



**PI3K/Akt/mTOR VE/VEYA CALCINEURIN/NFAT
İNHİBİSYONUNUN PDGF İLE İNDÜKLENMİŞ TÜMÖR
HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİNİN İN-VİTRO
ARAŞTIRILMASI**

Harun ÜN

Biyokimya Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yasin BAYIR
Doktora Tezi-2018**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PI3K/Akt/mTOR VE/VEYA CALCINEURIN/NFAT
İNİBİSYONUNUN PDGF İLE İNDÜKLENMİŞ TÜMÖR
HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİNİN İN-VİTRO
ARAŞTIRILMASI**

Harun ÜN

**Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yasin BAYIR**

**ERZURUM
2018**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**PI3K/Akt/mTOR VE/VEYA CALCINEURIN/NFAT
İNİHİBSİYONUNUN PDGF İLE İNDÜKLENMİŞ TÜRÖR HÜCRE
PROLİFERASYONUNA ETKİSİNİN İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Harun ÜN

Tez Savunma Tarihi : 08/06/2018
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yasin BAYIR (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi) 
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ (Erzurum Teknik Üniversitesi) 
Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Muhammed YAYLA (Kafkas Üniversitesi) 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM – 2018

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.2. Kanser Türleri	4
2.3. Kanser Oluşum Mekanizmaları	6
2.4. Kanser İlişkili Hücre Yüzeyi Reseptörleri.....	7
2.4.1. Reseptör Tirozin Kinazlar ile Sinyal İletimi.....	8
2.4.1.1. PDGF Reseptörü	8
2.4.2. G Protein Reseptörü ile Sinyal İletimi	9
2.4.3. Sitokin Reseptörleri ile Sinyal İletimi	9
2.5. Kanser ilişkili Sinyal Yolakları.....	10
2.5.1. Ras/Raf/MAPK Sinyal Yolağı.....	10
2.5.2. JAK/STAT Sinyal Yolağı.....	11
2.5.3. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı.....	11
2.5.3.1. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı İnhibitörleri	12

2.6. Kanser ve İmmün Sistem İlişkisi	14
2.6.1. Kanser İmmünoterapisinde Hücresel Mekanizmalar.....	15
2.6.1.1. T-Hücreleri.....	15
2.6.1.2. Antijen Sunucu Hücreler	16
2.6.2. İmmün Sistem İlişkili Yolaklar.....	16
2.6.2.1. T-Hücre Aktivasyonunda IL-2 Yolağı.....	17
2.6.2.2. Calcineurin/NFAT yolağı	17
2.6.3. İmmünosüpresan ilaçlar	18
2.6.3.1. Siklosporin	19
2.6.3.2. FK506	19
3. MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Hücre Kültürü ve Uygulamaları	21
3.1.1.1. İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Kültürü	21
3.1.1.2. Hücre Sayımı ve Ekimi.....	21
3.1.2. Kullanılan İlaçlar ve Doz Hesaplamaları.....	23
3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar	24
3.2. Metot.....	25
3.2.1. Deney Planı ve Gruplar.....	25
3.2.2. Hücre Proliferasyon Analizi	26
3.2.3. Moleküler Analizler	26
3.2.3.1. RNA Sentezi ve Real-Time PCR Analizi	26

3.2.4. Biyokimyasal Analizler	27
3.2.4.1. Akım Sitometri Uygulaması ile Apoptoz Testi	27
4. BULGULAR.....	30
4.1. Hücre Proliferasyon Bulguları	30
4.2. Moleküler Bulgular.....	31
4.2.1. MCF-7 hücrelerinin 24. Saat Bax, p53, Caspase 9, NFκB, IL-2 ve PDGFRβ mRNA Ekspresyon Sonuçları.....	31
4.3. Biyokimyasal Bulgular	37
4.3.1. Akım Sitometri ile Apoptoz Analiz Sonuçları.....	37
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	52
EKLER	67
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	67
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	68

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve enerjisi ile ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, akademik geleceğim için yoğun çaba gösteren ve maddi-manevi tüm imkânları sağlayan, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışmanım Prof. Dr. Yasin BAYIR'a tez çalışmam boyunca sağladığı sonsuz destek için teşekkürlerimi sunuyorum.

Akademik gelişimimde çok büyük emeği olan, Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca bana her türlü imkânı sağlayan ve daha uzun yıllar bilgi birikimden faydalanacağım kıymetli hocam Prof. Dr. Zekai HALICI'ya teşekkürlerimi sunarım. Bilgilerini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mine GÜLABOĞLU'na ve lisansüstü eğitimim boyunca bana yardımcı olan başta Prof. Dr. Elif ÇADIRCI olmak üzere tüm Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım boyunca ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan değerli çalışma arkadaşlarım Dr.Öğretim Üyeleri Rüstem Anıl UĞAN, Muhammed YAYLA ve İrfan ÇINAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca eğitim hayatım boyunca bana destek veren aileme sevgileri, sabırları ve fedakârlıkları için şükranlarımı iletirim.

Harun ÜN

ÖZET

PI3K/Akt/mTOR ve/veya Calcineurin/NFAT inhibisyonunun PDGF ile indüklenmiş tümör hücre proliferasyonuna etkisinin in-vitro araştırılması

Amaç: Bu çalışmanın amacı MCF-7 hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR ve Calcineurin/NFAT yolları arasındaki ilişkinin incelenmesi ve bu yolların inhibisyonlarının PDGF ile indüklenmiş tümör hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: PDGF (100 ng/ml), Akt inhibitörü (5 µM) ve FK506 (1 µM) MCF-7 hücrelerine uygulanarak tümör hücre proliferasyonu, apoptoz seviyeleri ve apoptotik gen ekspresyonları analiz edildi. Real Time-PCR ile 24. saat Bax, p53, Caspase 9, NFκB, IL-2 ve PDGFRβ gen ekspresyonları belirlendi. Ayrıca akım sitometri cihazı ile 60 ve 120. dakikalardaki Annexin V/PI apoptoz seviyeleri tespit edildi.

Bulgular: PDGF uygulaması hücre proliferasyonunu artırırken, Akti ve FK506 uygulamalarının proliferasyonu azalttığını gördük. Annexin V/PI sonuçlarımıza göre Akti ve FK506'nın MCF-7 hücrelerini apoptoza götürdüğünü belirledik. Tümör baskılayıcı p53, anti-apoptotik protein NFκB ve apoptotik genler Bax ve Caspase 9 ekspresyon sonuçlarımıza bakıldığında, PDGF ile indüklenen hücrelere karşın Akti ve FK506'nın birlikte uygulamalarının olumlu etkilerini gördük. Ayrıca PDGF ve FK506 uygulamalarının PDGFRβ ekspresyonunu azalttığını, Akt inhibitörünün artırdığını tespit ettik. PDGF uygulaması IL-2 ekspresyonlarını artırırken, FK506 uygulamasının IL-2 gen ekspresyonlarını azalttığını gördük.

Sonuçlar: Bu çalışma, FK506'nın in-vitro ortamda meme kanseri hücrelerini apoptoza götürdüğünü ve Akt inhibitörü ile birlikte FK506 uygulamasının PDGF ile indüklenmiş tümör hücre proliferasyonlarını baskılayabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Calcineurin/NFAT, IL-2, MCF-7, PDGFRβ, PI3K/Akt/mTOR, proliferasyon

ABSTRACT

In-vitro investigation of PI3K/Akt/mTOR and/or Calcineurin/NFAT inhibition on PDGF-induced tumor cell proliferation

Aim: The aim of this study is to investigate the relation between PI3K/Akt/mTOR and Calcineurin/NFAT pathways in MCF-7 cells and to investigate the effects of inhibition of these pathways on tumor cell proliferation.

Material and Method: Tumor cell proliferation, apoptosis levels and apoptotic gene expressions were analyzed by applying PDGF (100 ng/ml), Akt inhibitor (5 μ M) and FK506 (1 μ M) to MCF-7 cells. Bax, p53, Caspase 9, NF κ B, IL-2 and PDGFR β gene expressions was determined by Real Time-PCR at 24th hour. Also Annexin V/PI apoptosis levels were determined by flow cytometry at 60th and 120th minutes.

Results: This study showed that Akti and FK506 administrations decreased proliferation while PDGF administration increased cell proliferation. Based on our Annexin V/PI results, we determined that Akti and FK506 treatments led MCF-7 cells to apoptosis. Looking at the expression results of tumor suppressor p53, anti-apoptotic protein NF κ B and apoptotic genes Bax and Caspase 9, we have found positive effects of the combined administration of Akti and FK506 against PDGF-induced cells. We have also found that PDGFR β gene expressions were decreased by PDGF and FK506 administration and increased by Akt inhibitor. While PDGF administration increased IL-2 expression, FK506 administration decreased IL-2 gene expression.

Conclusions: This study has shown that FK506 induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and the combined administration of FK506 and Akt inhibitor can suppress PDGF induced tumor cell proliferation.

Key words: Apoptosis, Calcineurin/NFAT, IL-2, MCF-7, PDGFR β , PI3K/Akt/mTOR, proliferation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Akt	: Protein Kinaz B
ASH	: Antijen Sunan Hücreler
AV	: Annexin V
Ca⁺²	: Kalsiyum
CaN	: Kalsinörin
CD4⁺	: Yardımcı T-hücre
CD8⁺	: Sitotoksik T-hücre
cDNA	: Complementary DNA
cm²	: Santimetrekare
CO₂	: Karbondioksit
DCC	: Dextran-Coated Charcoal
dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EGF	: Epidermal Growth Factor
ERK	: Extracellular signal Regulation Kinaz
FBS	: Fetal Bovine Serum
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FK506	: Tacrolimus
FKBP12	: FK506 bağlayıcı immünofilin proteini
GDP	: Guanozin difosfat
GTP	: Guanozin trifosfat
IGF	: Insulin Growth Factor

IL-2	: İnterlökin-2
JAK	: Janus Kinaz
MAPK	: Mitogen Activated Protein Kinaz
MCF-7	: İnsan Meme Kanseri hücre hattı
MEK	: Mitogen Extracellular signal Kinaz
MHC class I	: Major Histocompatibility Complex class I
MHC class II	: Major Histocompatibility Complex class II
ml	: Mililitre
mRNA	: Messenger Ribonükleik asit
mTOR	: Mammalian Target of Rapamisin
mTORC1	: mTOR kompleks 1
mTORC2	: mTOR kompleks 2
NFAT	: Nuclear factor of activated T-cell
NFATc	: Sitozolik Nuclear factor of activated T-cell
NFκB	: Nükleer Faktör Kappa Beta
ng	: Nanogram
°C	: Santigrat derece
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PCR	: Polimer Chain Reaction
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	: PDGF reseptörü
PDK1	: Phosphoinositide Dependent Kinaz-1
PI	: Propidyum İyodür
PI3K	: Fosfatidil inositol-3-kinaz
PIP2	: Fosfatidil inositol 4,5 difosfat

PIP3	: Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfat
PSA	: Penisilin Streptomisin Amfoterisin
PTEN	: Protein Tensin Homolog
rpm	: Rotation per minute
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
STAT	: Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF	: Transforming Growth Factor
THR	: T-hücre reseptörleri
TIA	: Tümör İlişkili Antijenler
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör alfa
TSA	: Tümör Spesifik Antijenler
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. PI3K/Akt/mTOR yolağı.....	11
Şekil 2.2. Akt inhibitör IV.....	13
Şekil 2.3. Calcineurin/NFAT yolağı.....	18
Şekil 2.4. FK506 (Tacrolimus).....	20
Şekil 4.1. xCelligence hücre empedans grafiğı.....	30
Şekil 4.2. Bax mRNA ekspresyonları.....	31
Şekil 4.3. p53 mRNA ekspresyonları.....	32
Şekil 4.4. Caspase 9 mRNA ekspresyonları.....	33
Şekil 4.5. NFκB mRNA ekspresyonları.....	34
Şekil 4.6. IL-2 mRNA ekspresyonları.....	35
Şekil 4.7. PDGFRβ mRNA ekspresyonları.....	36
Şekil 4.8. 60 dk'lık Annexin V/PI Apoptoz Seviyeleri.....	39
Şekil 4.9. 120 dk'lık Annexin V/PI Apoptoz Seviyeleri.....	41

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	24
Tablo 3.2. Deney grupları ve ilaç dozları.....	25
Tablo 3.3. Primer Sekansları.....	27
Tablo 4.1. Hücre canlılığı ve apoptoz yüzdeleri.....	37



1. GİRİŞ

Kanser, insan vücudundaki bir grup hücrenin kontrolsüz olarak büyüdüğü ve hücre bölünmesi kurallarını bozduğu karmaşık bir hastalıktır.¹ Dünya sağlık örgütünün verilerine göre bir yılda yaklaşık 14 milyon insan kanserden etkilenmekte ve 9 milyon insan kanser sebebiyle hayatını kaybetmektedir.² Yaklaşık 200 farklı kanser türü tanımlanmıştır. Hücre proliferasyonu ve metastaz tüm kanser türlerinde ortak sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde hem kanser oluşum mekanizmaları hem de hücre proliferasyonu ve metastazına etki eden faktörler bütünüyle ele alınmaktadır.

Kanser progresyonunda bir dizi genetik değişiklikler ortaya çıkar. Özellikle tümör baskılayıcı genlerin yapısal bozukluğu gözlemlenmektedir.³ Bu genetik yapı değişikliğinin yanı sıra kanserin ilerlemesinde birçok hücre içi mekanizma aktive olur. Hücre içi yolların aracılık ettiği sinyal iletimi en önemli hücre içi mekanizmalardan biridir. Kanser hücrelerinin bölünme ve yayılım hızı reseptörlere bağlı olarak aktive olan sekonder habercilerden ve sinyal yollarından etkilenir.⁴ Özellikle büyüme faktör reseptörleri hücre proliferasyonunda oldukça etkilidir.^{5, 6} Platelet Derived Growth Factor (PDGF)'nin hücre proliferasyonunu, hücrel farklılaşmayı, hücre büyümesini, gelişimini ve kanser dahil birçok hastalığı düzenlediği bilinmektedir.⁷

PDGF reseptörü üzerinden aktive olan birçok sinyal yolağı kanser hücrelerinin proliferasyonuna katkı sağlamaktadır.⁷ Bu yollardan biri olan PI3K/Akt/mTOR (Fosfatidil inositol-3-kinaz/Protein Kinaz B/mammalian Target of Rapamisin) yolağı da, PDGF ve diğer büyüme faktörleri ile aktive olup, hayatta kalma, çoğalma, hareketlilik, metabolizma ve anjiogenez gibi çeşitli hücrel işlemleri kontrol eder.^{8, 9} Bu sekonder habercilerin herbirinin (PI3K, Akt ve mTOR) inhibitörleri kanser tedavisinde hedef haline gelmiştir. Özellikle mTOR ve Akt inhibisyonlarının

proliferasyon üzerindeki baskılayıcı etkileri bilinmektedir.¹⁰ PI3K/Akt/mTOR yolağının hücre içi sinyal iletiminde etkili olduğu bilinmesine rağmen, bu yolağın hücre içi sinyal iletiminden sorumlu diğer yollar ile proliferasyon üzerine muhtemel ilişkileri bilinmemekte olup, araştırılması gereken bir konu olarak birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir.^{11, 12}

Hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) artışı da birçok hücresel mekanizmayı harekete geçirir.¹³ Bunlardan en önemlisi hücre içi Ca^{+2} artışının hücre proliferasyonunu artırmasıdır.¹⁴ Sitoplazmadaki Ca^{+2} artışına bağlı olarak Ca^{+2} -kalmodulin kompleksi meydana gelir. Aktive olan Ca^{+2} -kalmodulin kompleksi Calcineurin'i (CaN) aktive eder. Aktive olmuş CaN, İnterlökin-2 (IL-2) gen ekspresyonunu sağlayan sitozolik Nuclear factor of activated T-cell (NFATc)'yi aktive eder. Özellikle T-hücrelerinin aktivasyonunda rol oynayan Calcineurin/NFAT yolağının hücre içi sinyal yollarıyla ilişkisi kanser çalışmalarında önemli bir hedef haline gelmiştir. FK506 (Tacrolimus) ve siklosporin A bilinen CaN inhibitörleridir. CaN inhibitörlerinin immünsüpresif bir ilaç olmasına rağmen, malign hücreler üzerinde anti-proliferatif etkileri olduğu gösterilmiştir.^{15, 16}

PDGF'ye bağlı aktive olan ve tümör hücrelerinin proliferasyonlarını artıran sinyal yollarının tek başına inhibe edilmesinin hücre çoğalmasına karşı yetersiz kaldığı gösterilmiştir.⁵ Dolayısıyla hücre proliferasyonunda rol oynayan bu sinyal yollarının tek başlarına veya ilişkili oldukları diğer yollarla birlikte inhibisyonlarının kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması bazı araştırmacılarında ilgi odağı haline gelmiştir.^{11, 12} Bu kapsamda PDGF ile indüklenmiş kanser hücrelerinde Calcineurin/NFAT yolağının inhibisyonu, immün sistem ve hücre proliferasyonu arasındaki muhtemel ilişkilerin aydınlatılmasında önemli olacağı düşünülmektedir. Literatürde farklı yolların birbirleri üzerine etkileri konusunda çok

farklı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak immünosüpresan olarak kullanılan FK506'nın PDGF ile indüklenen hücrelerdeki apoptotik etkisi ve PI3K/Akt/mTOR yolu inhibitörleri ile birlikte kullanımının meme kanseri hücre (MCF-7) proliferasyonundaki etkisi araştırılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı PDGF ile indüklenmiş MCF-7 hücrelerinde; PI3K/Akt/mTOR ve Calcineurin/NFAT sinyal yolakları arasındaki muhtemel ilişkiyi incelemek ve bu yolakların tek başlarına ve birlikte inhibisyonlarının, kanser hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu üzerindeki etkilerini araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve vücudun diğer bölümlerine yayılması ile karakterize bir hastalıktır.¹ Milyarlarca hücrenin bulunduğu insan vücudunda kanser herhangi bir dokuda ya da kanda oluşabilir. Normal koşullarda sağlıklı hücre vücudun ihtiyacına göre büyür ve bölünerek yeni hücre oluşturur. Eğer hücre yaşlanır ya da zarar görürse hücre apoptozise uğrar ve yerini yeni hücrelere bırakır. Kanseri hücrelerinde ise bu sistem çalışmaz hale gelmektedir. Yaşlı ve hasar görmüş hücreler hayatta kalmakta ve ihtiyaç olmadığı halde hasarlı yeni hücrelerin oluşumu devam etmektedir.¹⁷ Kanseri hücreleri, sağlıklı hücreleri ve kan damarlarını çevreleyerek kendisine yeni bir mikro çevre oluşturur. Bu mikro çevre de tümör büyümesi için gerekli olan oksijen ve besini sağlayacak yeni kan damarı oluşumuna yani anjiyogeneze neden olmaktadır.¹⁷ Kanseri hücrelerinin bu kadar kontrolsüz şekilde bölünmesi ve büyümesi hastalığın tedavisini oldukça zorlaştırmaktadır.

Dünya genelinde bir yılda yaklaşık 14 milyon insan kanserden etkilenmekte ve bu insanların yaklaşık 9 milyonu hayatını kaybetmektedir.² En sık karşılaşılan kanseri türleri kadınlarda meme kanseri, erkeklerde prostat kanseridir. En fazla ölüm oranı ise akciğer kanseri hastalarında görülmektedir.¹⁸ Türkiye’de de bu durum dünya geneli ile benzerlik göstermektedir. Ülkemizde bir yılda yaklaşık 175 bin insana kanseri teşhisi konmakta ve ilk sırayı meme ve akciğer kanseri almaktadır.¹⁹

2.2. Kanseri Türleri

Kanseri türü adını vücudun ilk ortaya çıktığı yerinden alır ve çoğunlukla akciğer, meme, prostat, kolon, mide, pankreas, deri ve over kanseri ile karşılaşılır. Yaklaşık 200 farklı kanseri türü tanımlanmıştır. Kanseri türleri kaynaklandıkları hücrelere ya da dokusal yapılara göre alt sınıflara ayrılır. En yaygın kanseri türleri; karsinoma, sarkoma

ve lösemi sınıfları altında toplanır. Karsinoma sınıfı kanserler; akciğer, kolon, prostat ve meme kanserleri gibi epitel hücre kaynaklı kanser türleridir. Sarkoma kanser türleri ise kemikte ve lenf damarları, kan damarları gibi yumuşak dokularda oluşurlar. Bir diğer kanser türü ise lösemidir. Lösemi kemik iliği ve kan hücrelerinin oluşturduğu kanser türüdür.

Kanser türlerinin çoğu doku kitlelerinden oluşan tümör formundadır. Ancak her tümör kanser olarak adlandırılmaz. Tümörler iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) olmak üzere ikiye ayrılır. İyi huylu tümörler çoğalmalarına rağmen yayılmaz ve invaze olmazlar. Kanser olarak adlandırılan kötü huylu tümörler ise çevre dokuya yayılım gösterirler. Kanser hücreleri primer olarak ortaya çıktıkları dokudan başka dokulara invazyonu lenf sistemleri ya da kan dolaşımıyla yaparlar. Kanserin bu göç hareketine metastaz denir.^{20, 21(s.4)} Metastaz malign kanser hücresinin en belirgin özelliklerinden biridir.

Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada en yaygın kanser türlerinden biri olup, ülkemizde kadınlar arasında en fazla tanı konulan kanser türüdür.¹⁹ Dünya genelinde 2011 yılında yaklaşık 500 bin insanın meme kanseri sebebiyle öldüğü bildirilmiştir.² Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %45'inin 50-69 yaş arasında olduğu, %40'ının ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir.¹⁹

Meme kanseri meme epitel hücrelerinden kaynaklanır. Birçok meme kanseri türü bulunmasına rağmen en çok karşılaşılanları; duktal karsinoma in-situ, lobüler karsinoma in-situ, infiltrate duktal karsinoma in-situ ve infiltrate lobüler karsinoma in-situ dur. Literatürde meme kanseri üzerine yapılmış birçok in-vivo^{22, 23} ve in-vitro²⁴ çalışmalar bulunmaktadır. Kanser hücre kültürü çalışmalarında ise en çok MCF-7, T-47D ve MDA-MB-231 hücre hatları kullanılmaktadır.^{24, 25}

2.3. Kanser Oluşum Mekanizmaları

Kanser genetik bir hastalıktır ve progresyonu bir dizi genetik değişikliklere bağlıdır. Normal bir hücrenin invaziv kanser hücresine dönüşmesi 5-20 yıl sürer. Bu durum kalıtsal faktörlerden etkilendiği gibi somatik genetik değişikliklerden de etkilenir.³ Bazı genetik onkojenik değişiklikler kontrolsüz büyümeye ve yaşlanmanın kaybolmasına sebep olur. Onkojenler, deoksiribo nükleik asit (DNA) transkripsiyon faktörlerini, hücre döngüsündeki kritik düğümleri ya da kalıcı büyüme uyarıcı sinyal yollarını aktive ederek kontrolsüz büyümeye neden olurlar. Normal hücrelerde onkojen ve tümör baskılayıcı genler belirli bir seviyede ve denge halinde bulunurken, DNA'daki bazı mutasyonlar, onkojeni aktive edebilir veya tümör baskılayıcı genleri inaktive edebilir.³

Kanserler neredeyse her zaman tek bir ana somatik hücreden türetilir. Kanser sonucu ortaya çıkan neoplazm hücreleri, gen aktivitesinde ve fenotipte hasara neden olan bir dizi genetik değişiklik içerir.²⁶ Normal bir hücrenin tam teşekküllü bir invaziv karsinoma hücresine dönüşmesi için bir seri olaylar dizisine ihtiyaç duyulmaktadır.²⁷ Birinci adımda gelişen mutasyonla hücre proliferasyonu artar ve bu da ikinci ve diğer mutasyonlar için hedef hücre popülasyonunu sağlamış olur. Bu seri mutasyonlar DNA ve kromozom yapısında değişikliklere yol açar. Kanserdeki bu çok adımlı genetik mutasyonlar benign tümörün adım adım malign tümöre dönüştüğünü gösterir.²⁷

Kansere neden olan mutasyonlar genellikle hücre büyümesini, hücre döngüsünü düzenleyen genleri veya programlanmış hücre ölümü apoptozu etkiler. Bu seri olaylar hücre fizyolojisinde 6 basamakta gerçekleşmektedir.

1. Hücre proliferasyonunun artması,
2. Büyüme faktörü sinyallerinin kendiliğinden aktive olması,
3. Büyüme faktörünü inhibe eden sinyallerin inaktivasyonu,

4. Hücre ölümsüzlüğünün kazanılması,
5. Kan damarlarının gelişimi, anjiyogenez,
6. İnvazyon ve metastaz.^{21(s.67)}

Temel olarak kanserler büyüme avantajı mutasyonu kazanmış bir grup hücreden ortaya çıkar.²⁸ Normal hücre bölünmesi esnasında meydana gelen mutasyonlar çevresel faktörlerden kaynaklanabildiği gibi somatik mutajenler aracılığıyla da gerçekleşebilir. Kanserde bu mutasyonların DNA onarım sistemi ile düzeltilmesi mümkün değildir. DNA onarım sistemi genleri tümör baskılayıcı gen ailesinden olup bu genlerdeki mutasyonlar hücre popülasyonunun büyümesine selektif bir avantaj sağlar. Diğer taraftan onkojenlerde meydana gelen proliferatif sinyalizasyonun sürdürülmesi, anjiyogenezin tetiklenmesi, invazyon ve metastazın aktive edilmesi hücreye gerekli olan besin ve enerjiyi de sağlayarak kanserin daha da büyümesini sağlayabilir.

2.4. Kanser İlişkili Hücre Yüzeyi Reseptörleri

Yüzey reseptörleri, hücrenin dış ortama açılmasını sağlayan bir pencere görevi üstlenen sensörleridir.^{3(s.46)} Hücre çevresindeki ortamla bu reseptörler aracılığıyla etkileşir. Bir ligandın reseptörüyle spesifik bağlanması devamında hücre içi bir seri biyokimyasal olayın aktivasyonunu sağlar. Bu hücre dışı sinyallerin düzenlenmesinde birçok sınıf reseptör rol alır. Bunlar üç ana başlık altında reseptör tirozin kinazlar (RTK), G-protein reseptörleri ve sitokin reseptörleri olarak incelenir. Hücre içi iletim kaskadını düzenleyen moleküller ise sekonder habercilerdir. Bu biyokimyasal sinyallerin çekirdeğe iletilmesi, mitojenik, hayatta kalma ve farklılaşma yanıtlarında yer alan çok çeşitli genlerin değişen ifadesine yol açar.^{29(s.17)} Herhangi bir sinyal yolağının üyesi, onkojenik mutasyon için potansiyel bir hedef olabilir.^{3(s.46)}

Hücre içi sinyal yolaklarının birçoğu hücre döngüsünde etkilidir ve bu sinyaller hücreyi yeniden bölüneceği ana kadar geri planda tutar ve bölünme vakti geldiğinde

tekrar sinyal vererek hücrenin bölünmesini sağlar. Bu sinyal yollarının yanında, apoptozu, yaşlanmayı ve anjiyogenezi yöneten ve kanser gelişiminin üstesinden gelmek üzere tasarlanmış olan komplike yollarda bulunmaktadır.⁶

2.4.1. Reseptör Tirozin Kinazlar ile Sinyal İletimi

Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK) birçok büyüme faktörü reseptörünü de içeren yüksek afiniteli hücre yüzeyi reseptörleridir. RTK'lar, hücre dışı ligand bağlama bölgesi, transmembran, jukstamembran, protein tirozin kinaz ve karboksi terminal kuyruğu kısımlarından oluşur.^{30, 31} Ligand olarak bir büyüme faktörünün hücre dışı ligand bağlama bölgesine bağlanması ile RTK aktive olarak membran ve tirozin kinaz bölümlerini uyarır. Uyarılan tirozin kinaz otofosforilasyonla hücre içi iletim proteinlerini fosforilleyerek aktive eder.³²

RTK'ların, sadece normal hücresel süreçlerin düzenlenmesinde değil aynı zamanda birçok kanser türünün gelişiminde ve ilerlemesinde kritik bir role sahip oldukları gösterilmiştir.⁴ PDGF, Epidermal Growth Factor (EGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ve Insulin Growth Factor (IGF) başta olmak üzere yaklaşık olarak 20 farklı RTK tanımlanmıştır.³³

2.4.1.1. PDGF Reseptörü

PDGF reseptörü (PDGFR) bir hücre yüzeyi tirozin kinaz reseptörü olup, PDGF ailesine spesifiktir. PDGF reseptörünün PDGFR α ve PDGFR β olmak üzere iki reseptörü bulunmaktadır. Bu iki reseptör izoformu PDGF dimerini bağladıklarında PDGFR $\alpha\alpha$, PDGFR $\alpha\beta$ ve PDGFR $\beta\beta$ olmak üzere üç olası reseptör kombinasyonuna neden olur. Bu reseptörler için ligand olan PDGF ailesi PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C ve PDGF-D den oluşur ve PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC ve PDGF-DD homodimer veya heterodimer yapılarını oluşturur. PDGF ailesi üyeleri içerisinde sadece PDGF-BB her üç PDGFR izoformuna da bağlanabilir.³⁴ PDGF alt tiplerinden

PDGF-A ve PDGF-B, hücre proliferasyonunu, hücrel farklılaşmayı, hücre büyümesini ve kanser dahil birçok hastalığı düzenleyen önemli faktörlerdir.⁷

2.4.2. G Protein Reseptörü ile Sinyal İletimi

G Protein reseptörleri, nörotransmitter adı verilen hücre içi ve hücre dışı kimyasal uyarılarla sinyal iletimine aracılık eden geniş bir hücre yüzeyi reseptör ailesidir.³⁵ Asetilkolin, epinefrin, norepinefrin, serotonin, dopamin, somatostatin, anjiyotensin ve β -endorfin nörotransmitter olarak görev yaparlar. Bu ligandlar G protein reseptörlerini aktive ederler. G protein reseptörü heterodimerik bir reseptör protein olup α , β ve γ alt birimlerinden oluşur. Spesifik ligandların reseptöre bağlanmasıyla reseptörde bazı konformasyonel değişiklikler gerçekleşir. α alt birime bağlı olan GDP (Guanozin difosfat) yerine, GTP (Guanozin trifosfat) bağlanır ve GTP bağlı α alt birim β ve γ birimlerinden ayrılır. GTP- α 'nın birçok alt tipi bulunur ve her bir G proteini alt biriminin çeşitli hücre içi efektörlerini aktive ettiği bilinmektedir.³⁵

G proteinlerinin hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını düzenleyen çeşitli transdüksiyon yollarını aktive ettikleri ve bu reseptörlerin tümöröenezde potansiyel bir rolü olduğu bildirilmiştir.³⁵

2.4.3. Sitokin Reseptörleri ile Sinyal İletimi

Çok sayıda sitokin, hormon ve büyüme faktörü sitokin reseptörüne bağlanarak reseptörleri aktive ederler.³⁶ Sitokin reseptörleri büyüme hormonu, eritropoietin, trombopoietin ve prolaktin gibi ligandların bağlanmasıyla homodimer yapıda aktivite gösterebildiği gibi bu ligandların bağlanmasıyla heterodimer yapıda da iki alt birimiyle de aktivite gösterebilir. Çok sayıda interlekin ve interferonlar sitokin reseptörlerinin ligandlarıdır.^{29(s.24)}

Janus Kinazlar (JAK) sitokin reseptörüne bağlı protein olup, sitokin reseptörü kaynaklı sinyal iletiminden sorumludurlar.^{37, 38} Aktive olan JAK otofosforilasyonla

Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)'ları fosforiller ve sitokin aracılı JAK/STAT yolağını çalıştırır. Kontrolsüz hücre çoğalması ve kanserde sitokin reseptör sinyal yollarının çeşitli bileşenlerinin rol aldıkları bilinmektedir.^{29(s.24)}

2.5. Kanser ilişkili Sinyal Yolakları

HücreSEL büyüme veya büyümenin inhibisyonu için sinyal veren düzenleyici bileşenler genellikle karmaşık sinyal yolları üzerinden hareket eder. Bu yolların çeşitli üyeleri, örneğin hücre döngüsü bileşenleri, hücre fizyolojisinin tümöröjenik değişikliklerinin birçoğunda inaktive veya aktive edilir. Büyüme sinyallerine PDGF, VEGF ve Transforming Growth Factor (TGF) ve gibi büyüme faktörleride dahil edilir. Büyüme faktörleri, sinyal yollarının birçoğunu kanser tarafından büyümede kendi kendine yeterliliği sağlamak için düzenler.⁶ Kanser hücrelerinde aktive olan sekonder habercileri de içerisinde barındıran sinyal yollarından en önemlileri; Ras/Raf/MAPK (Mitogen Activated Protein Kinaz), JAK/STAT ve PI3K/Akt/mTOR yollarıdır.

2.5.1. Ras/Raf/MAPK Sinyal Yolağı

Ras, hücre canlılığının devamı sağlayan ve GTP bağlayıcı bir proteindir. RTK sinyallemede önemli bir iletim noktası olup hücre dışı sinyalleri dönüştürmek için de gerekli hücreSEL iletimlerin önemli bir bileşenidir.³⁹ Ras aktivitesi bir serin-treonin kinaz olan Raf proteinini aktive eder. Aktive olan Raf, MEK (Mitogen Extracellular signal Kinaz) proteinini fosforiller. Fosforile MEK proteini MAPK ailesinden ERK (Extracellular signal Regulation Kinaz)'ı aktive eder ve bir seri sekonder habercilerin aktivasyonu ile MAPK sinyal iletimi gerçekleştirir.⁴⁰⁻⁴²

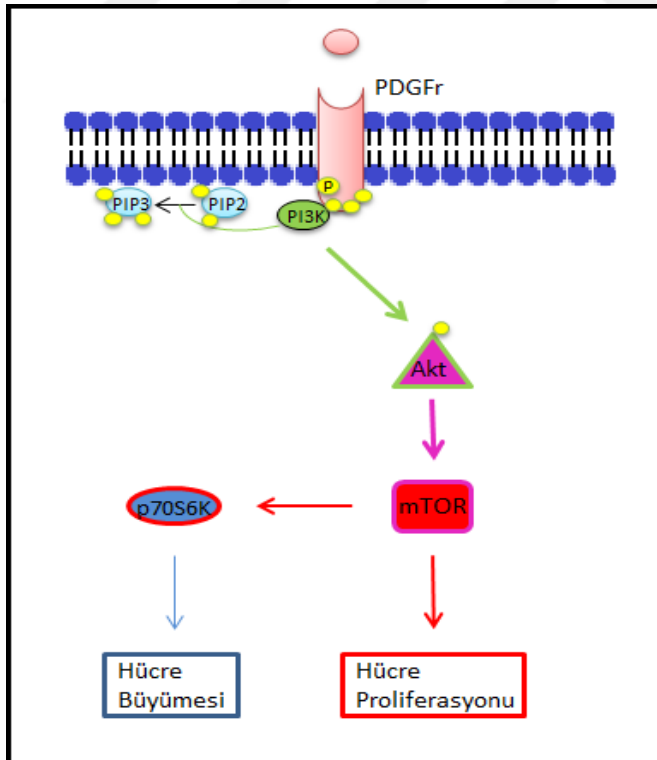
Ras, Raf, MEK ve ERK aktivasyonu hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişi kontrol eden Cyclin D1 proteininin ekspresyonunu artırdığı belirtilmiştir.⁴³ Cyclin D1'in insan kanser dokularında ve hücrelerinde çoğalmasının kanser üzerinde önemli etkileri olduğuna işaret etmektedir.⁴⁴

2.5.2. JAK/STAT Sinyal Yolağı

Bir sitokin reseptör sinyal yolağı olan JAK/STAT'ın kontrolsüz hücre proliferasyonunda ve kanserde etkili olduğı bilinmektedir.^{29(s.24)} Sitokin reseptörüne ilaveten JAK/STAT'ın EGF ve PDGF reseptörü aracılı aktivasyonunda bildirilmiştir.³⁸ Viral onkojen uygulanan hücrelerde bu sinyal yolunun aktivitesi kanserle ilişkisini daha da güçlendirmiştir. JAK/STAT yolağının yapısal aktivasyonu akut ve kronik miyelositik lösemide ve kronik lenfositik lösemide bulunmuştur.⁴⁵

2.5.3. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı

PI3K-Akt-mTOR yolu tümör hücrelerinin patogeneğinde hayati önem taşır ve hayatta kalma, çoğalma, hareketlilik, metabolizma ve anjiogenez gibi çeşitli hücreşel işlemleri kontrol eder.^{8,9} PI3K heterodimerik bir protein kompleksi olup, Akt ve memeli hücrelerde Rapamisin hedef molekülü olan mTOR'un düzenlenmesinde rol alır.



Şekil 2.1: PI3K/Akt/mTOR yolağı

PI3K, reseptör tirozin kinaz, G protein reseptörü ve Ras proteini ile aktive olur ve fosfatidil inositol 4,5 difosfatı (PIP2) fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfata (PIP3)

dönüştürür.⁴⁶ PIP3, fosfoinositid bağımlı kinaz (Phosphoinositide-dependent kinase-1, PDK1) ve Akt olmak üzere iki serin-treonin proteinini fosforiller. Fosforile Akt mTOR'u aktive eder.⁴⁷

mTOR insanda *MTOR* geni ile kodlanan bir kinaz proteindir. mTOR, diğer proteinlere bağlanarak farklı hücresel prosesleri düzenleyen mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) adında iki ayrı protein kompleksini oluşturur.⁴⁸ mTOR, hücre büyümesi, proliferasyonu, hareketliliği, sağkalımı, protein sentezi, otofaji ve transkripsiyonu düzenleyen bir serin-treonin protein kinazı olarak işlev görür.⁴⁹ Yapılan çalışmalar, mTOR'un hücre proliferasyonu ve hücre büyümesinde kilit rol oynadığını göstermektedir.⁴⁶ Rapamisin bir mTOR inhibitörü olup, T-hücrelerini hücre siklusunun G1 fazında inhibe eder.⁵⁰ Bu inhibisyon, mitojenik uyarılara yanıt olarak T-hücre aktivasyonunu ve çoğalmasını önleyerek yapar aynı zamanda immünsüpresif etkiyede sahip olduğu gösterilmiştir.⁵¹ mTOR'un aktivasyonu, 4E-BP1 ve S6 kinazlarını aktive ederek ribozom biyogenezini ve translasyonu kontrol eder.^{50, 51} Ayrıca mTOR proteinlerinin transkripsiyon, protein degradasyonu ve aktin düzenlenmesi gibi diğer hücresel olaylarda da rol aldığı bildirilmiştir.^{50, 51} Günümüzde mTOR inhibitörü olan rapamisin kemostatik anti kanser tedavisi için cazip bir hedef olarak görülmekte ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır.⁵²

2.5.3.1. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı İnhibitörleri

Birçok büyüme faktörüne bağlı olarak aktive olan PI3K/Akt/mTOR yolağı kanser araştırmalarında ana hedef haline gelmiştir. PI3K, Akt ve mTOR inhibitörleride bu kapsamdaki araştırmalara çok defa konu olmuştur.^{53, 54}

PI3K inhibitörleri

PI3K'nın en önemli baskılayıcı proteini, *PTEN* geni tarafından kodlanan Protein Tensin Homolog (PTEN) proteindir.⁵⁵ PTEN normalde tümör baskılayıcı gen olarak

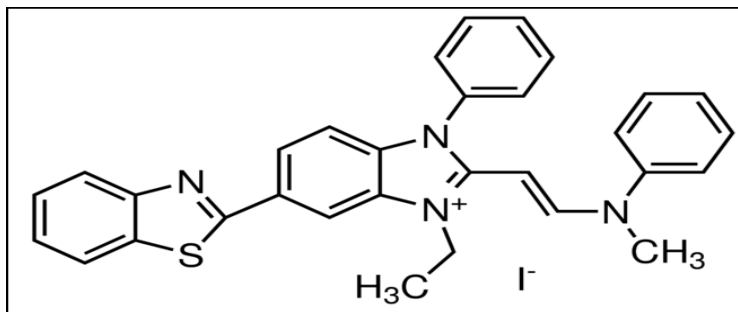
görev alırken, PTEN mutasyonları birçok kanserin oluşumunda etkili olmaktadır.⁵⁶ PIP3 fosfataz proteini bu gen tarafından kodlanır. PTEN, PIP3 fosfatazın hücre içi PIP3 seviyelerini azaltması sebebiyle tümör baskılayıcı olarak adlandırılır.⁵⁵ Idelalisib, copanlisib ve pictilisib başta olmak üzere birçok PI3K inhibitörünün özellikle metastatik kanser tedavilerinde kullanılabileceği öngörülmüştür.^{53, 57, 58}

Akt inhibitörleri

Akt inhibitörleri kanser tedavilerinde hem deneysel hem de klinik çalışmalarda kullanılmaktadır.^{54, 59} Yapılan deneysel çalışmalarda Akt inhibitörünün kanser hücrelerinin büyümesine ve çoğalmasına karşı koruyucu etkileri gösterilmiştir.⁵ GDC-0068, AZD5363, MK-2206 ve Akt inhibitörleri I, II, III, IV, V, VI ve VII ticari olarak üretilen ve en çok kullanılan Akt inhibitörleridir.^{60, 61}

Akt, özellikle apoptozu indüklemesi ve protein sentezini artırması sebebiyle kanser araştırmalarındaki önemini korumaktadır.⁶² Akt'nin ayrıca G1 ve G2 fazlarında hücre döngüsünde önemli etkileri bulunmaktadır.^{63, 64} Yapılan bir çalışmada Akt inhibitörü MK-2206'nın meme kanseri üzerinde tümör büyümesine karşın etkili olduğu gösterilmiştir.⁶⁵ Bir başka çalışmada Akt'nin hücre canlılığının devamında önemli bir faktör olduğu belirtilmiş ve Akt inhibitör VII'nin bu etkiyi azalttığı gösterilmiştir.⁶⁶ Akt inhibitörlerinden, Akt inhibitör IV (5-(2-Benzotiazolil)-3-etil-2-[2-(metilfenilamino)etenil]-1-fenil-1H-benzimidazolium iyodür)'ün kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur.⁵

60, 61



Şekil 2.2: Akt inhibitör IV.⁶⁷

mTOR inhibitörleri

mTOR inhibitörleri, hücre içi bir serin-treonin protein kinaz olan mTOR proteinini inhibe ederler. mTOR proteini, çeşitli sinyal yolları üzerinden hücre metabolizmayı, hücre büyümesini ve proliferasyonunu düzenler. mTOR inhibitörleri rapamisin ve türevleri olarak tanımlanır. Rapamisin ve türevlerinin birçok kanser türüne karşı olumlu cevap verdiği belirtilmiştir.⁶⁸

mTOR inhibitörleri olarak rapamisin (sirolimus), temsirolimus ve everolimus yaygın olarak kullanılmaktadır.^{69, 70} Hücre proliferasyonunu baskılayıcı etkiye sahip mTOR inhibitörlerinin immünsüpresif etkileri tanımlanmıştır.⁷¹

2.6. Kanser ve İmmün Sistem İlişkisi

Kanser ve bağışıklık sistemi arasında varlığı kesin olarak bilinen ancak henüz aydınlatılmamış karmaşık bir ilişki vardır.^{72(s.166)} İmmün hücrelerin kanser hücrelerine spesifik antijenleri tanıyabileceği iddiası 1950 yılından beri tartışılmaktadır. Bağışıklık sisteminin denetimi bu konuda temel bir sorunu ele alır. Bu sorun tümör hücrelerinin, sağlıklı hücrelerden farklı yüzey antijenlerine sahip olup olmadıklarıdır.

Tümör hücre yüzeyi antijenleri, Tümör Spesifik Antijenler (TSA) ve Tümör İlişkili Antijenler (TİA) olmak üzere iki alt sınıfta toplanır. TSA'lar sadece tümör hücrelerinde bulunurken TİA'lar hem tümör hem de normal hücrelerde bulunur. Kanser immünoterapisi bu iki antijen grubunu ele alarak bağışıklık sistemi hücrelerinin tümör hücrelerini hedef almasını sağlayan tedavi yöntemidir.⁷³ Günümüzde kanser immünoterapide genellikle protein ve karbonhidrat gibi makromoleküler yapıda olan TİA'lar kullanılır.

İmmünoterapiler aktif ve pasif olmak üzere 2 sınıfta kategorize edilir. Aktif immünoterapi, TİA'ları hedefleyerek bağışıklık sistemini tümör hücrelerine saldırmaya yönlendirir. Pasif immünoterapiler ise varolan anti-tümör yanıtlarını artırır ve

monoklonal antikorlar, lenfositler ve sitokinlerin kullanımını içerir.^{72(s.172)} Kanser immünoterapisinde antikor tedavisinin önemli bir yeri vardır. Antikorlar bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen ve hücre yüzeyi hedef antijenine etki eden proteinlerdir. Antikorlar, bir kanser antijenine bağlandıktan sonra, antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksositeye neden olabilir veya bir reseptörün ligandıyla etkileşimini önleyerek hücre ölümüne neden olabilirler.⁷⁴

Tümör hücrelerinin eksprese ettiği birçok antijen kaynağı bulunmaktadır. Bunlar; servikal kansere neden olan onkojenik virüs insan papillomavirüsleri⁷⁵, melanom oluşumunda etkili olan tirozinaz enzimi^{76, 77} ve normalde hücre büyümesini ve canlılığını düzenleyen proteinler olmasına rağmen, kanserde mutasyona uğrayan onkojenlerdir.^{78,79}

İmmün sistemin kansere karşı yetersiz kaldığı durumlar da mevcuttur.^{73, 80} Çoğu tümör hücresi yüzeyinde az sayıda Major Histocompatibility Complex I (MHC class I) molekülü içerir, bu nedenle katil T-hücreleri tarafından tespit edilemezler.⁸¹ Ayrıca bazı tümör hücreleri TGF- β gibi, makrofajların ve lenfositlerin aktivitesini bastıran sitokin salgılanması ile immün sistemi inhibe edebilir.^{73, 82} Bunlara ek olarak tümör antijenlerine karşı bağışıklık toleransı gelişebilir ve bağışıklık sistemi tümör hücrelerine artık saldırıamaz.^{73, 80}

2.6.1. Kanser İmmünoterapisinde Hücresel Mekanizmalar

Tümör antijenlerinin seviyeleri arttığı zaman hem T-hücre sitotoksitesi hemde tümör spesifik antikorlar etkin hale gelir. Bu durum immunoterapide tümör antijenlerine karşı immün cevap olarak adlandırılır.^{72(s.168)}

2.6.1.1. T-Hücreleri

T-hücreleri, T lenfositleri olarak adlandırılan, akyuvar hücrelerinin bir alt tipi olup hücresel immünitenin en önemli hücre tiplerinden biridir. T-hücrelerinin sitotoksik

(CD8⁺), yardımcı (CD4⁺) ve düzenleyici olmak üzere 3 alt tipi bulunmaktadır.⁸³ T-hücrelerinin immünolojik süreçteki en önemli görevleri CD8⁺ ve makrofajların aktivasyonu ve B-hücrelerinin plazmada olgunlaşmasına katkı sağlamaktır.⁸³

Yardımcı T-hücreleri yüzeylerinde CD4⁺ glikoproteini buldukları için CD4⁺ T-hücreleri adını alır. İnaktif halde bulunan CD4⁺ T-hücreleri, antijen sunan hücrelerin (ASH) yüzeyinde eksprese edilen Major Histocompatibility Complex II (MHC class II) molekülleri tarafından peptit antijeni sunulduğunda aktive olurlar. Aktif CD4⁺ T-hücreleri hızla bölünürler ve aktif bağışık yanıtı düzenleyen ya da yardımcı olan sitokinler denilen küçük proteinleri salgırlarlar.⁸⁴

Sitotoksik T-hücreleri virüs bulaştırılmış hücreleri ve tümör hücrelerini yok eder ve aynı zamanda organ naklinin reddini sağlayan hücreler olarak tanınmaktadır. Bu hücreler, yüzeylerinde CD8⁺ glikoproteini eksprese ettiği için CD8⁺ T-hücreleri olarak da bilinirler. CD8⁺ T-hücreleri, tüm çekirdek hücrelerin yüzeyinde bulunan MHC class I molekülleri ile bağlantılı antijene bağlanarak hedeflerini tanırlar.⁸³

2.6.1.2. Antijen Sunucu Hücreler

ASH'lar yüzeylerinde MHC ile antijen kompleksi oluşturarak T-hücrelerine antijen sunarlar.⁸⁵ Makrofajlar, B-hücreleri ve Dentritik hücreler ASH olarak işlev görür ve CD4⁺ T-hücrelerine yabancı antijenleri sunarken diğer ASH'lar CD8⁺ T-hücrelerine yabancı antijenleri tanırlar. ASH'lar, bazı kanser terapilerinde, bağışıklık sisteminin malign hücreleri tanınmasında kullanılır.⁸⁶

2.6.2. İmmün Sistem İlişkili Yolaklar

T-hücreleri immün sistemin etkili olmasında ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde rol alan en önemli hücrelerdendir. T-hücre aktivasyonu ile immün sistem patojenlere karşı savunma geliştirir ve bu yabancı ajanların uzaklaştırılmasını sağlar.⁸⁴ İmmün sistemde T-hücre aktivasyonu çeşitli sinyal yolları ile kontrol edilir.

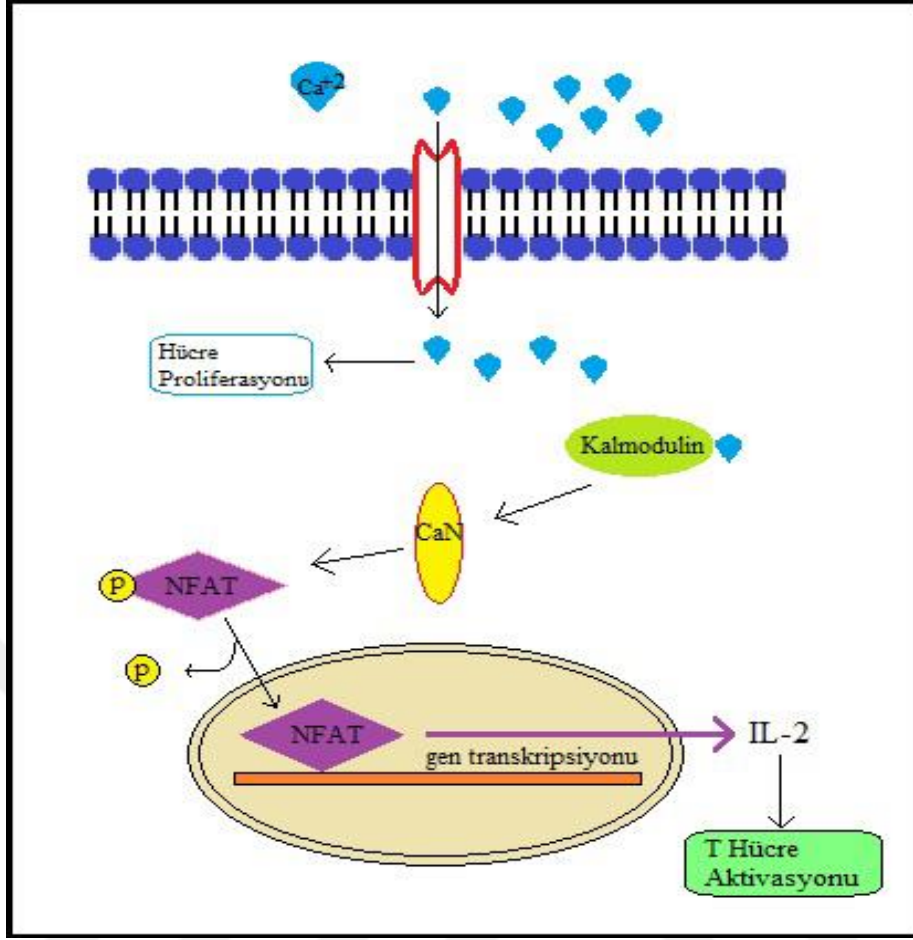
2.6.2.1. T-Hücre Aktivasyonunda IL-2 Yolağı

T-hücre reseptörleri (THR), MHC-kompleks peptid yapısını tanır ve ligand olarak bağlar. Ligandın bağlanmasıyla aktive olan THR'ler hücre içi PI3K/Akt⁸⁷, JAK/STAT⁸⁸ ve MAPK⁸⁹ yolaklarını aktive eder ve çekirdekte IL-2 ekspresyonunu artırır. IL-2 uzun dönem T-hücre aktivasyonu ve proliferasyonundan sorumlu sitokindir.¹³

2.6.2.2. Calcineurin/NFAT yolağı

Ca⁺²-Calcineurin-NFAT yolağı, kalsiyum reseptöründen çekirdeğe, epitel hücre onarımı ve immün yanıt başta olmak üzere çok çeşitli sinyallerin iletimini sağlar.⁹⁰ CaN, kalsiyum ve kalmodulin bağımlı serin-treonin protein fosfatazdır. İmmün sistemin T-hücrelerini aktive eder. Bu süreçte CaN, bir transkripsiyon faktörü olan NFATc'yi defosforile ederek aktive eder.⁹¹ Aktive olan NFATc, sitoplazmadan çekirdeğe geçer ve IL-2 up-regülasyonunu ve böylece T-hücre büyümesini ve farklılaşmasını sağlar.⁹²

Herhangi bir ASH bir T-hücre reseptörü ile etkileştiğinde, sitoplazmada Ca⁺² artışı gözlenir ve kalmodulin-Ca⁺² kompleksi oluşumu sonucu CaN aktive olur. CaN, IL-2 gen ekspresyonunu sağlayan NFATc'yi aktive eder. IL-2, yardımcı T-hücrelerinin aktivasyonunu sağlayarak diğer sitokinlerinde salınımını artırır. Böylece hücre içerisinde sitotoksik lenfositlerin etkileri düzenlenir. T-hücreleri tarafından üretilen IL-2 miktarları immün yanıtın şiddetiyle doğrudan ilişkilendirilmiştir.¹³



Şekil 2.3: Calcineurin/NFAT yolağı

2.6.3. İmmünosüpresan ilaçlar

İmmünosüpresanlar, immün sistemin etkisinden korunmak ya da bu etkiyi önlemek için kullanılan ilaçlardır. Özellikle organ naklinin reddini önlemede ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılırlar.⁹³ İmmünosüpresif ilaçların birçoğu, bölünen hücrelere karşı toksik etkisi nedeniyle kanser kemoterapisinde kullanılmaktadır.⁹⁴

İmmünosüpresif ilaçlar, başlıca glukokortikoidler, sitotoksik ilaçlar ve immünofilin üzerinden etki eden ilaçlar olmak üzere 3 sınıfta incelenir. Glukokortikoidler farmakolojik dozlarda otoimmün hastalıklar başta olmak üzere, alerjik ve enflamatuvar hastalıkların baskılanmasında kullanılır. IL'ler ve Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) üzerinde baskılayıcı etkileri dolayısıyla T-hücre üretimini

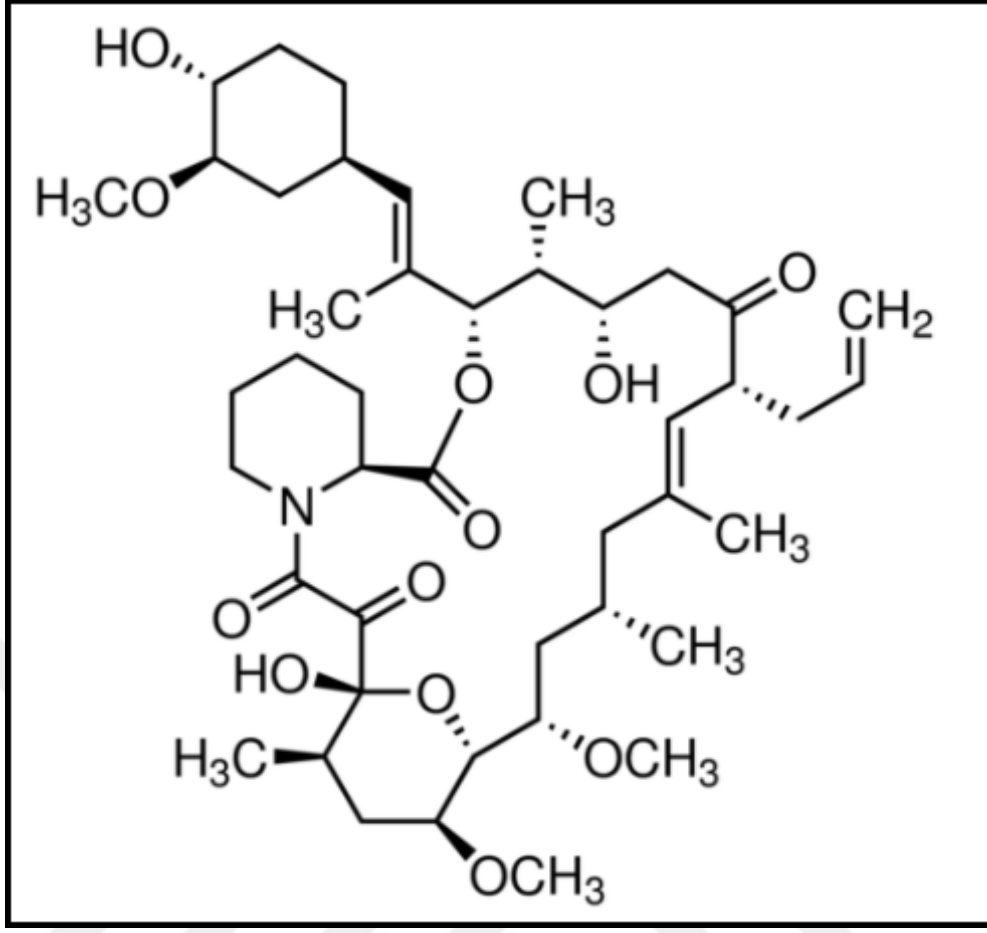
azaltırlar.⁹⁵ Sitotoksik immünoşüpresanlar, hücre bölünmesini inhibe eder. İmmünoterapide düşük dozlarda özellikle malign hastalıklarda kullanılırlar. Azatioprin, merkaptopürin ve metotreksat sitotoksik immünoşüpresan olup, DNA sentezini inhibe ederler.⁹⁴ Sikloşporin ve tacrolimus ise immünoşüpresan hedefli immünoşüpresanlar olup, son yıllarda üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır.⁹⁶⁻⁹⁹

2.6.3.1. Sikloşporin

Sikloşporin doğal bir immünoşüpresan olup, lenfositlerin etkilerini azaltır. Bu etkisini bir immünoşüpresan proteini olan sikloşüpresan'a bağlanarak gerçekleştirir. Sikloşüpresan proteinine bağlanan sikloşporin CaN'in fosfataz etkisini inhibe eder ve NFATc üzerinden IL-2 salınımını azaltır. Böylece sikloşporin T-hücre aktivasyonunu azaltmış olur.⁹⁶

2.6.3.2. FK506

FK506 bir CaN inhibitörüdür. Tacrolimus olarak ta adlandırılan FK506 immünoşüpresif ilaç olup özellikle allojenik organ transplantasyonundan sonra organ reddi riskini azaltmada kullanılır.⁹⁷ FK506, FK506 bağlayıcı immünoşüpresan proteinine (FKBP12) bağlanarak CaN'i inhibe eder böylece hem T lenfosit sinyal iletimini hem de IL-2 transkripsiyonunu durdurur.⁹⁸ Bir diğer CaN inhibitörü olan sikloşporin ile kıyaslandığında, FK506'nın hem organ transplantasyonundaki etkisi hemde daha az yan etkisi olması bakımından daha kullanışlı olduğu belirtilmiştir.^{97, 99}



Şekil 2.4: FK506 (Tacrolimus)¹⁰⁰

FK506 ve siklosporin, immün sistem hücrelerinin seviyelerini ve etkilerini azaltır. İmmün sistemin zayıflaması ile tümör hücreleri daha rahat çoğalır ve böylece bu ilaçların tümörögeneziste koruyucu etkileri olduğu düşünülmez. Ancak literatürde CaN inhibitörlerinin malign hücreler üzerinde anti-proliferatif etkileri olduğu gösterilmiştir.^{15, 16} Ayrıca CaN inhibitörlerinin kanser hücrelerinde aktive olan sinyal yollarından PI3K/Akt ve STAT yolları üzerinde inhibe edici etkileride gösterilmiştir.^{15, 16} Özellikle FK506'nın kanser hücrelerinde önemli etkileri olan PDGF ve EGF üzerinde inhibe edici etkileri de gösterilmiştir.^{15, 101, 102} Yapılan bir başka çalışmada, FK506 bağlayıcı protein'in serviks kanseri hücre hattında proliferasyon, invazyon ve metastazı tetiklediği gösterilmiş ve bu proteinin baskılanması ile kanser hücrelerinin çoğalması ve metastazı engellediği belirtilmiştir.¹⁰³

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Kültürü ve Uygulamaları

3.1.1.1. İnsan Meme Kanseri (MCF-7) Hücre Kültürü

Sıvı azot tankında kriyo tüpünde muhafaza edilen MCF-7 hücresi su banyosunda hızlıca çözülerek 10 ml uygun medyum ortamında (%87 DMEM + %2 L-Glutamin + %10 FBS + %1 PSA), 75 cm² lik flaslara kültüre edildi. Hücre çoğalması için flasklar %5 CO₂, %90 nem ve 37°C şartlarında inkübasyona bırakıldı. Tüm hücre çalışmaları steril şartlarda, laminar akımlı kabin içerisinde yapıldı.

3.1.1.2. Hücre Sayımı ve Ekimi

İnkübatörde yeterli sayıya ulaşan hücre flaskı laminar kabine alınarak medyum uzaklaştırıldı. Soğuk 1X PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra, flaska 2 ml tripsin eklendi. Tripsinli hücreler tekrar inkübatöre konularak yaklaşık 2 dakika boyunca hücrelerin yüzeyle olan bağlarının kopması sağlandı. İnkübatörden çıkarılan flask yavaş mekanik hamlelerle adhezif hücrelerin kalkması sağlandı. Hızlıca kabine alınan hücre üzerine 2 ml medyum ekilerek tripsinin etkisi durduruldu. Flask içerisindeki hücre ortamı bir falkon tüpüne alınarak 1000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım atıldı. Tüpün dibinde kalan hücre üzerine 1 ml medyum eklenerek resüspende edildi ve hücre sayımı yapıldı.

Hücre sayımı için Tripan Mavi boyası kullanıldı. 200 µl'lik tüp içerisine;

- 100 µl 2X Tripan Mavisi,
- 90 µl PBS,
- 10 µl Hücre pipetlenerak bu karışımdan 10 µl çekilip Cedex hücre sayım pleytine yüklendi ve otomatik hücre sayım makinesiyle canlı hücre/ml hesaplandı.

Deney prosedürü ve grup sayısı göz önüne alınarak yeterli sayıda hücre 6'lı pleytlere ekildi. 6'lı pleytlerin her bir kuyucuğuna en az 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde hücreler ekildi. Xcelligence cihazında kullanılan E-pleyt için her bir kuyucuğa 5 bin hücre, toplam hacim 100 µl medyum olacak şekilde ekildi. Kuyucuklara eklenecek ilaçların hacimlerinde göz önüne alınarak hesaplamalar yapıldı.

Hücre Sayım ve Ekim Örneği;

Otomatik hücre sayım cihazının verisi: Canlı hücre/ml = 3.2×10^6 MCF-7 hücresi. 6'lı pleytin her bir kuyucuğuna 200 bin hücre ekildi.

1 ml de 3.2 milyon hücre varsa

X ml de 200 bin hücre vardır. $X=62 \mu\text{l}$

Tek ilaç verilen gruplarda hacim hesabı; 1960 µl hücre ve medyum + 40 µl ilaç, iki farklı ilaç verilen gruplarda hacim hesabı; 1920 µl hücre ve medyum + 40 µl 1.ilaç + 40 µl 2.ilaç ve üç farklı ilacın verildiği grubun hacmi ise; 1880 µl hücre ve medyum + 40 µl 1.ilaç + 40 µl 2.ilaç + 40 µl 3.ilaç olacak şekilde toplam 2 ml olarak hesaplandı.

Kuyucuklara hücre ve medyum eklendikten sonra 6 kuyucuklu pleytler tekrar %5 CO₂, %90 nem ve 37°C şartlarında inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyon devam ettirildi ve daha sonra ilaç uygulamaları yapıldı. MCF-7 hücre hattı çalışılırken ilaç verme aşamasında kullanacağımız medyumda östrojen olmaması lazım. Çünkü östrojen hücre proliferasyonunu tek başına artırmak için yeterlidir. Sadece ilacın etkisini görebilmek için hazırlayacağımız medyum östrojensiz olmalıdır.

Östrojensiz medyum hazırlanışı;

%87 DMEM + %2 L-Glutamin + %10 DCC FBS + %1 PSA hacimlerinde medyum hazırlanır. DCC FBS, normal FBS'nin kömür ile muamele edilmesiyle hazırlanır. Hazırlanan bu FBS solüsyonu filtreden geçirilerek süzülür.

3.1.2. Kullanılan İlaçlar ve Doz Hesaplamaları

Hücre çalışmalarında doz ayarlaması aynı kuyucuğa hem ilaç hem medyum hemde hücre konulduğu için çok dikkatli yapılması gereken bir işlemdir. Bu nedenle hesaplama yaparken eklenecek olan hücre ve medyum hacmi ve ilacın hacmi önceden hesaplanarak son hacmin sabit tutulması gerekmektedir. Biz bu çalışmada ilacımızın dozunu 50 kat konsantre hazırladık. Kuyucuklara ektiğimiz hücre ve medyum hacmini bu ilacın dozunu 50 kat seyreltecek hacimlerde hesapladık. Örneğin ilacımızın dozu: 100 ng/ml olsun. Biz 5000 ng/ml (50 kat konsantre) hazırladık. 6'lı pleytin her bir kuyucuğuna 1960 µl hücre ve medyum karışımı ekledik. Bu kuyucuğa 40 µl ilaç verdiğimiz zaman son hacim 2 ml olacak ve ilacımız 40 µl/2ml yani 1:50 oranında dilüe edilmiş olacak. Aynı şekilde E-pleyt kuyucuklarına 98 µl hücre ve medyum karışımı ekledik. Bu kuyucuklara 2 µl ilaç uyguladığımız zaman son hacim 100 µl olacak ve ilacımızın dozu 2 µl/100µl yani 1:50 oranında dilüe edilmiş olacak.

PDGF-BB Human SRP3138; İlacın dozu 100 ng/ml olarak belirlendi. İlacımızın dozu 50 kat konsantre hazırlandı. (5000 ng/ml=5 µg/ml)

1.Stok: 10 µg toz halindeki PDGF-BB, 10µl su içerisinde çözülür. (10 µg/10µl)

2.Stok: 1.stoktan 5 µl alınır, 995 µl trehaloz ile karıştırılır. (5 µg/ml)

Dilüsyon işlemleri %5 lik trehaloz ile yapıldı ve -20°C dolapta saklandı.

Akt inhibitörü IV B2311; İlacın dozu 5 µM (3075 ng/ml) olarak belirlendi. İlacımızın dozu 50 kat konsantre hazırlandı. (153.750 ng/ml)

1.Stok: 5 mg toz halindeki Akt inhibitörü IV, 1 ml DMSO içerisinde çözülür. (5 mg/ml)

2.Stok: 1.stoktan 100 µl alınır, 900 µl medyum ile karıştırılır. (0.5 mg/ml)

3.Stok: 2.stoktan 308 µl alınır, 692 µl medyum ile karıştırılır. (153.750 ng/ml)

Dilüsyon işlemleri sonrası kalan stok çözeltiler +4°C dolaba kaldırıldı.

FK506-Tacrolimus F4679; İlacın dozu 1 µM (822 ng/ml) olarak belirlendi.

İlacımızın dozu 50 kat konsantre hazırlandı. (41.100 ng/ml)

1.Stok: 5 mg toz halindeki FK506, 250 µl DMSO içerisinde çözülür. (20 mg/ml)

2.Stok: 1.stoktan 50 µl alınır, 450 µl medyum ile karıştırılır. (2 mg/ml)

3.Stok: 2.stoktan 100 µl alınır, 900 µl medyum ile karıştırılır. (200.000 ng/ml)

4.Stok: 3.stoktan 205 µl alınır, 795 µl medyum ile karıştırılır. (41.100 ng/ml)

Dilüsyon işlemleri sonrası kalan stok çözeltiler -20°C dolaba kaldırıldı.

3.1.3. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3.1: Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihazlar	Model-Firma
İnkübatör, etüv	NuAire, Autoflow water jacketed CO ₂ Incubator
Laminar Akımlı Kabin	ESCO, Class II BSC, Sentinel Gold
Sıvı Azot Tankı	Taylor Wharton, LS750
Su Banyosu	Memmert, SV1422
Işık Mikroskobu	Leica, DMIL LED
Santrifüj Cihazı	Hettich, Universal 320R
+4°C Buzdolabı	Vestel S1108W
-20°C Buzdolabı	SIEMENS
-80°C Dondurucu	NuAire, Glacier -86°C Ultraflow freezer
Homojenizatör	Tissue Lyser II, QIAGEN
RNA İzolasyon Cihazı	QIAcube, QIAGEN
Thermal Cyclers	Applied Biosystems, Veriti
Real-Time PCR Cihazı	Applied Biosystems
Akım Sitometri Cihazı	Beckman Coulter V1, CytoFLEX
Nanodrop okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek
Otomatik Pipet Seti(10-1000µl)	Eppendorf, Research Pro
Elektronik Pipet	Eppendorf, Easypet
Isıtıcı Blok	Eppendorf, Thermomixer Comfort
Hücre Sayım Cihazı	Roche Diagnostics, Cedex XS
Hücre Proliferasyon Takip Cihazı	xCELLigence RTCA, ACEA Biosciences

3.2. Metot

3.2.1. Deney Planı ve Gruplar

Çalışmamızda MCF-7 hücreleri;

- Hücre proliferasyonu,
- Moleküler apoptoz markır analizleri ve
- Akım sitometrisi ile Annexin V/PI (propidyum iyodür) apoptoz seviyeleri

olmak üzere 3 farklı çalışma başlığı altında incelendi. Flaska ekilen MCF-7 hücreleri inkübatörde yeterli sayıya ulaşınca tripsinizasyon işlemi ile kaldırıldı ve Tablo 3.2 de belirtilen deney gruplarına göre ekim yapıldı. Hücre proliferasyonu takibi için xCelligence cihazı kullanıldı ve cihaza uygun E-pleyt'e hücre ekimi yapıldı. Moleküler apoptoz markır analizleri için Real-Time PCR cihazı kullanıldı ve 6 kuyucuklu pleytlere hücre ekimi yapıldı. Akım sitometrisi ile apoptoz seviyelerinin tespiti için Flow Cytometer cihazı kullanıldı ve 6'lı pleytlere hücre ekimi yapıldı.

Tablo 3.2: Deney grupları ve ilaç dozları

Grup No	Grup Adı
1	Kontrol
2	PDGF (100 ng/ml)
3	Akti (5 µM)
4	FK506 (1 µM)
5	PDGF (100 ng/ml) + Akti (5 µM)
6	PDGF (100 ng/ml) + FK506 (1 µM)
7	Akti (5 µM) + FK506 (1 µM)
8	PDGF (100 ng/ml) + Akti (5 µM) + FK506 (1 µM)

PDGF: Platelet Derived Growth Factor, Akti: Akt inhibitörü ve FK506: Tacrolimus

3.2.2. Hücre Proliferasyon Analizi

MCF-7 hücrelerinin, zamana ve farklı ilaç uygulamalarına karşı gösterdiği hücre proliferasyonu tepkisi xCelligence cihazı ile gözlemlendi. Cihaza uygun 16 kuyucuklu E-pleytlere, 5 bin hücre/100 µl medyum konsantrasyonlarında MCF-7 hücreleri ekildi ve ilaç verilmeden hücrelerin pleyte tutunabilmesi için 24 saat beklendi. Her grup 2 tekrar şeklinde analiz edildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra, ilaçlar (2 µl) uygun dozlarda kuyucuklara uygulandı. xCelligence proliferasyon takip cihazı, deney süresince %5 CO₂, %90 nem ve 37°C şartlarındaki inkübatöre konuldu. Hem ilaç uygulamasından önceki 24 saat hemde ilaç uygulamasından sonraki 48 saat boyunca kuyucuklardaki hücre canlılığı ve proliferasyonu xCelligence RTCA sistem programı aracılığıyla kaydedildi.

3.2.3. Moleküler Analizler

MCF-7 hücrelerinde ilaçların, apoptoz markırları üzerindeki 24 saatlik etkileri analiz edildi. Çalışmada Bax, p53, Caspase 9, NFκB, IL-2 ve PDGFRβ gen ekspresyonları ölçüldü. MCF-7 hücreleri 6'lı pleyte 200 bin hücre/2 ml medyum olacak şekilde ekildi. Pleytler 24 saat inkübatörde hücrelerin tutunması için bekletildi. 40 µl tüm ilaçlar uygulandı ve sonra pleytler tekrar inkübatöre alındı. Moleküler parametrelerin analizi için 24. saat sonunda hücreler kaldırıldı ve sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time PCR analizleri yapıldı.

3.2.3.1. RNA Sentezi ve Real-Time PCR Analizi

MCF-7 hücrelerinden, RNA izolasyon kiti kullanılarak (Qiagen), Qiacube cihazı ile total mRNA saflaştırıldı. Elde edilen total mRNA, cDNA sentez kiti kullanılarak (Applied Biosystem), Thermal Cycler cihazı ile cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA miktarları Nanodrop okuyucuda Take 3 Pleyt ile belirlendi. 200 ng/µl konsantrasyonunda cDNA'lar, Taqman qPCR Master Mix kullanılarak (Applied

Biosystems), RT-PCR analizi yapıldı. StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazında termal siklüs şartları, önce 1 kez, 50°C de 2 dakika ve 95°C de 10 dakika, daha sonra 40 siklüs, 95°C de 15 saniye ve 60°C de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı. Kantitatif mRNA miktarları, β -actin ile normalize edildi ve $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak hesaplandı. ¹⁰⁴ Real Time-PCR'da analiz edilen β -actin, Bax, p53, Caspase 9, NF κ B, IL-2 ve PDGFR β primerlerinin sekansları Tablo 3.3'te gösterildi.

Tablo 3.3: Primer Sekansları

Gen	İnsan	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
β -actin	Primer	GCAAGCAGGAGTATGACG	CAAGAAAGGGTGTAACGC
	Design	AGT	AACTAA
Bax	Primer	ATGGAGCTGCAGAGGATG	GGCAGTTGAAGTTGCCGT
	Design	AT	CAGA
p53	Primer	GTGGAGTATTTGGATGAC	GTAGTTGTAGTGGATGGT
	Design	AGAAAC	GGTAC
Caspase 9	Primer	CTATGATAGCAAAGCCCC	TCCTCCCCTCCCGTCACA
	Design	GAATG	
NF κ B	Primer	GTAAGTCTGGACCCAAG	CCTCTGTCATTCGTGCTTC
	Design	GA	C
IL-2	Primer	TCACCAGGATGCTCACAT	GCACTTCCTCCAGAGGTTT
	Design	TT	G
PDGFR β	Primer	CCTCAGTTTCCCTGTCT	AGGTAGGGATTGGGATCG
	Design		TC

3.2.4. Biyokimyasal Analizler

3.2.4.1. Akım Sitometri Uygulaması ile Apoptoz Testi

Akım sitometri cihazı (Beckman Coulter V1, CytoFLEX) ile Annexin V-FITC kiti (bc-IM3546) kullanılarak apoptoz seviyeleri analiz edildi. Apoptoz analizi için önce MCF-7 hücreleri 6'lı pleyte 200 bin hücre/2 ml medyum olacak şekilde ekildi. Pleytler 24 saat inkübatörde hücrelerin tutunması için bekletildi. 40 μ l tüm ilaçlar uygulandı ve sonra pleytler tekrar inkübatöre alındı. 60 dakika ve 120 dakika olacak şekilde 2 farklı seri pleyt dizayn edildi. Grup sayısına ilave bir grup Unstained grubu olarak kuyucuklara hücre ekildi. Unstained tüpündeki hücrelere herhangi bir boya eklenmeden

okutuldu ve boyasız kontrol grubu olarak data elde edildi. Annexin V/PI analizi için uygun saatlerde hücreler kaldırıldı.

Kit prosedürü;

- 1) Kuyucuklardan kaldırılan hücreler soğuk PBS ile yıkanarak 5 dk, +4°C, 500 G de santrifüj edildi,
- 2) Süpernatant altıldı ve dipteki hücreler soğuk 1X Binding Buffer ile resüspende edildi, (minimum 500.000 hücre/ml olacak şekilde)
- 3) Bu süspanse haldeki çözeltiden 100 µl her grup için ayrı ayrı 2 ml'lik ependorf tüplere alındı ve tüpler numaralandırıldı,
- 4) Sırasıyla; 1 µl Annexin V, 5 µl PI boyası bütün tüplere (Unstained tüpü hariç) eklendi yavaşça karıştırıldı,
- 5) Buz üzerine alınan tüpler karanlıkta 15 dk inkübasyona bırakıldı,
- 6) Tüplere daha sonra 400 µl soğuk 1X Binding Buffer eklendi,
- 7) Maksimum 30 dk içinde cihazda okutuldu.

Akım sitometri ile aynı tüpte iki farklı boyama yapıldığında dalga boylarında çakışma ortaya çıkmaktadır. Bu çakışmaların ihmal edilebilmesi için, kompenzasyon yapıldı.

Kompenzasyon prosedürü;

- 1) Annexin V-FITC kit prosedüründe olduğu gibi, 3 farklı ependorf tüpüne 100 µl süspanse MCF-7 hücresi eklendi.
- 2) 1.tüp Unstained tüpü olarak kullanıldı ve herhangi bir boya uygulaması yapılmadı,
- 3) 2.tüp Annexin tüpü olarak kullanıldı ve sadece 1 µl Annexin V boyası eklendi,
- 4) 3.tüp PI tüpü olarak kullanıldı ve sadece 5 µl PI boyası eklendi,

- 5) Tüpler buz üzerinde, karanlıkta 15 dk inkübe edildi,
- 6) 400 µl 1X Binding Buffer eklendi ve bu 3 tüp sırasıyla cihaza okutuldu,
- 7) Akım sitometri cihazında PI-Annexin V Dot Blot grafiği üzerinde uygun bölgeye kapı alındı ve kompenzasyon kaydedildi.

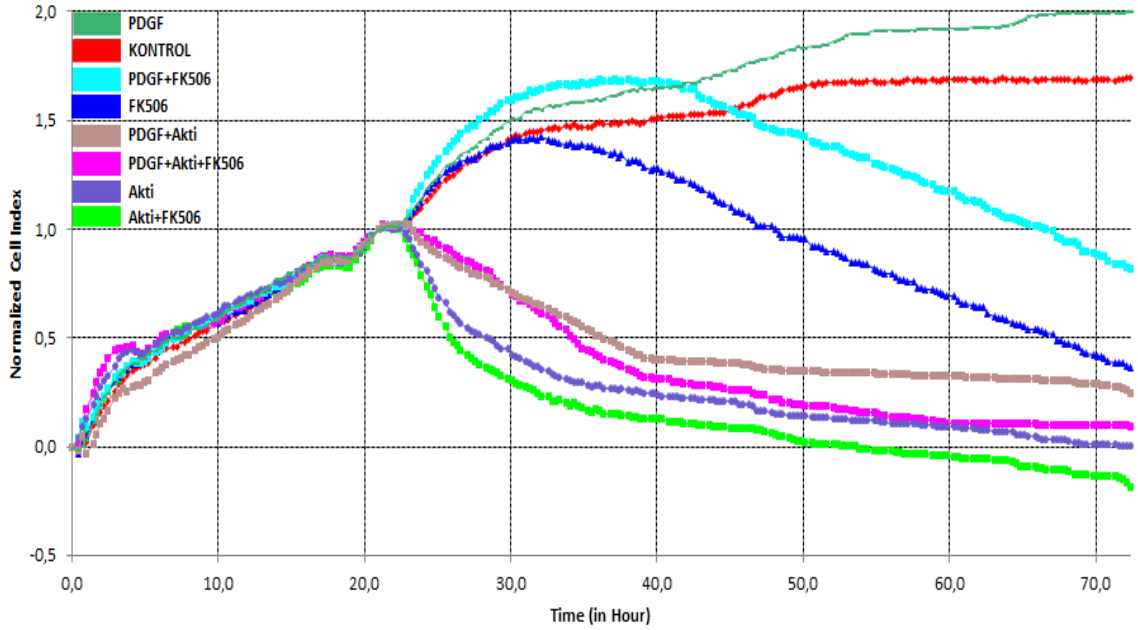
Kompenzasyon işlemleri Annexin V-FITC kit uygulamasından önce yapıldı ve kit prosedürü bu kompenzasyon üzerinden yürütüldü.



4. BULGULAR

4.1. Hücre Proliferasyon Bulguları

MCF-7 hücrelerinin 48 saat boyunca tüm gruplardaki hücre proliferasyonu ve hücre empedans sonuçları Şekil 4.1’de sunulmuştur. Hücreler ekildikten 24 saat sonra ilaç uygulamaları yapıldı ve 48 saat boyunca hücre proliferasyonu takibi yapıldı. Buna göre; PDGF uygulamasının Kontrol grubuna göre 48 saat boyunca proliferasyonu artırdığı, Akti uygulamasının ise hücre proliferasyonunu azalttığı görüldü. FK506 uygulamasının ilk 8 saat proliferasyonu artırdığı daha sonra hücre proliferasyonunu azalttığı görüldü. PDGF ile birlikte uygulanan Akt inhibitörünün hücre proliferasyonunu 48 saat boyunca azalttığı, PDGF+FK506 uygulamasının ise ilk 16 saat proliferasyonu artırıp daha sonra azalttığı görüldü. Ayrıca Akti+FK506 ve PDGF+Akti+FK506 uygulamalarının Kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunu 48 saat boyunca azalttığı görüldü.

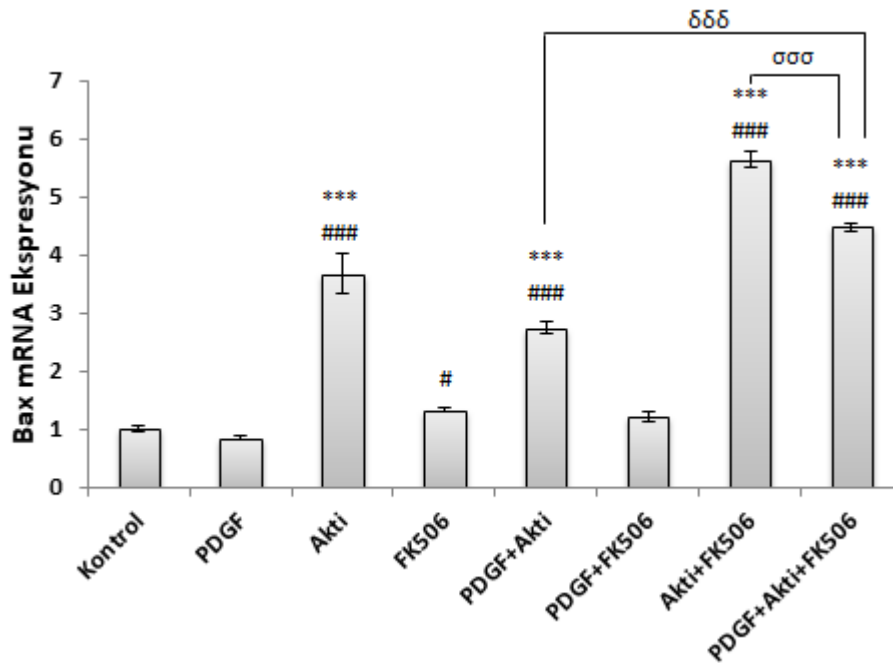


Şekil 4.1: xCelligence hücre empedans grafiği.

4.2. Moleküler Bulgular

4.2.1. MCF-7 hücrelerinin 24. Saat Bax, p53, Caspase 9, NFκB, IL-2 ve PDGFRβ mRNA Ekspresyon Sonuçları

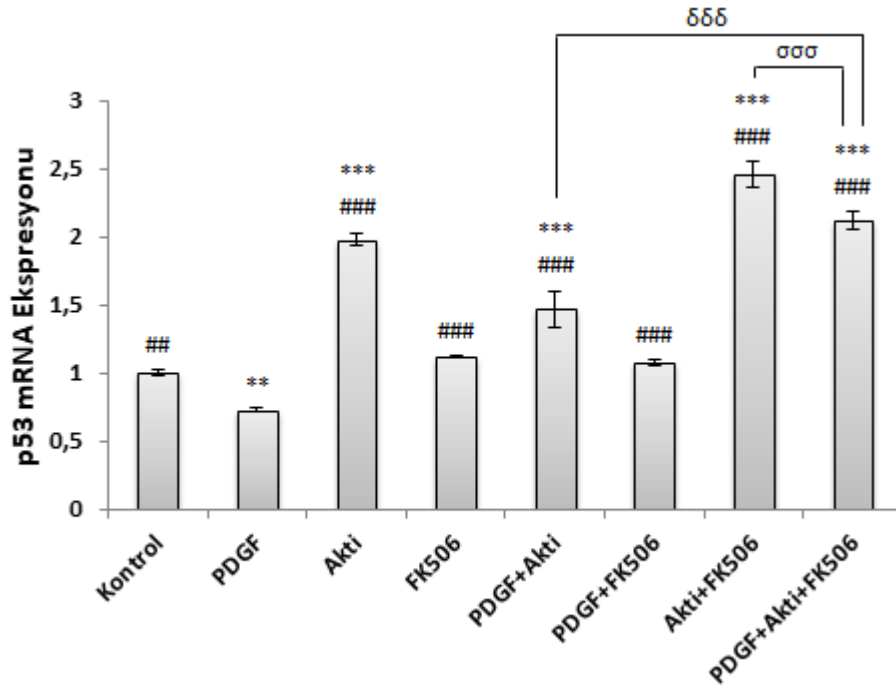
Şekil 4.2'ye bakıldığında, Bax mRNA ekspresyon seviyelerinin, Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde Akti grubunda 3.66 kat, PDGF+Akti grubunda 2.73 kat, Akti+FK506 grubunda 5.63 kat ve PDGF+Akti+FK506 grubunda 4.47 kat arttığı görülmektedir ($p<0.001$). PDGF grubuna göre, Akti, PDGF+Akti, Akti+FK506 ve PDGF+Akti+FK506 gruplarında Bax ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmektedir ($p<0.001$). PDGF+Akti+FK506 grubu, PDGF+Akti grubu ile karşılaştırıldığında Bax ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken ($p<0.001$), Akti+FK506 grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma gösterdiği görülmektedir ($p<0.001$).



Şekil 4.2: Bax mRNA ekspresyonları

Şekildeki kat değişimlikleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak tüm gruplar ile Kontrol grubu karşılaştırılarak verilmektedir. PDGF: Platelet Derived Growth Factor (100 ng/ml), Akti: Akt inhibitörü (5 μ M) ve FK506: Tacrolimus (1 μ M). Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA Tukey testiyle yapıldı. Kontrol grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında *** $p<0.001$, PDGF grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında # $p<0.05$ ve ### $p<0.001$, PDGF+Akti grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında δδδ $p<0.001$, Akti+FK506 grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ise σσσ $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

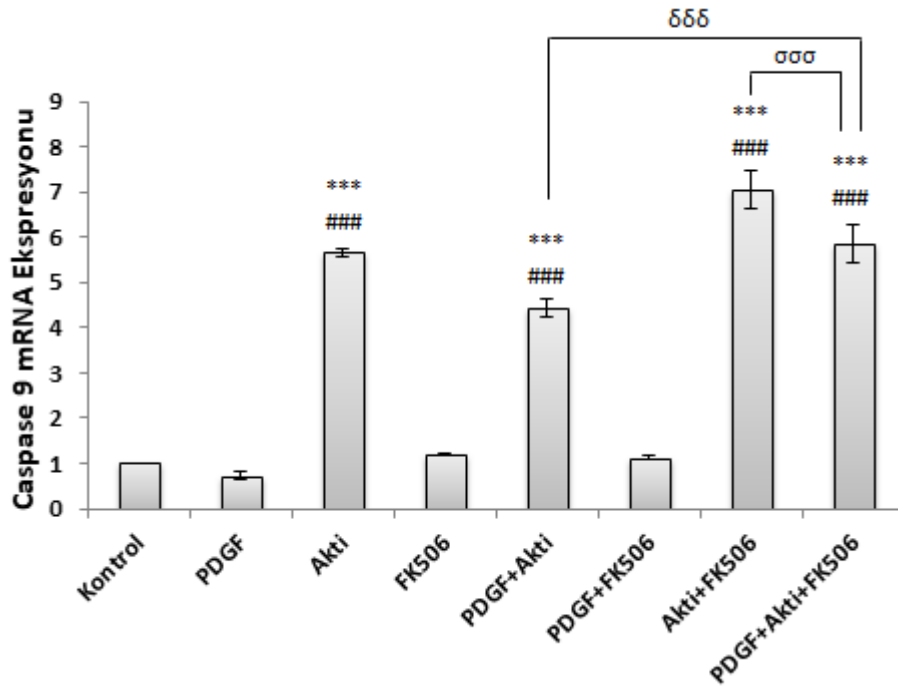
Şekil 4.3'te p53 mRNA ekspresyonlarına bakıldığında, Akti, PDGF+Akti, Akti+FK506 ve PDGF+Akti+FK506 gruplarında Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ve sırasıyla 1.97, 1.46, 2.45 ve 2.12 kat artış olduğu görülürken ($p<0.001$), PDGF grubunda p53 ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı ve 0.72 kat azaldığı görülmektedir ($p<0.01$). PDGF grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldıklarında, tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. [Kontrol grubunda ($p<0.01$), diğer gruplarda ($p<0.001$)]. p53 ekspresyonlarının, PDGF+Akti+FK506 grubunda, PDGF+Akti grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ($p<0.001$), Akti+FK506 grubu ile kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmektedir ($p<0.001$).



Şekil 4.3: p53 mRNA ekspresyonları

Şekildeki kat değişimlikleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak tüm gruplar ile Kontrol grubu karşılaştırılarak verilmektedir. PDGF: Platelet Derived Growth Factor (100 ng/ml), Akti: Akt inhibitörü (5 μ M) ve FK506: Tacrolimus (1 μ M). Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA Tukey testiyle yapıldı. Kontrol grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında *** $p<0.001$, PDGF grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ### $p<0.001$, PDGF+Akti grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında δδδ $p<0.001$, Akti+FK506 grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ise σσσ $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

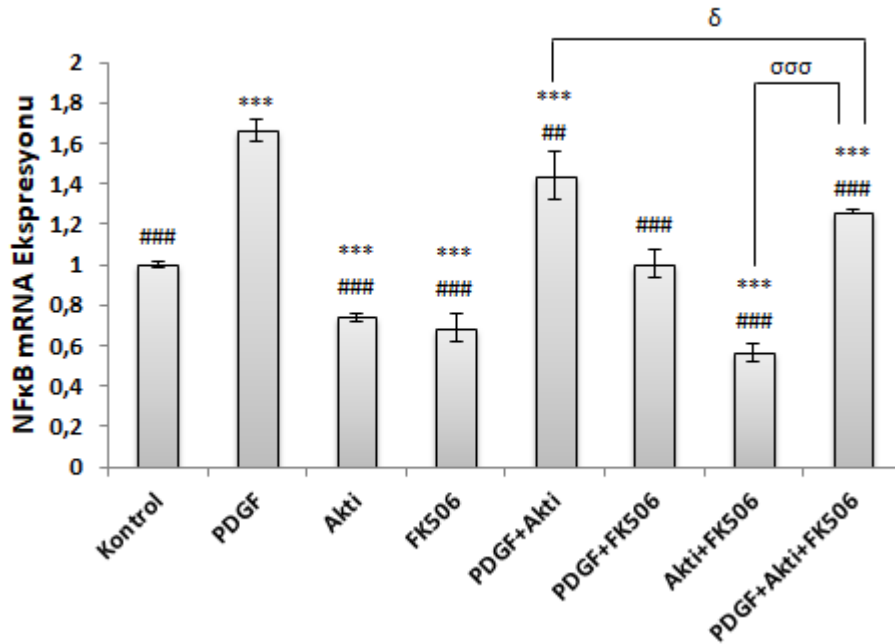
Şekil 4.4'e bakıldığında, Caspase 9 mRNA ekspresyonları Kontrol grubuna karşı, Akti verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde 5.66 kat, PDGF+Akti verilen grupta 4.43 kat, Akti+FK506 grubunda 7.06 kat ve PDGF+Akti+FK506 grubunda 5.86 kat arttığı görülmektedir ($p<0.001$). PDGF grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, Kontrol, FK506 ve PDGF+FK506 gruplarında istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik olmadığı, Akti, PDGF+Akti, Akti+FK506 ve PDGF+Akti+FK506 gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı artışların olduğu görülmektedir ($p<0.001$). Akti+FK506 grubuna göre PDGF+Akti+FK506 grubunda Caspase 9 ekspresyonunun anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir ($p<0.001$). Ayrıca PDGF+Akti grubuna göre PDGF+Akti+FK506 grubunda Caspase 9 ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı görülmektedir ($p<0.001$).



Şekil 4.4: Caspase 9 mRNA ekspresyonları

Şekildeki kat değişiklikleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak tüm gruplar ile Kontrol grubu karşılaştırılarak verilmektedir. PDGF: Platelet Derived Growth Factor (100 ng/ml), Akti: Akt inhibitörü (5 μ M) ve FK506: Tacrolimus (1 μ M). Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA Tukey testiyle yapıldı. Kontrol grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında *** $p<0.001$, PDGF grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ### $p<0.001$, PDGF+Akti grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında δδδ $p<0.001$, Akti+FK506 grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ise σσσ $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

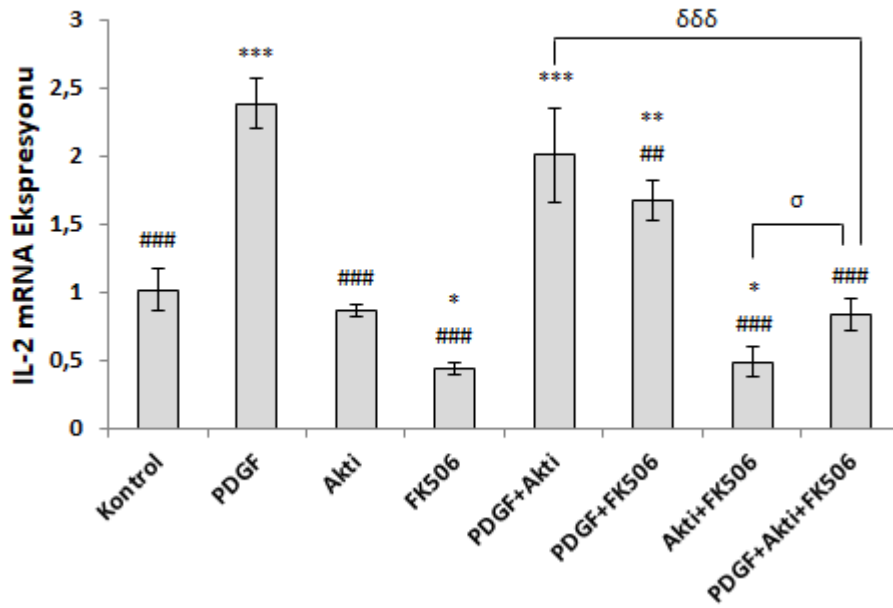
Şekil 4.5'e bakıldığında, NFκB ekspresyonlarının Kontrol grubuna kıyasla, PDGF grubunda 1.66 kat, PDGF+Akti grubunda 1.44 kat ve PDGF+Akti+FK506 grubunda ise 1.26 kat arttığı görülmektedir (p<0.001). Buna karşın Akti, FK506 ve Akti+FK506 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ve sırasıyla 0.73, 0.68 ve 0.56 kat azalmaların olduğu görülmektedir (p<0.001). PDGF grubu ile karşılaştırıldığında, tüm grupların NFκB ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir [PDGF+Akti grubunda (p<0.01), diğer gruplarda (p<0.001)]. PDGF+Akti grubuna kıyasla PDGF+Akti+FK506 grubunda NFκB ekspresyonu azalırken (p<0.05), Akti+FK506 grubuna göre PDGF+Akti+FK506 grubunda NFκB ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmektedir (p<0.001).



Şekil 4.5: NFκB mRNA ekspresyonları

Şekildeki kat değişimlikleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak tüm gruplar ile Kontrol grubu karşılaştırılarak verilmektedir. PDGF: Platelet Derived Growth Factor (100 ng/ml), Akti: Akt inhibitörü (5 μ M) ve FK506: Tacrolimus (1 μ M). Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA Tukey testiyle yapıldı. Kontrol grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında *** p<0.001, PDGF grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ## p<0.01 ve ### p<0.001, PDGF+Akti grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında δ p<0.05, Akti+FK506 grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ise $\sigma\sigma\sigma$ p<0.001 işaretleri kullanılmıştır.

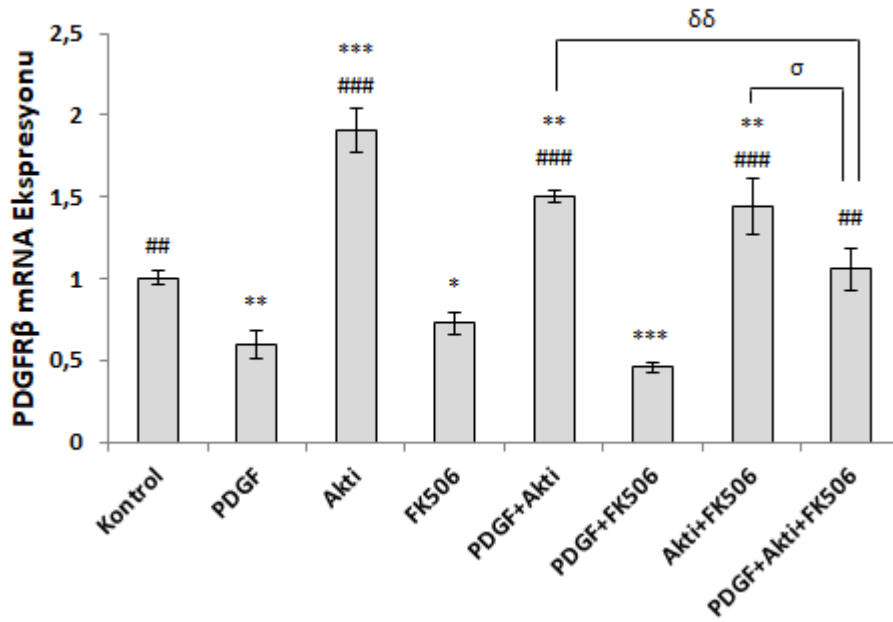
Şekil 4.6’da IL-2 mRNA ekspresyonlarına bakıldığında, Kontrol grubuna kıyasla PDGF ve PDGF+Akti gruplarında sırasıyla 2.38 ve 2.01 kat ($p<0.001$), PDGF+FK506 grubunda ise 1.67 kat istatistiksel olarak anlamlı artışlar görülmektedir ($p<0.01$). FK506 ve Akti+FK506 grupları (sırasıyla 0.43 ve 0.48 kat), Kontrol grubu ile kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı azalmaların olduğu gözlemlenmektedir ($p<0.05$). PDGF grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında PDGF+Akti grubu hariç diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı azalmaların olduğu görülmektedir [PDGF+FK506 grubunda ($p<0.01$), diğer gruplarda ($p<0.001$)]. PDGF+Akti grubu ile kıyaslandığında PDGF+Akti+FK506 grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görülürken ($p<0.001$), Akti+FK506 grubuna kıyasla PDGF+Akti+FK506 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmektedir ($p<0.05$).



Şekil 4.6: IL-2 mRNA ekspresyonları

Şekildeki kat değişimlikleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak tüm gruplar ile Kontrol grubu karşılaştırılarak verilmektedir. PDGF: Platelet Derived Growth Factor (100 ng/ml), Akti: Akt inhibitörü (5 μ M) ve FK506: Tacrolimus (1 μ M). Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA Tukey testiyle yapıldı. Kontrol grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$, PDGF grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ## $p<0.01$ ve ### $p<0.001$, PDGF+Akti grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında δδδ $p<0.001$, Akti+FK506 grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ise σ $p<0.05$ işaretleri kullanılmıştır.

Şekil 4.7'ye bakıldığında, PDGFR β mRNA ekspresyon seviyelerinin, Kontrol grubuna kıyasla, Akti verilen grupta 1.90 kat ($p<0.001$), PDGF+Akti verilen grupta 1.49 kat ($p<0.01$) ve Akti+FK506 grubunda 1.44 kat ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlenirken, PDGF grubunda 0.59 kat ($p<0.01$), FK506 grubunda 0.72 kat ($p<0.05$) ve PDGF+FK506 grubunda 0.45 kat ($p<0.001$) istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmaların olduğu görülmektedir. PDGF grubu ile kıyaslandığında, PDGFR β ekspresyonlarının, Akti, PDGF+Akti ve Akti+FK506 gruplarında ($p<0.001$) ve Kontrol ve PDGF+Akti+FK506 gruplarında ($p<0.01$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmektedir. PDGF+Akti+FK506 grubu, PDGF+Akti grubu ile kıyaslandığında ($p<0.01$) ve Akti+FK506 grubu ile kıyaslandığında ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmaların olduğu görülmektedir.



Şekil 4.7: PDGFR β mRNA ekspresyonları

Şekildeki kat değışiklikleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak tüm gruplar ile Kontrol grubu karşılaştırılarak verilmektedir. PDGF: Platelet Derived Growth Factor (100 ng/ml), Akti: Akt inhibitörü (5 μ M) ve FK506: Tacrolimus (1 μ M). Sonuçların istatistiği One-Way ANOVA Tukey testiyle yapıldı. Kontrol grubuyla diğler gruplar karşılaştırıldığında * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$, PDGF grubuyla diğler gruplar karşılaştırıldığında ## $p<0.01$ ve ### $p<0.001$, PDGF+Akti grubuyla diğler gruplar karşılaştırıldığında $\delta\delta$ $p<0.01$, Akti+FK506 grubuyla diğler gruplar karşılaştırıldığında ise σ $p<0.05$ işaretleri kullanılmıştır.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

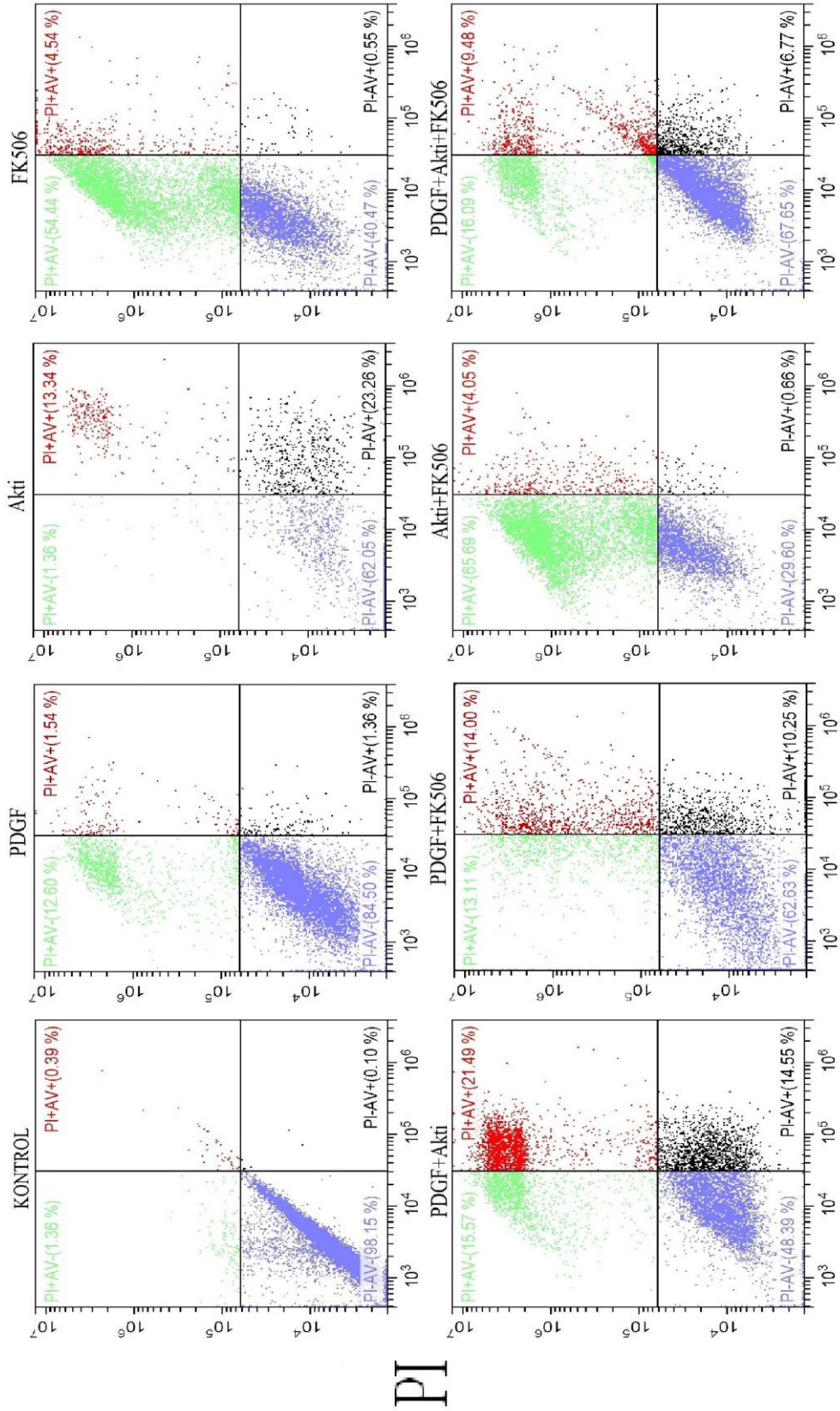
4.3.1. Akım Sitometri ile Apoptoz Analiz Sonuçları

Akım Sitometri cihazı ile MCF-7 hücrelerinde PDGF, Akti ve FK506'nın 60 ve 120. dakikadaki apoptoz seviyeleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 da gösterilmiştir. Dot plot grafiklerinde X eksenini Annexin V'in (AV), Y eksenini ise PI'nın yaydığı floresansı göstermektedir. Grafiklerdeki PI-AV- bölgeleri canlı hücreleri, PI+AV- bölgeleri nekrotik hücreleri, PI+AV+ bölgeleri geç apoptoza uğramış hücre oranını ve PI-AV+ bölgelerinde erken apoptoza uğramış hücre oranını belirtmektedir. Tablo 4.1 de ilaç uygulamalarına bağlı olarak 60 ve 120 dk boyunca değişen hücre canlılığı ve hücre apoptoz seviyeleri yüzde değer olarak verilmiştir. Dot plot grafiğindeki her bir nokta bir hücreyi göstermektedir.

Tablo 4.1: Hücre canlılığı ve apoptoz yüzdeleri

Gruplar	Canlı Hücre %		Erken Apoptoz %		Geç Apoptoz %		Nekroz %	
	60. dk	120. dk	60. dk	120. dk	60. dk	120. dk	60. dk	120. dk
Kontrol	98.15	95.80	0.10	0.35	0.39	2.39	1.36	1.46
PDGF	84.50	94.53	1.36	3.83	1.54	1.12	12.60	0.52
Akti	62.05	64.97	23.26	15.80	13.34	18.53	1.36	0.70
FK506	40.47	67.01	0.55	28.42	4.54	3.98	54.44	0.60
PDGF+Akti	48.39	59.70	14.55	13.11	21.49	7.64	15.57	19.55
PDGF+FK506	62.63	67.62	10.25	12.91	14.00	11.05	13.11	8.43
Akti+FK506	29.60	71.24	0.66	10.11	4.05	17.66	65.69	0.99
PDGF+Akti+FK506	67.65	84.36	6.77	5.33	9.48	9.17	16.09	1.14

60 dk'lık Annexin V/PI apoptoz seviyelerinin gösterildiği Şekil 4.8'e bakıldığında, herhangi bir uygulama yapılmayan Kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin %98.15 oranında canlı kaldığı, Akti uygulamasının hücreleri, %13.34 geç ve %23.26 erken apoptoza götürdüğü görülmektedir. FK506 uygulamasının apoptoz üzerinde çok fazla etki göstermediği görülmektedir. PDGF verilen grupta apoptotik etki olmadığı görülürken, PDGF+Akti grubunda %21.49 geç, %14.55 oranında erken apoptoz seviyeleri, PDGF+FK506 grubunda ise %14.00 geç, %10.25 oranında erken apoptoz seviyeleri görülmektedir. PDGF+Akti+FK506 grubunda 60 dk süresince erken apoptoz oranı %6.77 iken, geç apoptoz yüzdesi 9.48 olduğu görülmektedir.

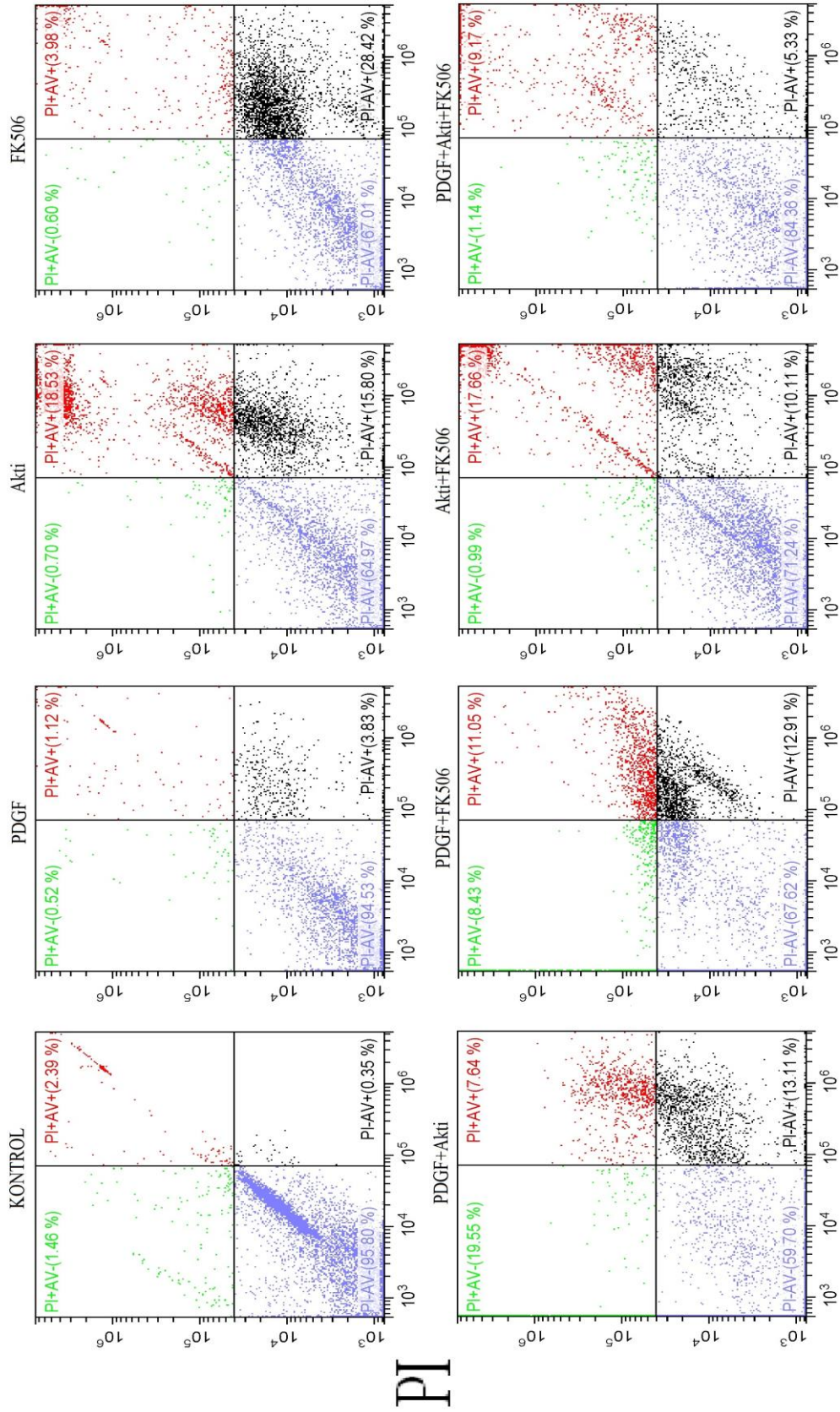


Annexin V/PI

Şekil 4.8: 60 dk'lık Annexin V/PI Apoptoz Seviyeleri

PDGF: Platelet Derived Growth Factor (100 ng/ml), Akti: Akt inhibitörü (5 µM) ve FK506: Tacrolimus (1 µM) ilaçlarının 60 dk süresince hücre canlılığı ve apoptoz üzerine etkisi.

120 dk'lık Annexin V/PI apoptoz seviyelerinin gösterildiği Şekil 4.9'a bakıldığında herhangi bir uygulama yapılmayan Kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin %95.80 oranında canlı kaldığı, Akti uygulamasının hücreleri, %15.80 erken ve %18.53 geç apoptoza götürdüğü ve canlılık oranının azaldığı görülmektedir. FK506 uygulamasının MCF-7 hücrelerini 120. dakikada, %28.42 erken ve %3.98 geç apoptoza götürerek en anlamlı apoptotik etkiyi gösteren grup olduğu görülmektedir. PDGF verilen grupta apoptotik etki olmadığı görülürken, PDGF+Akti grubunda %13.11 erken, %7.64 oranında geç apoptoz seviyeleri, PDGF+FK506 grubunda ise %12.91 erken, %11.05 oranında geç apoptoz seviyeleri görülmektedir. PDGF ile indüklenen MCF-7 hücreleri üzerinde, FK506'nın Akti'ye göre daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğu görülmektedir. Akt inhibitörü ve Calcineurin inhibitörü FK506'nın birlikte uygulandığı Akti+FK506 grubunda MCF-7 hücrelerinin 120 dk sonunda %10.11 erken apoptoza ve %17.66 geç apoptoza gittiği görülmektedir. PDGF+Akti+FK506 grubunda 120 dk süresince erken apoptoz oranı %5.33 iken, geç apoptoz yüzdesi 9.17 olduğu görülmektedir.



Annexin V/FITC

Şekil 4.9: 120 dk'lık Annexin V/PI Apoptoz Seviyeleri

PDGF: Platelet Derived Growth Factor (100 ng/ml), Akti: Akt inhibitörü (5 µM) ve FK506: Tacrolimus (1 µM) ilaçlarının 120 dk süresince hücre canlılığı ve apoptoz üzerine etkisi.

5. TARTIŞMA

Kanser hücreleri büyüme faktörlerini, büyüme ve çoğalma gibi canlılık faaliyetlerinin devamını sağlamada kendi kendine yeterliliği sağlamak için düzenler.⁶ PDGF, VEGF ve EGF gibi normal hücresele olaylarda da aktive olan büyüme faktörleri özellikle kanser hücrelerinde aşırı aktive olan bir seri sinyal yolağını harekete geçirir.⁴ PI3K/Akt/mTOR yolağı, PDGF ve diğere büyüme faktörleri ile aktive olup, hayatta kalma, çoğalma, hareketlilik, metabolizma ve anjiogenez gibi çeşitli hücresele işlemleri kontrol eder.^{8, 9} Literatürde PI3K/Akt/mTOR yolağı inhibitörlerinin kanser hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerinde baskılayıcı etkileri olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır.^{5, 53, 57, 58, 68} Ancak bu çalışmaları incelediğimizde bu yolağın tek başına kanser proliferasyonunu inhibe etmede yeterli olmadığı, bu yüzden PI3K/Akt/mTOR yolağı ile birlikte alternatif farklı yolak ve mekanizmaların bir arada incelenmesine ihtiyaç duyulduğı görülmektedir.

PDGF ve diğere büyüme faktörleri ile dolaylı olarak ilişkilendirilen¹⁰¹ Calcineurin/NFAT yolunun hücre canlılığını, proliferasyonunu, farklılaşmasını ve hücre göçünü kontrol ettiğı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.^{105, 106} Calcineurin/NFAT yolu intraselüler Ca^{+2} seviyesi ile doğrudan ilişkilidir. Hücre içi Ca^{+2} seviyesi ya ekstraselüler ortamdan kalsiyum kanalı ile ya da intraselüler kalsiyum depolarından sitoplazmaya kalsiyum desteğı ile sağlanmaktadır. Hücre içi Ca^{+2} seviyesinin hücre proliferasyonunu artırdığı bilinmektedir.¹⁴ Başta kalsiyum seviyesinin kalsiyum kanal blokörleri ile doğrudan azaltılarak antiproliferatif bir etki amaçlanmıştır.¹⁰⁷ Ancak alınan sonuçlara göre, hücre içi kalsiyum depolarından salınan kalsiyumun, kalsiyum kanalı ile sağlanan kalsiyuma göre hücre proliferasyonu üzerinde daha etkili olduğu bildirilmiştir. Hücre içi kalsiyum depolarından salınan kalsiyumun melanom¹⁰⁸, meme¹⁰⁹, kolon¹¹⁰, akciğere¹¹¹ ve hepatoselüler karsinoma¹¹² kanserlerinin invazyonunu, proliferasyonunu ve canlı

kalmalarını tetiklediği belirtilmiştir. Dolayısıyla kanser hücrelerinde kalsiyum kaynaklı aktive olan enzimler, proteinler ve diğer sekonder haberciler açık bir hedef haline gelmektedir. Hücre içi birçok kalsiyum sinyal yolağı mevcut olmakla birlikte kalsiyumun etkin rol aldığı yollardan biri de Calcineurin/NFAT yoludur. Hücre içi kalsiyum artışı Calcineurin ve NFAT'ı aktive ederek T-hücrelerinin aktivasyonunu sağlamaktadır.⁹² Bu yol bağışıklık sisteminin temel yollarından biridir. Bağışıklık sisteminin inhibisyonu kanser hücrelerinin daha rahat çoğalacağı bir ortam hazırlayacağı düşüncesini desteklemesine rağmen, yapılan çalışmalar Calcineurin/NFAT inhibisyonunun kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını göstermiştir.^{113, 114}

Calcineurin inhibitörlerinden FK506 ve Cyclosporin A'nın PDGF gibi büyüme faktörleri üzerindeki inhibe edici etkilerinin yanında tümör hücre proliferasyonunda rol alan önemli mekanizmalardan biri olan PI3K/Akt/mTOR üzerinde de inhibisyon sağladığı gösterilmiştir.^{15,101, 102} Özellikle büyüme faktörleri üzerindeki etkileri göz önüne alındığında Calcineurin, etkilediği yollar ve mekanizmalar bakımından kanser araştırmalarında yeni bir hedef haline gelmiştir. PDGF sinyal ailesine dahil olmadığı halde bu yola birden fazla mekanizmayla etki etmesi Calcineurin/NFAT yolunun kanser tedavisinde etkili olabileceğini göstermektedir. Biz bu çalışmada meme kanseri hücrelerinde, hem PI3K/Akt/mTOR yolu ile Calcineurin/NFAT yolu arasındaki ilişkiyi hemde Akt inhibitörü ve Calcineurin inhibitörü FK506'nın birlikte ve tek başlarına kullanımlarının apoptotik etkilerini araştırdık. Çalışmamızda ayrıca PDGF ile kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırdık ve daha sonra Akt inhibitörü ve FK506'nın proliferasyon üzerindeki etkilerini karşılaştırdık.

Yapılan bir çalışmada kolon kanseri hücre hattı PDGF ile indüklenerek çok daha yüksek proliferasyon indeksine sahip bir kanser modeli oluşturulmuş ve Akt

inhibitörünün bu etkiye karşı vereceği tepki araştırılmıştır.⁵ İlginç olarak Akt ve PI3K inhibitörlerinin bu yüksek kanser proliferasyona karşı yetersiz kaldıkları belirtilmiştir. Bu çalışmada PDGF ile indüklenen kanser hücreleri üzerinde Akt inhibisyonunun yetersiz kalması kolon kanser hücre hattına özgü bir durum olabilir. Çünkü tek başına Akt inhibitörlerinin kolon⁵, over¹¹⁵, pankreas¹¹⁶ ve meme¹¹⁷ kanserlerinde koruyucu etkileri gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda PDGF ile hücre proliferasyonu ve migrasyonunun indüklendiği ve PDGF'nin bu etkisini özellikle PI3K/Akt/mTOR yolu üzerinden gerçekleştirdiği belirtilmiştir.^{118, 119} Bizim bu çalışmamızda yukarıda bahsettiğimiz çalışmalara benzer şekilde PDGF ile indüklediğimiz MCF-7 hücrelerinde Akt inhibitörünün hem proliferasyon üzerinde baskılayıcı hemde apoptoz parametreleri üzerinde olumlu etkileri olduğunu gösterdik.

Apoptoz, hücre içi ve hücre dışı birçok stimulan tarafından harekete geçebilen ve hücre çekirdeği tarafından direkt kontrol altına alınan kontrollü bir ölüm mekanizmasıdır. Apoptozdan kurtulma ise kanserde ayırt edici bir özelliktir.¹²⁰ Bu mekanizma, biyokimyasal ve morfolojik olarak farklı bir hücre modu oluşturarak karsinogenezis, embriyogenezis, kanser tedavisi ve immün reaksiyonlara yanıt olarak özellikle hücre proliferasyonuna karşı düzenlenen bir ölüm olayıdır.¹²¹ Biz bu çalışmada Akt inhibitörü ve FK506'nın 60 ve 120 dakikalık uygulamalarının apoptotik etkilerini akım sitometri cihazı ile tespit ederek, meme kanseri üzerindeki muhtemel koruyucu etkilerini gösterdik. 60 dk'lık ilaç uygulamalarında, Akt inhibitörü en fazla apoptotik etkiyi gösteren ilaç olurken, PDGF ve FK506 uygulamalarının herhangi bir apoptotik etki göstermediğini bulduk. Literatürde Akt'nin hücre içi çeşitli habercileri harekete geçirerek kanser hücrelerini apoptozdan koruduğu ve bu yolların inhibisyonlarının apoptozu tetiklediği belirtilmiştir.¹²² Çalışmamızın 120 dk'lık ilaç uygulaması bulgularına bakıldığında, Akt inhibitörünün apoptotik etkisinin devam ettiği görülürken

buna ilaveten FK506'nın da apoptotik etkisinin ortaya çıktığı görülmektedir. Bu iki ilacın birlikte uygulamasının da apoptozu olumlu derecede etkilediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullandığımız ve kanser hücrelerinin proliferasyonunu tetiklemek için kullandığımız PDGF, tek başına meme kanseri hücrelerini apoptozdan korurken, Akti ve FK506 ile birlikte PDGF uygulamalarında, FK506 daha fazla olmakla beraber Akti uygulamalarının apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bizim sonuçlarımızı destekler nitelikte yapılan bir çalışmada FK506 bağlayıcı proteininin hücre proliferasyonunu azaltıp apoptozu tetiklediği gösterilmiştir.¹¹⁴ Bu sonuçlara karşı, klinikte immünosüpresan olarak kullanılan FK506'nın doku transplantasyonundan sonra kanser riskini artırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır.^{123, 124} Bu çalışmalarda FK506'nın transplante edilen yeni doku üzerindeki kanser tetikleyici etkileri tespit edilmiştir. Literatürde yapılan bir başka çalışmada renal karsinoma hücrelerinde FK506 ve diğer Calcineurin inhibitörlerinin tümörojenik sinyalleri harekete geçirerek kanser hücrelerinin aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir.¹²⁵ Bu çalışmada siklosporin ve FK506'nın renal kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırıp, hücre içi bazı sinyal yollarını aktive ettiğini, bazıları üzerinde ise etki göstermediği belirtilmiştir. Bu çalışmada da görüldüğü üzere proliferasyon üzerinde etkili olan tüm yollar bütün kanser türlerinde aktive olmayabilir. Her kanser hücresinin kendini aktive ettiği sinyal yolağı birbirinden farklı olabildiği gibi aynı molekül de farklı kanser hücrelerinde farklı etki gösterebilir. Bizim çalışmamız da elde ettiğimiz FK506'nın apoptotik etkisinin daha ileri klinik çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Apoptoz, hücre bölünmesi sonucunda üretilen hücreleri dengeleyen ve genel doku homeostatik mekanizmalarında farklılaşmaları kontrol eden önemli bir süreçtir.¹²⁰ Apoptozisin gen yönelimli bir program olduğu ve birçok pro-apoptotik ve anti-

apoptotik gen ailesi tarafından düzenlenerek hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir.¹²⁶ Biz bu çalışmada apoptoz üzerinde etkileri bilinen, tümör baskılayıcı gen ailesinden p53, sağkalım proteini ve büyüme faktör reseptörü olan PDGFR β , anti-apoptotik protein olan NF κ B, pro-apoptotik proteinler Bax, Caspase 9 ve sitokin reseptörlerini aktive ederek tümör büyümesine sebep olan IL-2 gen ekspresyon seviyelerini araştırdık. Gen ekspresyon sonuçlarımıza göre, MCF-7 hücrelerinde p53, Bax ve Caspase 9 seviyelerinin Akt inhibitörü uygulaması ile arttığını gösterdik. Yapılan önceki çalışmalarda Akt inhibitörünün bu genleri eksprese ederek apoptozu tetiklediği belirtilmiştir.^{127, 128} Akt inhibitörünün NF κ B gen ekspresyonu üzerindeki etkisi de bu sonucu desteklemektedir. Akt inhibitörünün bu etkisi PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının, MCF-7 hücrelerinde apoptoz üzerinde primer etkili bir yol olduğunu göstermektedir. Calcineurin inhibitörü FK506'nın ise tek başına uygulamasının p53, Bax ve Caspase 9 ekspresyonlarında Akt inhibitörü kadar artış göstermemesine rağmen, Akt inhibitörü ile birlikte FK506 uygulamasının tüm parametrelerde apoptoz lehine olumlu katkı sağladığı görülmektedir. FK506'nın bu etkisi inhibe ettiği Calcineurin/NFAT yolağının apoptoz üzerinde sekonder etkili bir yol olduğunu göstermektedir. Ancak FK506'nın Akt inhibitörü ile birlikte uygulamasının meme kanseri üzerinde gösterdiği bu olumlu etki bize sonraki çalışmalarımız için çok önemli ipuçları vermektedir. Apoptoz ve gen ekspresyonu bulgularımızı birlikte değerlendirdiğimizde, tek başlarına fazla etki gösteremeyen FK506 ve Akt inhibitörünün birlikte kullanılmasının, oldukça etkili ve umut verici şekilde kanser proliferasyonunu azalttığı ve apoptotik genleri düzenlediği görülmektedir. Bu sonuçlar bize kanserin kullandığı hücre içi yolakların birlikte görev yaptıklarını ve birbirlerini desteklediklerini işaret etmektedir.

Kanser hücreleri bölünebilme yeteneğinin devamını sağlamada kendi kendine yeterliliği sağlayabilmek için aynı anda birçok sinyal yolağını aktive eder. Bu yüzden farklı yolların birlikte inhibisyonu kanser hücrelerine karşı bir savunma oluşturabilir. Literatürde meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı inhibitörü ve çoklu büyüme faktör inhibitörünün birlikte kullanımının, tek başlarına gösterdikleri etkiden daha iyi sonuç verdiği belirtilmiştir.¹² Hem büyüme faktörlerinin hemde hücre çoğalmasını tetikleyen sinyal yollarının birlikte durdurulması kansere karşı etkili bir mücadele olacaktır.

Bizde çalışmamızda, PDGF, FK506 ve Akt inhibitörünün, tek başlarına ve birlikte, kanser hücrelerinde aktive olduğu bilinen bir büyüme faktörü reseptörü olan, PDGFR β ekspresyonu üzerindeki etkilerini inceledik. Akt inhibitörünün PDGFR β seviyelerini artırdığını gösterdik. PDGF ve diğer büyüme faktörleri, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağını aktive ederek hayatta kalma, çoğalma, hareketlilik, metabolizma ve anjiogenez gibi çeşitli hücre işlemleri kontrol eder.^{8,9} Akt inhibitörü kullanımının bu sinyal yolunu bloklayarak bu hücre olayların yavaşlamasına ve durmasına sebep olduğu gösterilmiştir.⁶⁵ Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar gözlemlenirken, aynı zamanda Akt inhibitörünün PDGFR β ekspresyonunun arttığını da tespit ettik. Büyüme faktörü reseptör ekspresyonu artışının muhtemelen kanser hücresinin Akt inhibitörüne karşı verdiği fizyolojik cevaptan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu sonuç, Akt inhibitörünün PDGFR β seviyelerini artırdığı gösteren bir başka çalışma ile desteklenmektedir.¹²⁹ Aynı çalışma da PI3K/Akt/mTOR yolu inhibitörleri ve PDGF reseptör inhibitörünün, PDGFR β proteini üzerindeki etkileri karşılaştırılmış ve reseptör seviyelerini en fazla artıran grubun Akt inhibitörü verilen grup olduğu tespit edilmiştir.¹²⁹

Çalışmamızın diğer bir bulgusunda ise PDGF uygulamasının, Akt inhibitör uygulamasının aksine, PDGFR β ekspresyonlarını azalttığını gösterdik. Farmakolojik açıdan bakıldığında, bir ligandın kendi reseptörüne bağlanması, o reseptörün ihtiyacını karşılayacağı için reseptör üretiminin yavaşlatılması gerekir. Benzer bir çalışmada tek başına VEGF verilen glioblastoma hücrelerinde VEGF reseptör üretiminin azaldığı belirtilmektedir.¹³⁰ Bu çalışmamızın diğer bir sonucuna baktığımızda FK506 uygulamasının PDGFR β seviyesini azalttığını tespit ettik. Bu bulgumuzu destekler şekilde literatürde Calcineurin inhibitörlerinin büyüme faktörlerini ve apoptoz üzerinde önemli etkileri olan PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir.¹⁵ Bu sonuç ise özellikle FK506'nın aynı çalışmamızda gösterdiğimiz apoptoz üzerindeki etkilerini PDGFR β seviyesini azaltarak göstermiş olabileceğini düşündürmektedir.

FK506, bir Calcineurin/NFAT yolu inhibitörü olup, IL-2 inhibisyonu üzerinden immünosüpresyona neden olur.⁹⁸ Genel olarak immünsüpresif ilaçların sitotoksik etkilerinden dolayı kemoterapide kullanıldıkları bilinmektedir.⁹⁴ Ancak Calcineurin inhibitörlerinin proto-onkogen seviyelerini artırabileceği belirtilmiştir.¹²⁵ FK506'nın, immünsüpresif etkisinden bağımsız olarak, IL-2 inhibisyonu üzerinden kanser hücreleri ile mücadele edebileceği düşünülebilir. IL-2'nin kanser üzerindeki etkisi çok karmaşık olup hala çözülememiş birçok problemi içinde barındırmaktadır. Çünkü IL-2'nin in-vitro uygulamalarında kanser hücrelerinin canlılığını artırdığı gösterilmişken¹³¹, in-vivo IL-2 uygulaması, T-hücrelerinin aktivasyonunu sağladığı için tümör immünoterapide kanser hücrelerinin yok edilmesinde sıklıkla kullanılmıştır.^{131, 132} Bu nedenle, IL-2'nin yüksek dozunun kansere karşı küçük ama anlamlı derecede etkisi, kansere karşı bağışıklık sistemine olan güveni hala ayakta tutmaktadır.¹³³ Ancak sitokin uygulamalarının şiddetli yan etkileri ve antibiyotik olarak kullanılamayacağı da göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca IL-2 mikro-çevre seviyesinde etkili olan bir immün

sistem düzenleyicisi olduğu için, yüksek dozunun kan dolaşımına verilmesi uygun olmayacaktır.¹³³ Kanser tedavisinde kullanılan IL-2 kanser immünoterapisinde en önemli hücreler olan T hücreleri aktif hale getirerek oldukça önemli etkiler gösterirken bununla beraber IL-2 aynı zamanda kanser hücreleri, endotel ve fibroblast gibi stromal hücreler ile de etkileşime gireceğini de unutmamak gerekir.¹³³ IL-2 sadece T hücre aktivasyonunda görevli olmayıp farklı birçok görevi de bulunmaktadır. Hücre proliferasyonu ise bu görevlerden biri olup, IL-2'nin kanser tedavisinde kullanılmasında önemli soru işaretleri ile karşımıza çıkmaktadır. Bir taraftan kanser immünoterapisinde önemli etkileri varken diğer taraftan tümör hücre proliferasyonundaki etkilerinin çok daha farklı şekilde irdelenmesi gerekmektedir. Şöyle ki; yapılan klinik çalışmalar IL-2 uygulamasının immün sistemi aktif hale getirerek kansere karşı önemli bir savunma bariyeri oluşturduken; kültür ortamında sadece kanser hücrelerinin olduğu in-vitro çalışmalarda, IL-2 uygulaması birçok kanser türünün proliferasyonuna neden olmuştur. Bu çalışmaları destekleyen başka in-vitro çalışmalarda ise kanser hücrelerinin IL-2 protein ve reseptör seviyelerini artırdığı belirtilmiştir.¹³⁴ Biz de bu karışık ve zıt bilgileri analiz ederek çalışmamızda PDGF, FK506 ve Akt inhibitörünün MCF-7 hücrelerinde IL-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerini inceledik. PDGF verilen grupta IL-2 ekspresyonlarının arttığını, buna karşın Akt inhibitörünün IL-2 seviyelerini değıştirmedini gösterdik. MCF-7 hücrelerine PDGF verilmesi ile tespit edilen artmış IL-2 seviyesi, kanser hücrelerinin proliferasyon süreci boyunca IL-2'yi eksprese ettiğini göstermektedir. FK506 uygulaması ile etkili bir şekilde IL-2 ekspresyonunun azalması da çalışmamızın bir diğer bulgusudur. Daha önce tartıştığımız IL-2'nin kanser immünoterapisindeki rolünü göz önüne getirdiğimizde, FK506'nın IL-2 ekspresyon seviyesini azaltarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltmasının en önemli

açıklaması; FK506'nın aynı zamanda PDGF reseptör seviyesini de azaltmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın hücre proliferasyonu sonuçlarına baktığımızda PDGF verilen grupta kanser hücreleri proliferasyon hızı kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Yapılan çalışmalarda PDGF'nin bir büyüme faktörü olması sebebiyle kanser hücrelerinde proliferasyonu artırdığı belirtilmiştir.^{4, 7} Akt inhibitörü uygulanan tüm gruplarda proliferasyon hızı azalmış ve tek başına Akti verilen gruptaki hücreler 48 saat içerisinde tamamen ölmüştür. Akt inhibitörünün bu sitotoksik etkisinden ötürü birçok kanser çalışmasında kullanıldığı bilinmektedir. Özellikle PI3K/Akt/mTOR yolunun bloklanması rol alan Akt inhibitörlerinin başta hücre canlılığı olmak üzere protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi hayati hücresel olayları engelleyerek kansere karşı etkin bir ilaç haline gelmiştir.^{54, 59} Bizim bulgularımıza göre, Akt inhibitörünün bir büyüme faktörü olan PDGF ile birlikte MCF-7 hücrelerine uygulanması, PDGF'nin proliferatif etkisine karşı koyarak proliferasyonu azaltabildiğini göstermiştir. Bu sonuç Akt inhibitörünün hücre içi sinyal iletiminin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini net bir şekilde ortaya koymaktadır. Hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini araştırdığımız bir diğer molekül, FK506, bir Calcineurin inhibitörü olup literatürde kanser çalışmalarına birçok kez konu olmuştur.^{103, 113, 114} Yapılan bir çalışmada FK506'nın prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir.¹¹³ Bizim sonuçlarımıza göre FK506 uygulaması ilk 8 saat boyunca proliferasyonu artırmasına rağmen, 8. saatten sonra proliferasyonu hızlı bir şekilde azaltmıştır. Ayrıca Akt inhibitörü ile birlikte uygulanan FK506, proliferasyonun azaltılmasına katkı sağlamıştır. FK506'nın bu anti-proliferatif etkisi IL-2 ile birlikte PDGF reseptör seviyelerini baskılamasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada PDGF ile indüklenmiş MCF-7 hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR ve Calcineurin/NFAT sinyal yolları arasındaki muhtemel ilişki incelenmiş ve bu yolların tek başlarına ve birlikte inhibisyonlarının, kanser hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozu üzerindeki etkileri ilk kez bizim tarafımızdan gösterilmiştir.

Çalışmamız insan meme kanseri MCF-7 hücre hattında PDGF ile indüklenen hücre proliferasyonuna karşı Calcineurin inhibitörü FK506 ve Akt inhibitörünün anti-proliferatif ve apoptotik etkiye sahip olduğunu gösteren ilk çalışma olmuştur. Ayrıca bu çalışmada Akt inhibitörünün kansere karşı bilinen olumlu etkileri, FK506 ile birlikte uygulanmasıyla daha da etkili hale geldiği gösterilmiştir. İmmünoşüpresan FK506'nın, bağışıklık sistemi hücrelerinin bulunmadığı in-vitro kanser hücre kültürü ortamında, IL-2 ve PDGFR β ekspresyonlarını baskıladığı ve apoptotik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç kanser hücrelerinin IL-2 ekspresyonunu kendi lehine kullanarak proliferasyonunu ve FK506'nın bu etkiyi azalttığını göstermektedir. FK506'nın her ne kadar bağışıklık sistemi baskılayıcı etkisi olsada, Akt inhibitörü ile birlikte uygulamasının özellikle kanserin apoptozdan kurtulmasını engelleyebileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma sonucunda meme kanserinde FK506 uygulamasının sadece IL-2 ekspresyonları baskılayarak etki göstermediği, aynı zamanda kanser hücre proliferasyonunda çok önemli etkileri olan PDGFR β ekspresyonlarını da baskılayarak, hem immün hücreler ile kanser hücreleri arasındaki IL-2 ilişkisinin aydınlatılması hemde kanser tedavi süreci için yeni hedefler ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Burtis CA, Bruns DE. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7. Baskı. St. Louis Missouri, Elsevier Saunders, 2015: 339.
2. World Healty Organisation. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. 21.10.2017.
3. Devita VT HS, Rosenberg SA. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 6. Baskı. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 50-51.
4. Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8: 161-173.
5. Moench R, Grimmig T, Kannen V, Tripathi S, Faber M, Moll EM, Chandraker A, Lissner R, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Gasser M. Exclusive inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling is not sufficient to prevent PDGF-mediated effects on glycolysis and proliferation in colorectal cancer. *Oncotarget*, 2016, 7: 68749-68767.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100: 57-70.
7. Williams LT. Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science*, 1989, 243: 1564-1570.
8. Ortolani S, Ciccarese C, Cingarlini S, Tortora G, Massari F. Suppression of mTOR pathway in solid tumors: lessons learned from clinical experience in renal cell carcinoma and neuroendocrine tumors and new perspectives. *Future Oncol*, 2015, 11: 1809-1828.
9. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 2012, 149: 274-293.
10. Zhang W, Yin L, Song G, Han X, Yin Z, Luo D. LKB1 loss cooperating with BRAF V600E promotes melanoma cell invasion and migration by up-regulation MMP-2 via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncotarget*, 2017, 8: 113847-113857.

11. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, Dancey JE, Piccart-Gebhart MJ. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 2013, 39: 935-946.
12. Zang C, Eucker J, Habel P, Neumann C, Schulz CO, Bangemann N, Kissner L, Riess H, Liu H. Targeting multiple tyrosine kinase receptors with Dovitinib blocks invasion and the interaction between tumor cells and cancer-associated fibroblasts in breast cancer. *Cell Cycle*, 2015, 14: 1291-1299.
13. Balkhi MY, Ma Q, Ahmad S, Junghans RP. T cell exhaustion and Interleukin 2 downregulation. *Cytokine*, 2015, 71: 339-347.
14. Pinto MC, Kihara AH, Goulart VA, Tonelli FM, Gomes KN, Ulrich H, Resende RR. Calcium signaling and cell proliferation. *Cell Signal*, 2015, 27: 2139-2149.
15. Zawadzka M, Kaminska B. Immunosuppressant FK506 affects multiple signaling pathways and modulates gene expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 22: 202-209.
16. Shou J, You L, Yao J, Xie J, Jing J, Jing Z, Jiang L, Sui X, Pan H, Han W. Cyclosporine A sensitizes human non-small cell lung cancer cells to gefitinib through inhibition of STAT3. *Cancer Lett*, 2016, 379: 124-133.
17. National Cancer Institute. What is Cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#types-of-cancer>. 21.10.2017.
18. Bignold L. *Principles of Tumors*. 1. Baskı. New York, Academic Press, 2015.
19. T.C.Sağlık Bakanlığı. Türkiye Kanser İstatistikleri. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri>. 21.10.2017.
20. Liotta LA, Kleinerman J, Sidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, 1974, 34: 997-1004.

21. Gabriel J. *The Biology of Cancer*. 2. Baskı. Chichester, John Wiley & Sons, 2004.
22. Lin L, Chen YS, Yao YD, Chen JQ, Chen JN, Huang SY, Zeng YJ, Yao HR, Zeng SH, Fu YS, Song EW. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget*, 2015, 6: 34758-34773.
23. Lv ZD, Kong B, Liu XP, Dong Q, Niu HT, Wang YH, Li FN, Wang HB. CXCL12 chemokine expression suppresses human breast cancer growth and metastasis in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7: 6671-6678.
24. Malki A, El Ashry el S. In vitro and in vivo efficacy of a novel quinuclidinone derivative against breast cancer. *Anticancer Res*, 2014, 34: 1367-1376.
25. Gurel V, Sens DA, Somji S, Garrett SH, Nath J, Sens MA. Stable transfection and overexpression of metallothionein isoform 3 inhibits the growth of MCF-7 and Hs578T cells but not that of T-47D or MDA-MB-231 cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 80: 181-191.
26. Ponder BA. Cancer genetics. *Nature*, 2001, 411: 336-341.
27. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 1996, 87: 159-170.
28. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*, 2009, 458: 719-724.
29. Mendelsohn J HP, Israel MA, Gray JW, Thompson CB. *The Molecular Basis of Cancer*. 3. Baskı. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2008.
30. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 2001, 411: 355-365.
31. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990, 61: 203-212.

32. Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci*, 2008, 99: 214-220.
33. Segaliny AI, Tellez-Gabriel M, Heymann MF, Heymann D. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *J Bone Oncol*, 2015, 4: 1-12.
34. Cao Y, Cao R, Hedlund EM. R Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J Mol Med (Berl)*, 2008, 86: 785-789.
35. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 79-94.
36. Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*, 1995, 268: 251-255.
37. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science*, 1997, 277: 1630-1635.
38. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 2002, 285: 1-24.
39. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*, 1998, 17: 1395-1413.
40. Kolch W, Heidecker G, Lloyd P, Rapp UR. Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature*, 1991, 349: 426-428.
41. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 875-885.
42. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, 1998, 74: 49-139.
43. Kerkhoff E, Rapp UR. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene*, 1998, 17: 1457-1462.

44. Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther*, 2002, 1: 226-231.
45. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 2000, 19: 2474-2488.
46. Gajate P, Alonso-Gordoa T, Martinez-Saez O, Molina-Cerrillo J, Grande E. Prognostic and predictive role of the PI3K-AKT-mTOR pathway in neuroendocrine neoplasms. *Clin Transl Oncol*, 2017.
47. Tosello V, Saccomani V, Yu J, Bordin F, Amadori A, Piovan E. Calcineurin complex isolated from T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells identifies new signaling pathways including mTOR/AKT/S6K whose inhibition synergize with calcineurin inhibition to promote T-ALL cell death. *Oncotarget*, 2016, 7: 45715-45729.
48. Lipton JO, Sahin M. The neurology of mTOR. *Neuron*, 2014, 84: 275-291.
49. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 2004, 18: 1926-1945.
50. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 2000, 103: 253-262.
51. Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 7037-7044.
52. Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 2000, 19: 6680-6686.
53. Howes AL, Chiang GG, Lang ES, Ho CB, Powis G, Vuori K, Abraham RT. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, PX-866, is a potent inhibitor of cancer cell motility and growth in three-dimensional cultures. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 2505-2514.

54. Yap TA, Yan L, Patnaik A, Fearen I, Olmos D, Papadopoulos K, Baird RD, Delgado L, Taylor A, Lupinacci L, Riisnaes R, Pope LL, Heaton SP, Thomas G, Garrett MD, Sullivan DM, de Bono JS, Tolcher AW. First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 4688-4695.
55. Shi Y, Wang J, Chandarlapaty S, Cross J, Thompson C, Rosen N, Jiang X. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21: 522-527.
56. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 1997, 15: 356-362.
57. Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, Botero ML, Llonch E, Atzori F, Di Cosimo S, Maira M, Garcia-Echeverria C, Parra JL, Arribas J, Baselga J. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res*, 2008, 68: 8022-8030.
58. Sarker D, Ang JE, Baird R, Kristeleit R, Shah K, Moreno V, Clarke PA, Raynaud FI, Levy G, Ware JA, Mazina K, Lin R, Wu J, Fredrickson J, Spoerke JM, Lackner MR, Yan Y, Friedman LS, Kaye SB, Derynck MK, Workman P, de Bono JS. First-in-human phase I study of pictilisib (GDC-0941), a potent pan-class I phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2015, 21: 77-86.

59. Ghobrial IM, Roccaro A, Hong F, Weller E, Rubin N, Leduc R, Rourke M, Chuma S, Sacco A, Jia X, Azab F, Azab AK, Rodig S, Warren D, Harris B, Varticovski L, Sportelli P, Leleu X, Anderson KC, Richardson PG. Clinical and translational studies of a phase II trial of the novel oral Akt inhibitor perifosine in relapsed or relapsed/refractory Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Cancer Res*, 2010, 16: 1033-1041.
60. Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Kazuki Y, Takashima S, Oshimura M, Toyokuni S, Shinohara T. Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras-cyclin D2 activation. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 76-86.
61. Kau TR, Schroeder F, Ramaswamy S, Wojciechowski CL, Zhao JJ, Roberts TM, Clardy J, Sellers WR, Silver PA. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell*, 2003, 4: 463-476.
62. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev*, 2001, 15: 2203-2208.
63. Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, Sellers WR. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 2110-2115.
64. Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Feliciano CS, Gartel A, Hay N. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 7831-7841.

65. Sangai T, Akcakanat A, Chen H, Tarco E, Wu Y, Do KA, Miller TW, Arteaga CL, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F. Biomarkers of response to Akt inhibitor MK-2206 in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 5816-5828.
66. Hiromura M, Okada F, Obata T, Auguin D, Shibata T, Roumestand C, Noguchi M. Inhibition of Akt kinase activity by a peptide spanning the betaA strand of the proto-oncogene TCL1. *J Biol Chem*, 2004, 279: 53407-53418.
67. Chemical Book. Akt inhibitor IV. https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5497911.htm. 21.01.2018.
68. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 1886-1918.
69. Strimpakos AS, Karapanagiotou EM, Saif MW, Syrigos KN. The role of mTOR in the management of solid tumors: an overview. *Cancer Treat Rev*, 2009, 35: 148-159.
70. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol*, 2005, 16: 525-537.
71. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 671-688.
72. Nandini S. *Immunology Introductory Textbook*. 2. Baskı. New Delhi, New Age International, 2005.
73. Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, Soo RA. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol*, 2017, 18: e731-e741.
74. Korneev KV, Atretkhany KN, Drutskaya MS, Grivennikov SI, Kuprash DV, Nedospasov SA. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine*, 2017, 89: 127-135.

75. Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med*, 1996, 183: 725-729.
76. Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol*, 2000, 182: 323-331.
77. Romero P, Cerottini JC, Speiser DE. The human T cell response to melanoma antigens. *Adv Immunol*, 2006, 92: 187-224.
78. Guevara-Patino JA, Turk MJ, Wolchok JD, Houghton AN. Immunity to cancer through immune recognition of altered self: studies with melanoma. *Adv Cancer Res*, 2003, 90: 157-177.
79. Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 2001, 50: 3-15.
80. Seliger B. Strategies of tumor immune evasion. *BioDrugs*, 2005, 19: 347-354.
81. Seliger B, Ritz U, Ferrone S. Molecular mechanisms of HLA class I antigen abnormalities following viral infection and transformation. *Int J Cancer*, 2006, 118: 129-138.
82. Frumento G, Piazza T, Di Carlo E, Ferrini S. Targeting tumor-related immunosuppression for cancer immunotherapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2006, 6: 233-237.
83. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13: 88-100.
84. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 252-264.
85. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat Rev Immunol*, 2014, 14: 719-730.

86. Butler MO, Hirano N. Human cell-based artificial antigen-presenting cells for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 2014, 257: 191-209.
87. Okkenhaug K, Bilancio A, Emery JL, Vanhaesebroeck B. Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32: 332-335.
88. Stern RS, Divito SJ. Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis: Associations, Outcomes, and Pathobiology-Thirty Years of Progress but Still Much to Be Done. *J Invest Dermatol*, 2017, 137: 1004-1008.
89. Pancione M, Giordano G, Parcesepe P, Cerulo L, Coppola L, Curatolo AD, Conciatori F, Milella M, Porras A. Emerging Insight into MAPK Inhibitors and Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Curr Med Chem*, 2017, 24: 1383-1402.
90. Crabtree GR, Schreiber SL. SnapShot: Ca²⁺-calcineurin-NFAT signaling. *Cell*, 2009, 138: 210, 210 e211.
91. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, Tempczyk A, Kalish VJ, Tucker KD, Showalter RE, Moomaw EW, et al. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature*, 1995, 378: 641-644.
92. Yamashita M, Katsumata M, Iwashima M, Kimura M, Shimizu C, Kamata T, Shin T, Seki N, Suzuki S, Taniguchi M, Nakayama T. T cell receptor-induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. *J Exp Med*, 2000, 191: 1869-1879.
93. Zhang Y, Zhang R. Recent advances in analytical methods for the therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs. *Drug Test Anal*, 2017.
94. Roitt IM, Delves PJ. *Roitt's Essential Immunology*. 10. Baskı. Oxford, Blackwell Science, 2001: 358.

95. Revollo JR, Cidlowski JA. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1179: 167-178.
96. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 2000, 47: 119-125.
97. O'Grady JG, Burroughs A, Hardy P, Elbourne D, Truesdale A. Tacrolimus versus microemulsified ciclosporin in liver transplantation: the TMC randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, 360: 1119-1125.
98. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 1991, 66: 807-815.
99. Abou-Jaoude MM, Najm R, Shaheen J, Nawfal N, Abboud S, Alhabash M, Darwish M, Mulhem A, Ojjeh A, Almawi WY. Tacrolimus (FK506) versus cyclosporine microemulsion (neoral) as maintenance immunosuppression therapy in kidney transplant recipients. *Transplant Proc*, 2005, 37: 3025-3028.
100. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman Tedavinin Farmakolojik Temeli*. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009: 1409.
101. Richter A, Davies DE, Alexander P. Growth inhibitory effects of FK506 and cyclosporin A independent of inhibition of calcineurin. *Biochem Pharmacol*, 1995, 49: 367-373.
102. Savikko J, Teppo AM, Taskinen E, von Willebrand E. Different effects of tacrolimus and cyclosporine on PDGF induction and chronic allograft injury: evidence for improved kidney graft outcome. *Transpl Immunol*, 2014, 31: 145-151.
103. Sun LY, Tao JZ, Yan B, Lin JS. Inhibitory effects of FKBP14 on human cervical cancer cells. *Mol Med Rep*, 2017, 16: 4265-4272.

104. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
105. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem*, 2002, 131: 1-15.
106. Serrano-Perez MC, Fernandez M, Neria F, Berjon-Otero M, Doncel-Perez E, Cano E, Tranque P. NFAT transcription factors regulate survival, proliferation, migration, and differentiation of neural precursor cells. *Glia*, 2015, 63: 987-1004.
107. Mignen O, Brink C, Enfissi A, Nadkarni A, Shuttleworth TJ, Giovannucci DR, Capiod T. Carboxyamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells. *J Cell Sci*, 2005, 118: 5615-5623.
108. Feldman B, Fedida-Metula S, Nita J, Sekler I, Fishman D. Coupling of mitochondria to store-operated Ca(2+)-signaling sustains constitutive activation of protein kinase B/Akt and augments survival of malignant melanoma cells. *Cell Calcium*, 2010, 47: 525-537.
109. Faouzi M, Hague F, Potier M, Ahidouch A, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H. Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 542-551.
110. Wang JY, Chen BK, Wang YS, Tsai YT, Chen WC, Chang WC, Hou MF, Wu YC, Chang WC. Involvement of store-operated calcium signaling in EGF-mediated COX-2 gene activation in cancer cells. *Cell Signal*, 2012, 24: 162-169.
111. Hou MF, Kuo HC, Li JH, Wang YS, Chang CC, Chen KC, Chen WC, Chiu CC, Yang S, Chang WC. Orai1/CRACM1 overexpression suppresses cell proliferation via

attenuation of the store-operated calcium influx-mediated signalling pathway in A549 lung cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1810: 1278-1284.

112. El Boustany C, Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, Capiod T. Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology*, 2008, 47: 2068-2077.

113. Kawahara T, Kashiwagi E, Ide H, Li Y, Zheng Y, Ishiguro H, Miyamoto H. The role of NFATc1 in prostate cancer progression: cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion. *Prostate*, 2015, 75: 573-584.

114. Yang H, Zhang QX, Pei DS, Xu F, Li Y, Yu RT. FK506-binding protein 5 inhibits proliferation and stimulates apoptosis of glioma cells. *Arch Med Sci*, 2015, 11: 1074-1080.

115. Lin YH, Chen BY, Lai WT, Wu SF, Guh JH, Cheng AL, Hsu LC. The Akt inhibitor MK-2206 enhances the cytotoxicity of paclitaxel (Taxol) and cisplatin in ovarian cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2015, 388: 19-31.

116. Dumble M, Crouthamel MC, Zhang SY, Schaber M, Levy D, Robell K, Liu Q, Figueroa DJ, Minthorn EA, Seefeld MA, Rouse MB, Rabindran SK, Heerding DA, Kumar R. Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor. *PLoS One*, 2014, 9: e100880.

117. Crafter C, Vincent JP, Tang E, Dudley P, James NH, Klinowska T, Davies BR. Combining AZD8931, a novel EGFR/HER2/HER3 signalling inhibitor, with AZD5363 limits AKT inhibitor induced feedback and enhances antitumour efficacy in HER2-amplified breast cancer models. *Int J Oncol*, 2015, 47: 446-454.

118. Chen S, Liu B, Kong D, Li S, Li C, Wang H, Sun Y. Atorvastatin calcium inhibits phenotypic modulation of PDGF-BB-induced VSMCs via down-regulation the Akt signaling pathway. *PLoS One*, 2015, 10: e0122577.

119. Razmara M, Eger G, Rorsman C, Heldin CH, Lennartsson J. MKP3 negatively modulates PDGF-induced Akt and Erk5 phosphorylation as well as chemotaxis. *Cell Signal*, 2012, 24: 635-640.
120. Khan Z, Bisen PS. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: special reference to oral cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1836: 123-145.
121. Khan Z, Tiwari RP, Khan N, Prasad GB, Bisen PS. Induction of apoptosis and sensitization of head and neck squamous carcinoma cells to cisplatin by targeting survivin gene expression. *Curr Gene Ther*, 2012, 12: 444-453.
122. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813: 1978-1986.
123. Pendon-Ruiz de Mier V, Navarro Cabello MD, Martinez Vaquera S, Lopez-Andreu M, Aguera Morales ML, Rodriguez-Benot A, Aljama Garcia P. Incidence and Long-Term Prognosis of Cancer After Kidney Transplantation. *Transplant Proc*, 2015, 47: 2618-2621.
124. Carenco C, Faure S, Herrero A, Assenat E, Duny Y, Danan G, Bismuth M, Chanques G, Ursic-Bedoya J, Jaber S, Larrey D, Navarro F, Pageaux GP. Incidence of solid organ cancers after liver transplantation: comparison with regional cancer incidence rates and risk factors. *Liver Int*, 2015, 35: 1748-1755.
125. Datta D, Contreras AG, Basu A, Dormond O, Flynn E, Briscoe DM, Pal S. Calcineurin inhibitors activate the proto-oncogene Ras and promote protumorigenic signals in renal cancer cells. *Cancer Res*, 2009, 69: 8902-8909.
126. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 501-507.

127. Lee CS, Kim YJ, Jang ER, Myung SC, Kim W. Akt inhibitor enhances apoptotic effect of carboplatin on human epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Eur J Pharmacol*, 2010, 632: 7-13.
128. Shankar S, Srivastava RK. Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. *Int J Oncol*, 2007, 30: 905-918.
129. Wang H, Yin Y, Li W, Zhao X, Yu Y, Zhu J, Qin Z, Wang Q, Wang K, Lu W, Liu J, Huang L. Over-expression of PDGFR-beta promotes PDGF-induced proliferation, migration, and angiogenesis of EPCs through PI3K/Akt signaling pathway. *PLoS One*, 2012, 7: e30503.
130. Xu C, Wu X, Zhu J. VEGF promotes proliferation of human glioblastoma multiforme stem-like cells through VEGF receptor 2. *ScientificWorldJournal*, 2013, 2013: 417413.
131. Cheever MA, Thompson JA, Peace DJ, Greenberg PD. Potential uses of interleukin 2 in cancer therapy. *Immunobiology*, 1986, 172: 365-382.
132. Setrerrahmane S, Xu H. Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development. *Mol Cancer*, 2017, 16: 153.
133. Alileche A. Interleukin-2 and cancer: critical analysis of results, problems and expectations. *Med Hypotheses*, 2003, 60: 202-208.
134. Reichert TE, Watkins S, Stanson J, Johnson JT, Whiteside TL. Endogenous IL-2 in cancer cells: a marker of cellular proliferation. *J Histochem Cytochem*, 1998, 46: 603-611.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
<p>Adı Soyadı: Harun ÜN Doğum tarihi: 05.08.1988 Doğum yeri: Erzurum Medeni hali: Evli Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 05304018388 Faks: - E-mail: bio.harun25@gmail.com</p>
Eğitim
<p>Lise: Mecidiye Anadolu Lisesi (2006) Lisans: Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya (2007-2011) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı (2012-2014) Doktora: Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı (2014-2018)</p>
Yabancı Dil Bilgisi
<p>İngilizce: İyi derecede (ÜDS 67.5, 2011 Sonbahar)</p>
<p>Almanca: -</p>
<p>Rusça: -</p>
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
<p>Türk Biyokimya Derneği</p>
İlgi Alanları ve Hobiler
<p>Bilim ve Teknoloji</p>

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/2
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

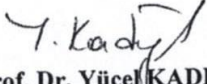
24/05/2017

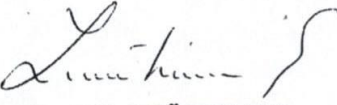
Sayın Doç. Dr. Yasin BAYIR

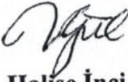
İlgi: 15.05.2017 tarih ve 1700141041 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 24.05.2017 tarihinde almış olduğu 4 numaralı karar ile danışmanı olduğunuz doktora öğrencisi Harun ÜN'ün "P13K/Akt/mTOR ve/veya Calcineurin/NFAT inhibisyonunun PDGF ile indüklenmiş tümör hücre proliferasyonuna etkisinin in-vitro araştırılması" başlıklı çalışması etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
Başkan


Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Üye


Prof. Dr. Halise İnci GÜL
Üye

Doç. Dr. Yasin BAYIR
Üye

(Katılmadı)


Doç. Dr. Beyzagül POLAT
Üye

Karar-04- Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Yasin BAYIR'ın danışmanı olduğu doktora öğrencisi Harun ÜN'ün Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürüteceği "P13K/Akt/mTOR ve/veya Calcineurin/NFAT inhibisyonunun PDGF ile indüklenmiş tümör hücre proliferasyonuna etkisinin in-vitro araştırılması" başlıklı çalışma ile ilgili 15.05.2017 tarih ve 1700141041 sayılı yazı ile ekleri görüşülmüştür.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu mevcut oybirliği ile (Doç. Dr. Yasin BAYIR oylamaya katılmamıştır) kabul edilmiştir.