilen PC 14 hücrelerinin 0, 24, 48 ve 72. saatteki apoptotik hücre sayıları sırası ile 1.2 ± 0.7 ; 2.2 ± 0.4 ; 3.2 ± 0.8 ve 2.6 ± 0.7 olarak saptanmıştır. Apoptotik olmayan normal hücre sayıları ise sırası ile 271 ± 44.6 , 310 ± 10.8 , 209 ± 34.2 ve 352 ± 35.4 olarak saptanmıştır. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere oranı ise $\%0.004 \pm 0.32$; $\%0.007 \pm 0.37$; $\%0.015 \pm 0.30$ ve $\%0.007 \pm 0.27$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.4), (Şekil 4.9).

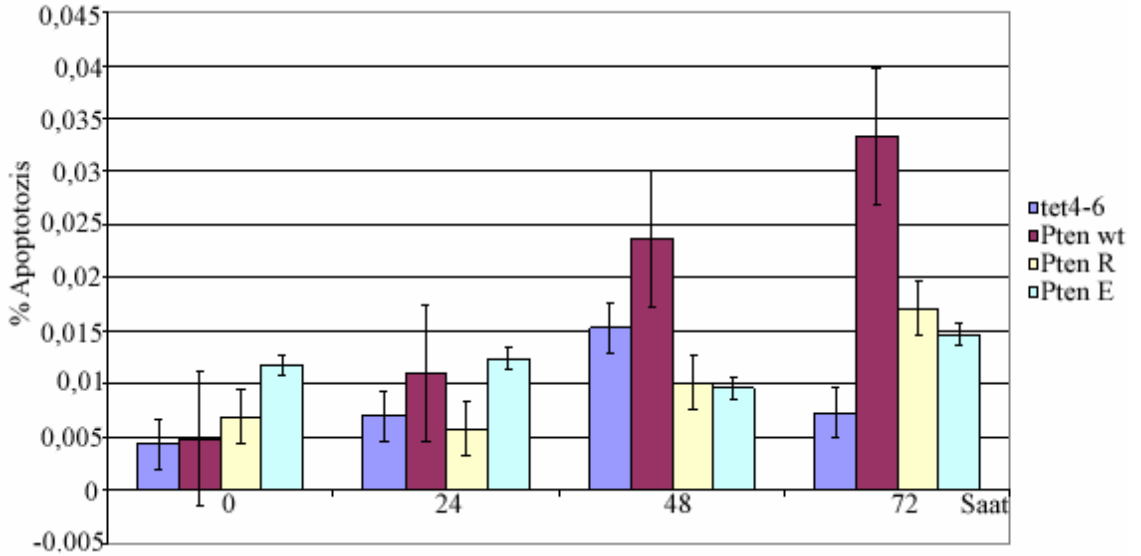
PTENG129R kalıcı transfektede edilen PC 14 hücrelerinin 0, 24, 48 ve 72. saat apoptotik hücre sayıları sırası ile 1 ± 0.6 ; 2 ± 0.4 ; 2.2 ± 0.4 ve 2.4 ± 0.7 olarak saptanmıştır. Apoptotik olmayan normal hücre sayıları ise sırası ile $172,4\pm33.8$, 342 ± 30.1 , $236,2\pm35.5$ ve 199 ± 22.3 olarak saptanmıştır. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere oranı ise $\%0.006\pm0.20$; $\%0.005\pm0.27$; $\%0.01\pm0.25$ ve $\%0.017\pm0.58$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.9)

PTENG129E kalıcı transfektede edilen PC 14 hücrelerinin 0, 24, 48 ve 72. saat apoptotik hücre sayıları sırası ile 1.2 ± 0.3 ; 2.4 ± 0.4 ; 2.4 ± 0.4 ve 3.6 ± 1 olarak saptanmıştır. Apoptotik olmayan normal hücre sayıları ise sırası ile 102 ± 12.5 ; 192.4 ± 22.9 ; 247.8 ± 35.5 ve 245.6 ± 22.3 olarak saptanmıştır. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere oranı ise $\%0.011\pm0.34$; $\%0.012\pm0.87$; $\%0.09\pm0.26$ ve $\%0.014\pm0.46$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.9).

PTEN wt kalıcı transfektede edilen PC 14 hücrelerinin 0, 24, 48 ve 72. saat apoptotik hücre sayıları sırası ile 1.2 ± 0.4 ; 2.2 ± 0.7 ; 3.2 ± 0.4 ve 8.8 ± 2.3 olarak saptanmıştır. Apoptotik olmayan hücre sayıları ise sırası ile 205.2 ± 26.4 ; 307 ± 22.3 ; 168.8 ± 4 ve 264.2 ± 33.8 olarak saptanmıştır. Apoptotik hücrelerin normal hücrelere oranı ise $\%0.004\pm0.14$; $\%0.01\pm0.45$; $\%0.02\pm0.42$ ve $\%0.03\pm1.39$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.9).

Tablo 4.4 Hücreleri Yüzde Apoptozis Oranları

	0 saat	24 saat	48 saat	72 saat
TET4/6	$0,00443\pm0.32$	$0,00709\pm0.37$	$0,01528\pm0.30$	$0,00739\pm0.27$
PTEN WT	$0,00487\pm0.14$	$0,01107\pm0.45$	$0,02370\pm0.42$	$0,03331\pm1.39$
PTEN129R	$0,00624\pm0.20$	$0,00585\pm0.27$	$0,01016\pm0.25$	$0,01709\pm0.58$
PTEN129E	$0,01176\pm0.34$	$0,01247\pm0.87$	$0,00969\pm0.26$	$0,01466\pm0.46$



Şekil 4.9 Boş vektör, PTENwt, PTEN G129E ve PTEN G129R transfekte edilen PC 14 hücrelerinin 0.-72. saatler arasında apoptotik hücre sayısının normal hücre sayısına oranı

4.6. PTEN İfadesinin Koloni Formasyonu Üzerine Etkisi

Başlangıçtaki sayıları 1×10^3 hücre/ml olan boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücreleri 10 cm çaplı petri kaplarına ekilerek 3 hafta boyunca %10 serum (FBS) içeren besiyerinde 37°C 'de CO_2 'li inkübatörde inkübe edilmişlerdir. Bütün hücrelere $2 \mu\text{g/ml}$ tetrasiklin hergün ilave edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücreler metanol ile fikse edilmiş ve toluiden blue boyası ile boyanarak PTEN ifadesinin koloni formasyonuna etkisini anlamak için $0,1 \text{ cm}$ 'den büyük koloniler sayılmıştır (Şekil 4.10).

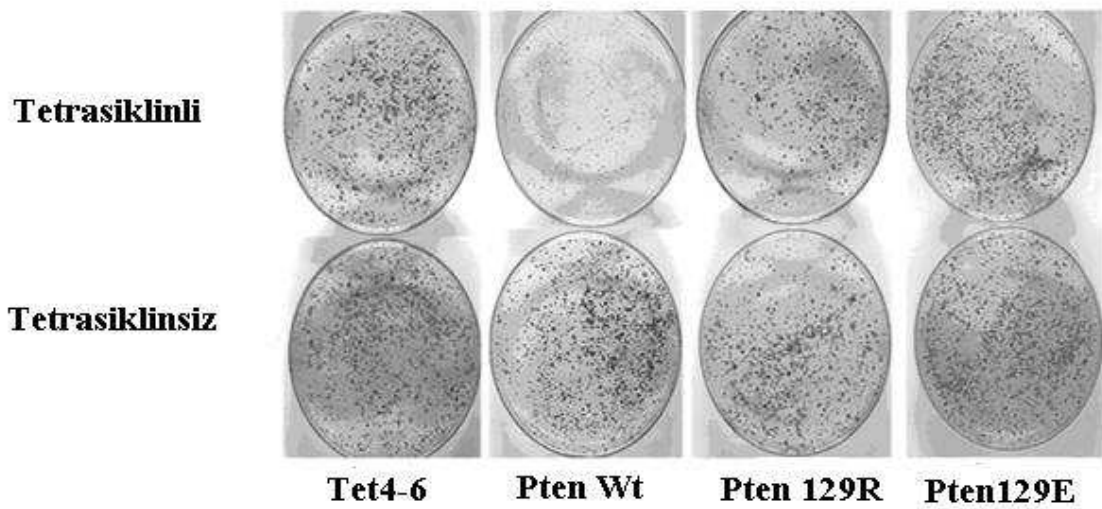
Boş vektör transfekte edilen PC 14 hücrelerinin koloni sayısı ortalama $40,6 \pm 1,5$ iken PTENG129R transfekte edilen PC 14 hücreleri koloni sayısı ortalama $39 \pm 2,6$, PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücreleri koloni sayısı ortalama 40 ± 2 ve PTEN wt transfekte edilen PC 14 hücreleri koloni sayısı ise $13,6 \pm 1,5$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.5), (Şekil 4.11).

Sonuç olarak, PTENG129R ve PTENG129E ifade eden hücrelerin oluşturdukları koloni sayıları boş vektör transfekte edilenler kadar olurken PTEN wt ifadesinin PC 14

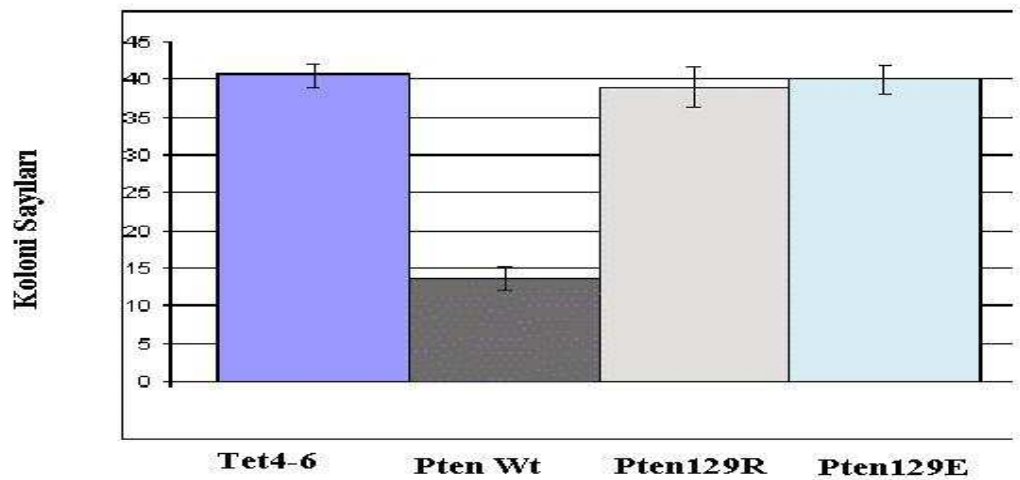
hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini yaklaşık % $64 \pm 3,53$ oranında baskıladığı saptanmıştır ($p < 0,05$).

Tablo 4.5 Hücrelerin Oluşturdukları Koloni Sayıları

Tet4-6	40.6±1.5
Pten wt	13.6±1.5
Pten129R	39±2.6
Pten129E	40±2



Şekil 4.10 Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücrelerinin koloni fotoğrafları .



Şekil 4.11 Boş vektör, PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücrelerinin koloni sayıları .

5. TARTIŞMA

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin birçoğunda PTEN geni delesyon veya promotor metilasyonu sonucunda ifade edilememektedir (Noro vd 2007). Bizim çalışmamızda kullandığımız küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre dizisi (NSCLC) PC 14 hücrelerinde PTEN geni promotörü metillendiği için ifade edilememektedir (Noro vd 2007). Araştırmamızda NSCLC hücresi dizisi PC 14 hücrelerine PTEN wt, PTENG129R ve PTENG129E başarılı bir şekilde kalıcı olarak transfekte edilmiş ve ifadesi western blot analizi ile gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.3). Ayrıca aynı sonuç TETON sisteminin de başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir. TETON sistemi sayesinde, tümör süpresör gen olan PTEN'in ifadesi 2 µg/ml tetrasiklin muamelesi ile sağlanırken ortamda tetrasiklin olmadığında ise aynı hücrelerde PTEN ifade edilememektedir. Bu durum bize çalışmamızda PTEN geninin istediğimiz zaman ifade edilebilmesine olanak sağlamıştır.

Sonuçlarımıza göre sadece PTEN wt transfekte edilen PC14 hücrelerinde invazyon kontrole oranla 67 ± 3.2 baskılanırken, PTENG129R ve PTENG129E ifadesinin PC 14 hücrelerinin invazyona bir etkisi bulunmamıştır. Bu sonuç bize PTEN'in PC14 hücrelerinin invazyonunu lipid fosfataz aktivitesi ile baskıladığını göstermektedir. Çünkü katalitik inaktif PTEN olan PTENG129R ve lipid fosfataz etkisi olmayan PTENG129E transfeksiyonları hücrelerin invazyonuna herhangi bir etki yapmamıştır.

PTEN, hem lipid fosfataz hem de protein fosfataz aktivitesine sahip çift etkili bir fosfatazdır (Knobbe vd 2002). PTEN lipid fosfataz aktivitesi ile fosfoinositol (3,4,5) tri fosfatın 3' ucundaki fosfatı defosforile ederek fosfoinositol (4,5) iki fosfata dönüştürür (Maehama ve Dixon 1998). PTEN Fosfoinositol 3 kinazın antagonistidir. PTEN'in protein fosfataz etkisi ise, fokal adezyon kinazı defosforile eder (Tang vd 2006). PTEN wt transfekte edilen PC 14 hücrelerinde ifade edilen PTEN çift etkili fosfatazdır. PTENG129E transfekte edilen PC 14 hücrelerinde ifade olan PTENG129E sadece protein fosfotaz aktivitesine sahip iken PTENG129R transfekte edilen PC 14 hücrelerinde ifade olan PTENG129R ise katalitik olarak inaktiftir (Kandasamy ve Srivastava 2002). Yani hem protein fosfataz hem de lipid fosfataz aktivesinden yoksun PTEN'dir.

PTEN geninin ifadesi lipid fosfataz etkisi ile fosfoinositol (3,4,5) tri fosfatı defosforile etmektedir (Maehama ve Dixon 1998). Fosfoinositol (3,4,5) tri fosfat, hücrede Akt'nin aktifleşmesine aracı olur (Maehama ve Dixon 1998). Aktifleşen Akt hücrede yaşamsal yollarda görev almaktadır. Akt, nükleer faktör kapp B'nin inhibitör kinazını (IKK) fosfatlar, fosfatlanan IKK, nükleer faktör kapp B'nin inhibitörünü fosfatlar (IKB) ve fosfatlanan IKB nükleer faktör kapp B'den ayrılarak stoplazmada degrave olur. IKB'nin degregasyonu sonucu nükleer faktör kapp B aktifleşir. Transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kapp B birçok hedef genin ifadesini sağlamaktadır (Stephens vd 2005). Len Stephens vd (2005) yaptıkları araştırmada nükleer faktör kapp B'nin ICAM (hücrelerarası hücre adezyon molekülü) ifadesinin artışına neden olduğunu ve ICAM'da hücrelerin integrine bağlanmasını sağlayarak invazyonu tetikleyici etkisi olduğunu göstermektedir. Bu çalışma bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Dolayısı ile PTEN ifadesi ile Akt fosforilasyonu bloke olmakta ve Nf-kB aktivasyonu düşerek hücre invazyonunu baskılanabilmektedir.

PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücrelerinde tekrardan yaratılan PTEN gen ekspresyonlarının hücre proliferasyonuna negatif veya pozitif yönde herhangi bir etkisi olmamıştır (Bkz. Şekil 4. 5-7).

PTEN gen ifadesinin glioma kanser hücrelerinin (Furnari vd 1998) ve NSCLC hücrelerinin (Han vd 2008) proliferasyonuna negatif yönde etki ettiği gösterilse de bizim sonuçlarımız bu çalışmalar ile aynı doğrultuda değildir. Literatürde Akt/MTOR, Akt/FOXO yolları üzerinden protein sentezinde artış ve hücre bölünmesine neden olarak hücre proliferasyonunu indüklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Furnari vd 1998, Han vd 2008). Furnari vd (1998) PTEN geninin PTENG129R ve PTENG129E mutantları ile yaptığı çalışmada, bu gen ifadelerinin kontrole oranla proliferasyona etkisinin olmadığını PTEN ifadesinin Akt'nin aktivasyonunu inhibe ederek proliferasyonu baskıladığını göstermişlerdir. Bu sonuç bizim sonuçlarımızla örtüşmektedir. Ayrıca PTEN ifadesinin proliferasyona etkisinin olmaması invazyonun sitotoksik etkiden kaynaklanmayan bir mekanizma ile baskılandığını da göstermektedir.

Fosfatlanan (aktif) Akt apoptozisten kaçışa neden olmaktadır (Stephens vd 2005). Aynı çalışmaları destekler nitelikte PTEN gen ifadesinin hücreyi apoptozise uğrattığını rapor eden yayın mevcuttur (Han vd 2008). Ancak bizim çalışmalarımızda 72 saat

sonunda PTEN wt gen ifadesine sahip hücrelerde apoptotik hücre sayısı, ile boş vektör ve mutant PTEN ifade eden hücreler arasında çok küçük farklar olsada bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p:0,89$, $p>0,05$) (Bkz. Şekil 25). Ancak bazı çalışmalarda PTEN wt transfekte edilen hücrelerde apoptozisin ancak radyoterapi uygulaması ile uyarıldığı gösterilmiştir (Pappas vd 2007). Bu sonuçlar bize PTEN geninin tek başına apoptozisi indükleyemediği, ancak başka yolların da baskılanması ile apoptozisin gerçekleşebildiğini düşündürmektedir. Furnari vd (1998) yaptığı çalışmada PTEN wt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte ettiği glioma hücrelerinde bu gen ifadelerinin apoptozisi indüklediğini rapor etmiştir. Bu çalışma bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

PTENwt, PTENG129R ve PTENG129E transfekte edilmiş PC 14 hücrelerinde PTEN gen ekspresyonunun koloni formasyonuna sadece PTEN wt baskılamıştır. Katalitik olarak inaktif PTEN olan PTENG129R'nın ifadesi ve protein fosfataz etkili PTENG129E'nin ifadesi hücrelerin koloni oluşturmaya üzerine etkisinin olmaması hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin baskılanmasının lipid fosfataz yolağının PTEN tarafından inhibisyonu ile olduğunu göstermektedir. PTEN'in kanser hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini ve invazyonunu baskılaması, metastazı da baskılayabileceğini gösterir. Dolayısı ile PTEN'nin ifade kaybı kanser hücrelerinde metastatik fenotip kazandırabilir.

PTEN ifadesinin yokluğu prostat kanserlerinde kanser derecelendirmesini orta dereceli tümör durumdan, agresif (ileri dereceli) tümör olarak adlandırılmasına neden olmaktadır (Shukla vd 2007). Karaciğer kanseri (Nakaniski vd 2002), meme kanseri ve meloma hücrelerinde (Lobo vd 2009) araştırmacıların yapmış oldukları, soft agar deneylerinde PTEN ifadesinin agar ortamında hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerini baskıladığı rapor edilmiştir. PTEN'in hücrelerin soft agarda koloni oluşturma yeteneklerinin baskılanmasını Akt inhibisyonu ve Nf-kB aktivitelerinin engellemesi yoluyla olabileceği düşünülmektedir (Nakaniski vd 2002, Lobo vd 2009). Ayrıca PTEN transfekte edilen PC-3 prostat kanser hücrelerinde (Gustin vd 2001) Nf-kB aktivitesinin düştüğü de rapor edilmiştir. AKT/NF-kB yolağının kanserin invazyon, metastaz ve anjiogenezinde rol alabileceğini gösteren yayınlar literatürde mevcuttur (Stephens vd 2005).

PTEN gen ifadesinin hücre göçünde baskılayıcı rol oynadığı da rapor edilmiştir (Heering vd 2009). PTEN gen ifadesinin fokal adezyon moleküllerinin ve stres fibrillerinin oluşumunu sınırladığı ve hücre göçünü baskıladığı bildirilmiştir (Heering vd 2009). Bu sonuçlar bize tümör baskılayıcı gen olan PTEN'nin invazyon ve metastazda rol alabileceğini açıkça göstermektedir.

PTEN wt ifadesi, lipid fosfataz etkisi ile PI3P'in defosforilasyonu ve dolayısı ile Akt'nin aktivasyonunu baskılamaktadır. Akt aktivasyonunun baskılanması, Akt'nin hedeflerinden Nf-kB'nin aktivasyonunun baskılanmasına neden olur. Yapılan çalışmalar Nf-kB'nin invazyon ve metastazda anahtar rol oynadığı göstermektedir (Stephens vd 2005). PTEN, hücrelerde Akt'nin fosfatlanmasını inhibe ederek hücrelerin yaşam ile ölüm arasındaki dengesini düzenler. PTEN wt varlığında kanser hücrelerinde invazyon ve metastaz baskılanmaktadır. PTEN yokluğunda ise kanser hücresi agresif karakter kazanmakta ve dolayısıyla invazyon ve metastaz ile uzak yayılım yapmasında rol oynamaktadır (Stephens vd 2005).

Biz çalışmamızda PTEN'nin, akciğer kanser hücresi olan PC 14 hücre dizisinde koloni oluşturma yeteneğini ve invazyonu baskıladığını gösterdik. Tümör baskılayıcı gen PTEN'in prostat kanserlerinde PI3K/Akt yolağından invazyonu baskıladığı bilinmektedir (Gustin vd 2001). Bizim çalışmamızda katalitik inaktif PTENG129R ve protein defosfataz aktif PTENG129E kullanılmıştır. Bu iki mutant PTEN ifadesinin PC 14 hücrelerinin invazyon ve koloni oluşturma yeteneklerinin baskılanmasında kontrol hücreleri ile aynı sonucu vermiştir. Bu sonuç akciğer kanserlerinde tümör baskılayıcı gen PTEN'nin, PI3K/Akt yolağından invazyonu ve koloni oluşturma yeteneğini baskıladığını göstermektedir. Dolayısı ile akciğer kanserlerinde PTEN ifadesinin yoksun olması PI3K/Akt yolağının da devamlı aktifleşmesine sebep olarak invazyonu ve metastazı indükleyebilir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücresi PC14 hücrelerine TETON sistemi ile boş vektör, PTEN wt, PTENG129R ve PTENG129E kalıcı olarak transfekte edilmiştir. Ardından hücrelerdeki PTEN ifadesi Western blot yöntemi ile gösterilmiştir.

PTEN wt transfekte edilen PC 14 hücrelerinde invazyon 67 ± 3.2 baskılanırken katalitik olarak inaktif PTEN (PTENG129R transfekte edilen NSCLC hücreleri) ve protein fosfataz aktif PTEN (PTENG129E transfekte NSCLC hücreleri)'in ifadesinin invazyon üzerine etkisi gözlenmemiştir. Bu sonuç PTEN'in invazyonu lipid fosfataz etkisi ile baskıladığını göstermiştir.

PTEN ifadesinin PC 14 hücrelerinde proliferasyon ve apoptozis üzerine etkisi gözlenmezken koloni formasyonunu sadece PTEN wt ifadesinin baskıladığı da çalışmamızda gösterilmiştir.

PTEN ifadesinin yokluğu kanser hücrelerine invaziv ve metastatik fenotip kazandırmaktadır. Kanser hücrelerinin evrelemede PTEN ifadesinin yokluğu kanserin daha ileri evresine geçişine olanak sağlamaktadır. Dolayısı ile tümör ameliyatları sonrası tanı kriterleri arasında PTEN ifadesinin incelenmesi gerekmektedir. Tümör hücrelerinde PTEN ifadesinin yokluğu, tümörün invaziv ve metastatik karakter de olmasına neden olur. Tümörün invaziv ve metastatik etkisinin olması tedavisini değiştirmektedir. Bu durumda kanser hücrelerinin gen ifadelerinin varlığı yada yokluğuna göre tümör evrelemesi yapılarak tedavi stratejileri belirlenebilir.

KAYNAKLAR

- Abraham J, Allegra C. J. and Gulley J. (2009) Klinik Onkoloji El Kitabı, Cem Parlak ve Alpaslan Mayadağı, *Nobel Tıp Kitabevi*, İstanbul, 35s.
- Alberts B, Alexander J., Jelina L., Martin R., Keith R. and Peter W. (2001) The Cell, *Garland Serunce Pub.*, New York, 34 chapter: 7s.
- Aparicio C. B, Renner O., Leal J. F. M. and Carnero A. (2007) PTEN, More than the AKT Pathway. *Carcinogenesis*, 28(7):1379–1386.
- Bireroğlu İ.Ü. (1996) Temel İç Hastalıkları. **Güneş kitapevi**, Ankara, 1391s.
- Bogenrieder T. and Herlyn M. (2003) Axis of Evil: Molecular Mechanisms of Cancer Metastasis. *Oncogene*, 22: 6524–6536.
- Chen J.S., Wang Q., Fu X. H, Huang X. H., Chen X. L., Cao L. Q., Chen L., Z., Tan H., Li W., Bi J. and Zhang L.J. (2009) Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR Pathway in Invasion and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatology Research*, 39: 177–186.
- Cooper M.C. and Hausman R.E. (2006) Hücreye Moleküler Yaklaşım, Neşe Atabey *İzmir Kitapevi*, İzmir, 635s.
- Demuth T. and Berens M. E. (2004) Molecular Mechanisms of Glioma Cell Migration and Invasion. *Journal of Neuro-Oncology* 70: 217–228.
- Dey A., Wong E., Kua N., Teo H. L., Tergaonkar V. and Lane D. (2008) Hexamethylene Bisacetamide (HMBA) Simultaneously Targets AKT and MAPK Pathway and Represses NFκB Activity. *Cell Cycle*, 7(23):3759-3767.
- 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.
- Franke T. F., Hornik C. P., Segev L., Shostak G. A. and Sugimoto C. (2003) PI3K/Akt and Apoptosis: Size Matters. *Oncogene*, 22:8983–8998.
- Ferraro B, Bepler G., Sharma S., Cantor A. and Haura E. B. (2005) EGR1 Predicts PTEN and Survival in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 23:1921-1926.
- Furnari F. B, Huang H-J. S. and Cavenee W. K. (1998) The Phosphoinositol Phosphatase Activity of PTEN Mediates a Serum-Sensitive G1 Growth Arrest in Glioma. *Cells Cancer Research*, 58:5002-5008.
- Gustin J. A, Maehama T., Dixon J. E. and Donner D. B. (2001) The PTEN Tumor Suppressor Protein Inhibits Tumor Necrosis Factor-induced Nuclear Factor κB Activity. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276 (29):27740–27744.

- Han S. W., Ritzenthaler J. D., Zheng Y. and Roman J. (2008) PPAR γ / β Agonist Stimulates Human Lung Carcinoma Cell Growth Through Inhibition of PTEN Expression: the Involvement of PI3K and NF- κ B Signals. *J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294: 1238–1249.
- Heering J., Erlmann P. and Olayioye M. A. (2009) Simultaneous Loss of the DLC1 and PTEN Tumor Suppressors Enhances Breast Cancer Cell Migration. *Exp. Cell. Res.*, 315: 2505-2514.
- Jiang B. H. and Liu L. Z. (2008) PI3K/PTEN Signaling in Tumorigenesis and Angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784:150–158.
- Kandasamy K. and Srivastava R. K.(2002) Role of the Phosphatidylinositol 3 Kinase/PTEN/Akt Kinase Pathway in Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-Inducing Ligand-Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Research*, 62:4929–4937.
- Knobbe C. B., Merlo A. and Reifemberger G. (2002) Pten Signaling in Gliomas. *Neuro-Oncology*, 4:196–211.
- Lim W.T., Zhang W.H., Miller C.R., Watters J. W., Gao F., Viswanathan A., Govindan R. and Mcleod H.L. (2006) PTEN and Phosphorylated AKT Expression and Prognosis in Early- and Late-Stage Non-Small Cell Lung cancer. *Oncology Reports* 17: 853-857.
- Liu D., Nakano J., Ishikawa S., Yokomise H., Uenob M., Kadotac K., Cheng M. U., Long Huang (2007) Overexpression of Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7) Correlates with Tumor Proliferation, and a Poor Prognosis in Non-Small Cell lung Cancer. *Lung Cancer*, 58:384—391.
- Lobo G. P., Waite K. A., Planchon S. M., Romigh T., Nassif N. T. and Eng C. (2009) Germline and Somatic Cancer-associated Mutations in the ATP binding Motifs of PTEN Influence Its Subcellular Localization and Tumor Suppressive Function. *HMG Advance Access published*, 5:1-51
- Maehama T. and Dixon J. E. (1998) The Tumor Suppressor, PTEN/MMAC1, Dephosphorylates the Lipid Second Messenger, Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *The Journal Of Biological Chemistry*, 273(22):13375–13378.
- Meng Q., Xia C., Fang J., Rojanasakul Y. and Jiang B. H. (2006) Role of PI3K and AKT Specific Isoforms in Ovarian Cancer Cell Migration, Invasion and Proliferation Through the p70S6K1 Pathway. *Cellular Signalling*, 18:2262–2271.
- Mori N., Kyo S., Sakaguchi J., Mizumoto Y., Ohno S., Miada Y., Hashimoto M., Takakura M. and Inoue M. (2007) Concomitant Activation of AKT with Extracellular Regulated Kinase Occurs Independently of PTEN or PIK3CA Mutations in Endometrial Cancer and may be Associated with Favorable Prognosis. *Cancer Sci* 98(12): 1881–1888.

- Nakanishi K., Sakamoto M., Yasuda J., Takamura M., Fujita N., Tsuruo T., Todo S. and Hirohashi S. (2002) Critical Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Anchorage-independent Growth and Hematogeneous Intrahepatic Metastasis of Liver Cancer. *Cancer Research*, 62:2971–2975.
- Noro R., Gemma A., Miyayama A., Kosaihiira S., Minegishi Y., Nara M., Kokubo Y., Seike M., Kataoka K., Matsuda K., Okano T., Yoshimura A. and Kudoh S. (2007) PTEN Inactivation in Lung Cancer Cells and the Effect of Its Recovery on Treatment with Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. *International Journal Of Oncology*, 31: 1157-1163.
- Ohashi R., Takahashi F., Cui R., Yoshioka M., Gu T., Sasaki S., Tominaga S., Nishio K., Tanabe K. K. and Takahashi K. (2007) Interaction Between CD44 and Hyaluronate Induces Chemoresistance in Non-small Cell Lung Cancer. *Cell Cancer Letters*, 252:225–234.
- Pappas G., Zumstein L. A., Munshi A., Hobbs M. and Meyn R. E. (2007) Adenoviral-mediated PTEN Expression Radiosensitizes Non-small Cell Lung Cancer Cells by Suppressing DNA Repair Capacity. *Cancer Gene Therapy*, 14:543–549.
- Sahai E. (2005) Mechanisms of Cancer Cell Invasion. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15:87–96.
- Samuels Y. and Ericson K. (2007) Oncogenic PI3K and Its Role in Cancer. *Curr Opin Oncol*, 18:77–82.
- 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.
- Strumane K., Song J. Y., Baas I. and Collard J. G. (2008) Increased Rac Activity is Required for the Progression of T-Lymphomas Induced by Pten-Deficiency. *Leukemia Research*, 32:113–120.
- Stephens L., Williams R. and Hawkins P. (2005) Phosphoinositide 3-Kinases as Drug Targets in Cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 5:357–365.
- Song L., Morris M., Bagui T., Lee F. Y., Jove R. and Haura E. B. (2006) Dasatinib (BMS-354825) Selectively Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells Dependent on Epidermal Growth Factor Receptor Signaling for Survival. *Cancer Res.*, 66 (11): 5542-5548.
- Tang J. M., Hea Q.Y., Guob R.X. and Chang X. J. (2006) Phosphorylated Akt Overexpression and Loss of PTEN Expression in Non-small Cell Lung Cancer Confers Poor Prognosis. *Lung Cancer*, 51:181—191.

Web1: (01.05.2009)

www.cdc.gov/nchs/PRESSROOM/08newsrelases/mortality2006.htm

01.06.2009

Web2: (01.05.2009) www.cdc.gov/nchs/data/databriefs/db18.htm 01.06.2009

Web3: (01.05.2009) www.cancer.org/downloads/stt/500809web.pdf 01.06.2009

Web4: (01.01.2005) seer.cancer.gov/csr/1975-2005 01.06.2009

Web5: (01.06.2009) Cancercontrol.cancer.gov 01.06.2009

Web6: (11.2008) biyokimya.uludağ.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf 01.06.2009

ÖZGEÇMİŞ

Aydın DEMİRAY 1979 yılında Serik'te doğdu. İlkokulu Çankırı'da, orta okulu Denizli'de, Sağlık Meslek Lisesini Eskişehir'de tamamladı. 2000-2002 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar önlisans programını, 2003-2005 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2006 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.