

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

A549 KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE
CDK 4/6 İNHİBİTÖRÜ PALBOCİCLİB'İN ENFLAMASYON İLE İLGİLİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE KAYA

1102060038

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL

EYLÜL 2019

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

A549 KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE
CDK 4/6 İNHİBİTÖRÜ PALBOCİCLİB'İN ENFLAMASYON İLE İLGİLİ
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE KAYA

1102060038

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 1 Ekim 2019

Tezin Savunulduğu Tarih: 2 Eylül 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

Doç. Dr. Gizem DİNLER DOĞANAY (İstanbul Teknik Üniv.)

EYLÜL 2019

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi'ne başladığım lisans döneminin ilk gününden beri sevgisiyle, ilgisiyle, şefkatiyle, hoşgörüsüyle hep yanımda olan ve aynı zamanda hayata ve bilime karşı olan azmiyle, üstün bilgisiyle, tecrübesiyle yolumu aydınlatan, çok sevdiğim ve saygı duyduğum değerli tez danışmanı hocam Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Lisans ve yüksek lisans döneminde akademik bilgileriyle, hayata dair öngörüsüyle, mükemmel iş ahlakı ve disipliniyle, çalışanın hakkını fazlasıyla veren, üretmeye teşvik eden, engin bilgilerini paylaşan ve üstün sabrıyla sürekli iyi olmamız için bizi hep motive eden çok sevdiğim çok saygı duyduğum rol-modelim sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Lisans ve yüksek lisans eğitimime büyük katkıları olan derslerimizin bilimle, kaliteli espri anlayışlarıyla dolu dolu geçmesini sağlayan pozitif enerjileriyle içimizi ısıtan çok sevdiğim çok değer verdiğim sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN ve Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili araştırma görevlileri hocalarım Özge BERRAK, Pelin ÖZFİLİZ, Burcu AYHAN ŞAHİN ve Halil Önder ÖZBAŞAK'a teşekkür ederim. Aklın ve bilginin yaşta değil başta olduğunu bir kez daha hatırlatan çok sevgili arkadaşlarım, kardeşlerim Kadriye KOYUNCU, Mervenur ÇOBAN, Börteçine SEVGİN, Zeynep Elif APAYDIN, Tamer GÜMÜŞ, Sina KASHANİ, Orçun OKUMUŞ, Farangiz GHODRATİ, Tuğba YENİGÜN, Derya BULUT, Esra NEBİLER, Kaan Adacan HARMAN Sena AKSU, İlayda SÖNMEZ, Tuğçe ÇELİK, Kübra SELÇUK, Eren YÜKSELOĞLU, İbrahim Hakkı KARAKAYA, Ece BARDAKKAYA, Özlem SÖNMEZ, Resul KAYA, Elif KANSIZ, Berre AKDENİZ, Ülkü GÜNGÖR, Handan ALTUN ve burda daha adını yazamadığım diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Koşulsuz sevgi ve desteklerini hiç bir zaman benden esirgemeyen her zaman yanımda olan annem Hatice KAYA, babam Fahrettin KAYA ve sevgili abim Suat KAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca eğitim ve öğretim hayatıma sunduğu büyük katkılarından dolayı İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ'ne teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR.....	v
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
TABLO LİSTESİ.....	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Dünyada Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi	1
1.2. Türkiye’de Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi	3
1.3. Akciğer Kanserlerinin Sınıflandırması	4
1.3.1. Akciğer Adenokarsinoma.....	5
1.3.2. Skuamöz Hücre Karsinoma	5
1.3.3. Nöroendokrin Tümörler	6
1.3.4. Küçük Hücreli Karsinoma.....	7
1.4. Akciğer Kanserinin Moleküler Mekanizmaları.....	8
1.4.1. KRAS.....	9
1.4.2. EGFR	9
1.4.3. BRAF.....	10
1.4.4. PI3K/AKT/MTOR	10
1.4.5. ALK.....	10
1.4.6. TP53	11
1.4.7. p16 ^{INK4a} -siklinD1-CDK4-RB Yolağı	11
1.5. Akciğer Kanserinin Tanı ve Tedavi Yöntemleri	12
1.6. Akciğer Kanseri Tedavisinde Moleküler Temelli Yaklaşımlar	14

1.7.	Kanser Tedavisi İçin CDK4 İnhibitörleri.....	15
1.8.	Bir Cdk İnhibitörü Olan Palbociclib'in Kanser Üzerine Etkisi	18
1.9.	Wnt Sinyal Yolağı ve Akciğer Kanseri	21
1.10.	NF-κB Sinyal Yolağı	23
1.11.	A549 Epitel Akciğer Karsinoma Hücreleri.....	25
2.	MATERYAL VE YÖNTEMLER	26
2.1.	Materyaller.....	26
2.1.1.	Cihazlar	26
2.1.2.	Hücre Kültürü Donanımları.....	26
2.1.3.	Kimyasal Maddeler	26
2.1.4.	Çözeltiler	26
2.2.	Yöntemler	26
2.2.1.	Hücre Kültürü.....	26
2.2.2.	Hücrelerin Dondurulması.....	27
2.2.3.	Hücrelerin Çözülmesi	27
2.2.4.	Hücre Sağkalım Analizi	27
2.2.5.	Yara İyileşmesi Deneyi.....	27
2.2.6.	Koloni Formasyon Deneyi	27
2.2.7.	Fluoresan Mikroskopi.....	28
2.2.8.	Propidyum İyodür (PI) Boyama ile Ölü Hücrelerin Gösterilmesi.....	28
2.2.9.	2 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi	28
2.2.10.	DiOC6 ile Mitokondri Membran Potansiyelindeki Değişikliklerin Gösterilmesi	29
2.2.11.	Acridine Orange ile Otofagolizozomların Tespiti	29
2.2.12.	Total Protein İzolasyonu	29
2.2.13.	Protein Miktarının Bradford Analizi Ile Belirlenmesi	30
2.2.14.	İmmunoblotlama.....	30
2.2.15.	İstatistiksel Analizler.....	31

2.2.16. PathScan İnflammation Multi-Target Sandwich ELISA kit	31
3. SONUÇLAR	32
3.1. A549 Hücrelerinde Palbociclib'in Sağkalım Üzerine Etkileri.....	32
3.2. A549 Hücrelerinde Palbociclib'in Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri.....	33
3.3. A549 Hücre Hattında Koloni Formasyonunun Gösterilmesi	34
3.4. A549 Hücrelerinde Palbociclib'in Etkisini Fluoresan Boyamalar ile Gösterilmesi	36
3.5. A549 Hücre Hattında Palbociclib'in Moleküler Hedefler Üzerine Etkilerinin Gösterilmesi.....	37
4. TARTIŞMA	41
5. KAYNAKLAR.....	49
6. EKLER.....	54
EK A: Cihazlar.....	54
EK B: HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI.....	55
EK C: KULLANILAN KİMYASALLAR	56
EK D: KULLANILAN ANTİKORLAR.....	57
EK E: KULLANILAN KİTLER.....	58
EK F: ÇÖZELTİLER.....	58
ÖZGEÇMİŞ	60

KISALTMALAR

AAK:	Akciğer adenokarsinoma
AK:	Adenokarsinoma
AKT (PKB):	Protein kinaz B
ALK:	Reseptör tirozin kinaz
APC:	Adenomatöz polipozis coli
ASHK:	Akciğer skuamöz hücreli karsinoma
ATCC:	Amerikan tip kültür koleksiyonu
BCL-XL:	B-hücresi lenfoma-ekstra büyük
BCL-2:	B-hücresi lenfoma
BRAF:	B-Raf protoonkogen
BSA:	Sığır serum albumin
BT:	Kontrastlı bilgisayarlı tomografi
CDK:	Sikline bağımlı kinaz
CDK1:	Sikline bağımlı kinaz-1
CDK2:	Sikline bağımlı kinaz-2
CDK 4/6:	Sikline bağımlı kinaz 4/6
CLB:	Hücre özütleme tamponu
c-Myc:	Miyelositomatos viral onkogen homologu
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM:	Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DDR2:	Diskoidin alan reseptörü 2

DMSO :	Dimetil sülfoksit
DNA :	Deoksiribonükleik asit
DSÖ:	Dünya sağlık örgütü
E2F:	Transkripsiyon faktörü
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
EML4:	Mikrotübül bağlı protein benzeri 4
EMT:	Epitel-mezenkimal geçişi
ERBB1 (HER1):	Reseptör protein tirozin kinaz
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
FBS:	Fetal sığır serumu
FGFR1:	Fibroblastik büyüme faktörü reseptörü 1
fosfo-NF-κB:	Fosfo-B hücresi nüklear faktör kappa-hafif zincir-aktivatörü
fosfo-SAPK:	Fosfo-stres ile aktive olan kinaz
FOXM1:	Forkhead box M1
FZD2:	Frizzled class receptor 2
GDP:	Guanozin difosfat
GTP:	Guanozin trifosfat
H&E :	Hematoksilen ve eozin
HRAS:	Protoonkogen
IARC:	Uluslararası kanser ajansı
İGE:	İnsani gelişme endeksi
İkB:	Kappa B'nin inhibitörü
JAK :	Janus kinaz

JNK:	C-Jun N-terminal kinazı
KHAK:	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK:	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
Ki-67:	Nükleer bir protein
KRAS:	Protoonkogen
MAPK:	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MEK (MAPKK):	Mitojenle aktive olan kinaz
MMP-7:	Matriks metalloproteinaz-7
mTOR:	Memeli rapamisin hedefi
NET:	Nöroendokrin tümörler
NF- κ B:	B hücresi nükleer faktör kappa-hafif zincir-aktivatörü
NRAS:	Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog
p16 (CDKN2A):	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
p16 INK4a:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
p53:	Apoptozun-tümör-ilişkili proteini -53
PBS:	Fosfat tamponlu tuz
PCP:	Kanonik olmayan düzlemsel hücre polaritesi yolu
PD-0332991:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü bir ajan
PET:	Pozitron emisyon tomografisi
PI:	Propidyum iyodür
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-fosfat
PI3K α :	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa
RAF:	Proto-onkogen serin/treonin-protein kinaz

RAS:	Rat sarkoma viral onkogen homolog
RB:	Retinoblastoma
RNA:	Ribonükleik asit
SAPK:	Stres ile aktive edilen kinaz
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
Ser:	Serin
siRNA:	Küçük engelleyici RNA
STAT:	Transkripsiyonun sinyal dönüştürücüsü ve aktivatörü
STAT3:	Transkripsiyonun sinyal dönüştürücüsü ve aktivatörü-3
Sulf-1:	Sülfataz-1
Sulf-2:	Sülfataz-2
TBS:	Tris tamponlu tuz
TBS-T:	TBS-tween
TCF:	T-hücre faktörü
TEMED:	Tetrametiletildiamin
Thr:	Treonin
TNKS1:	Poli [ADP-riboz] polimeraz tankiraz-1
TNKS2:	Poli [ADP-riboz] polimeraz tankiraz-2
TTF-1:	Tiroid transkripsiyon faktörü
TP53:	P53 geni
Tyr:	Tirozin
VEGF-A:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü A

Wnt:

Wingless type (kanatsız tip)



SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%:	Yüzde
°C:	Derece
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar
g:	Santrifüj kuvveti
gr:	Gram
kDa:	Kilodalton
L:	Litre
M:	Molar
ml:	Mililitre
mm:	Milimetre
nm:	Nanometre
pH:	Hidrojen derecesi
rpm:	Dakikadaki dönüş sayısı
sa:	Saat

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.1. 2018'de her iki cinsiyet için en sık görülen 10 kanserin olguları ve ölümlerinin dağılımları (Bray ve ark., 2018).....2
- Şekil 1.2. Akciğer kanseri içindeki gen mutasyonları, amplifikasyonları ve gen füzyonları. (a) gen ekspresyonunun üç ortak KHDAK tipi içindeki ilişkilerini gösterir. Gösterilen genlerin paternleri, baskın genetik değişiklikler açısından kanser alt tiplerindeki eğilimleri göstermek için göreceli ve mutlak değildir. Özellikle küçük hücreli akciğer kanserinin skuamöz hücreli karsinoma ve adenokarsinoma ile benzerliği vurgulanmıştır. (b) Bu genetik yerleşim yerlerinde, mevcut mutasyonların niteliği bakımından önemli farklılıklar vardır. Özellikle AK ile yaygın olan ve gösterilen mutasyonları, amplifikasyonları ve delesyonları kapsayan EGFR mutasyonları (Wood ve ark., 2015) uyarlanarak alınmıştır.12
- Şekil 1.3. KHDAK'ye yönelik bazı önemli keşifler ve klinik çalışmalar (HerBst ve ark., 2018) uyarlanarak alınmıştır.15
- Şekil 1.4. Hücre döngüsü ve hücre döngüsünün düzenlenme süreci. (Cadoo ve ark., 2014) uyarlanarak alınmıştır.16
- Şekil 1.5. CDK komplekslerinin biyolojik fonksiyonlarının özeti (Asghar ve ark., 2015) uyarlanarak alınmıştır.....17
- Şekil 1.6 Palbociclib (PD-0332991) (Cadoo ve ark., 2014)19
- Şekil 1.7. Palbociclib'in etki mekanizması. Siklin D1, CDK4'ü ve daha sonra ortaya çıkan kompleks fosforilatları retinoblastoma proteinini aktive eder. RB fosforile edildikten sonra (P) E2F transkripsiyon faktörleri ailesi serbest kalır. Böylece G1-S geçişi sağlanmış olur. Palbociclib, RB fosforilasyonunu nihai olarak engelleyerek G1-S geçişini engeller. Palbociclib'in bir başka önerilen etkisi de EMT sürecine katkıda bulunan COX-II enziminin ekspresyonunu inhibe ederek metastazı azaltmasıdır. EMT, hücrelere invazif ve metastatik özellikler verir. Ayrıca, anjiyogenezde rolü olduğu bildirilen CDK6'nın bloke edilmesiyle Palbociclib'in anjiyogenez etkisine sahip olduğu önerilmektedir (Ehab ve ark., 2016) uyarlanarak alınmıştır.20
- Şekil 1.8. Kanser hücrelerinde Wnt sinyallerinin şematik gösterimi. A. Kanonik Wnt yolu B. Kanonik olmayan düzlemsel hücre polaritesi (PCP) yolu C. Kanonik olmayan

Wnt/Ca ⁺² yolu D. Kanonik olmayan Wnt5/Fzd2 yolu. (Sandsmark ve ark., 2017) uyarlanarak alınmıştır.....	23
Şekil 1.9. Kanserde NF-κB'in rolleri (NF-κB) doğrudan ve dolaylı olarak enflamasyonu, kanser hücresi proliferasyonunu ve sağkalımını, epitelyal mezenşimal geçişi (EMT), invazif davranışı, anjiyogenez ve metastazı, genetik ve epigenetik değişiklikleri, kanser kök hücre oluşumunu kontrol eder. Hücresel metabolizma ve terapi direnci. NF - κB aktivasyonu, çeşitli mekanizmalar yoluyla immünoşüpresyona neden olur. (LPS, lipopolisakarit; TNF, tümör nekroz faktörü) (Taniguchi ve Karin, 2018)'den değiştirilerek alınmıştır.	24
Şekil 1.10. A549 hücreleri (https://www.atcc.org/~ps/CCL-185.ashx).....	25
Şekil 3.1. Palbociclib ile muamele edilen A549 akciğer kanseri hücre hatlarındaki (KHDAK) hücre sağ kalım potansiyelinin doza bağlı olarak (0-96) saat arasında gösterilmesi. Lineer grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması ± standart hatası olarak sunulmuştur (n=2). Her bir deney 100000 hücre ile başlatılmıştır.	32
Şekil 3.2. Farklı dozlarda Palbociclib ile muamele edilen A549 akciğer kanseri hücreleri 0-24 ve 48 saatten sonra DiOC6 ile mitokondri membran potansiyeli açısından floresan mikroskopunda incelenmesi.....	33
Şekil 3.3. Farklı doz ve zamanlarda Palbociclib ile muamele edilen A549 hücrelerinde yara kapanma mesafelerinin sütun grafik ile gösterilmesi. (GraphPad Prism 8 kullanılarak çizilmiştir.).....	33
Şekil 3.4. A549 akciğer kanseri hücrelerinde Palbociclib uygulaması sonucunda koloni oluşturma potansiyeli hücrelerin gösterilmiştir. Kristal boyama sonuçları sunulmaktadır.	34
Şekil 3.5. A549 KHDAK hücrelerine 1 µM ,2.5 µM ve 5 µM Palbociclib 24 saat süre ile uygulanmıştır. Hücre koloni çapı ve koloni sayısı graphpad programı kullanılarak sütun grafik elde edilmiştir. Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması ± standart hatası olarak sunulmuştur (n=3). Her bir deney 2500 hücre ile başlatılmıştır.	35
Şekil 3.6. A549 hücrelerinde 1µM Palbociclib'in 24 saat uygulanması sonucunda hücre ölümü ile ilgili verilerin floresan mikroskopu ile gösterilmesi. Görüntüler en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir.....	36

Şekil 3.7. NF-κB sinyal kaskadında görülen değişimlerin sandviç ELİSA yöntemi ile belirlenmesi. Kolon grafikler ortalama±Std. hata olarak sunulmaktadır. Absorbans 450 nm. (n=2).....	38
Şekil 3.8. MAPK sinyal yolağı ve STAT3 aktivitesinin sandviç ELİZA yöntemi ile A549 akciğer kanseri hücrelerinde gösterimi. Kolon grafikler ortalama ± Std. hata olarak sunulmaktadır. Absorbans 450 nm. (n=2).....	38
Şekil 3.9. 24 saatlik 1 µM Palbociclib uygulaması sonucunda Wnt sinyal yolağı üzerindeki proteinlerin anlatımının Western Blot tekniğı ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak pan-Actin kullanılmış olup bu sonuçlar en az n=3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.....	39
Şekil 3.10. Western Blot sonuçlarına göre elde edilmiş protein miktarlarının İmageJ programı kullanılarak normalize edilmesi. Pan-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.....	40
Şekil 4.1. GSK-3'ün üstünde gri renkle gösterilen GSK-3 fosforilasyonu tarafından inaktive edilen transkripsiyon faktörleri vardır. GSK-3'ün alt kısmında, sarı renkle gösterilen GSK-3 fosforilasyonu tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörleri vardır. Kırmızı ovalerde belirtilenler Wnt/beta-katenin yolundaki moleküllerdir.Kırmızı ovalerde gösterilen GSK-3 fosforilasyonu ve turuncu oval olarak belirtilen beta-katenin ile aktive edilir. Ayrıca belirtilen Bax pro-apoptotik molekülüdür. Bax'in mitokondrial lokalizasyonu, GSK-3 tarafından fosforile edildiğinde hücre apoptoza teşvik edilir. Ayrıca, GSK-3 fosforilasyonu (PTEN, siklin D1 ve p21Cip-1) ve gri sembollerle gösterilen beta-katenin tarafından inaktive edilmiş bazı hücre döngüsü ve sinyal proteinleri de ifade edilmiştir. (McCubrey ve ark., 2017)'den uyarlanarak alınmıştır.	46
Şekil 4.2. STRING veritabanında WNT-NF-κB-MAPK-STAT sinyal ekseninin etkileşim ağının gösterilmesi	47

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan globacan 2012 verilerine göre kadınlarda ve erkeklerde sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı (Gültekin ve ark., 2018)	3
Tablo 1.2. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 akciğer kanseri sınıflandırması (Zheng, 2016) uyarlanarak alınmıştır.....	4
Tablo 6.1. Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler kullanılan cihazlar gösterilmiştir.	54
Tablo 6.2. Tez çalışması kapsamında hücre doku kültüründe kullanılan malzemeler.....	55
Tablo 6.3. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerde kullanılan kimyasallar	56
Tablo 6.4. Tez çalışması kapsamında kullanılan enflamasyon proteinleri izolasyonu kiti	58
Tablo 6.5. 10 X Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), (pH 7,4).....	58
Tablo 6.6. Hücre Dondurma Medyası.....	58
Tablo 6.7. Hücre Lizis Tamponu (CLB).....	59

ÖZET

Akciğer kanseri dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir. Vakaların yaklaşık % 85'ine neden olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve ikincisi % 15'ini oluşturan küçük hücreli akciğer kanseri olmak üzere iki geniş alt tipte sınıflandırılır. Akciğer kanserinin altında yatan moleküler mekanizmalar kanserin başlaması, ilerlemesi, çevresel faktörlerden etkilenen dinamik epigenetik değişikliklerin yanı sıra nokta mutasyonları, delesyonlar, yer değiştirme ve/veya amplifikasyonlar dahil olmak üzere kalıcı genetik değişiklikler kombinasyonlarının birikmesi sonucudur. Hücre içi sinyal iletimleri iyi tanımlanmış MAPK, mTOR, Notch , Hedgehog, Wnt gibi birçok sinyal yolları vardır. Sinyal iletim mekanizmaları üzerindeki bozulmalar da kanser nedenlerinden biridir. Bu yollardan biri olan Wnt sinyal yolu, hücre kaderinin belirlenmesi, hücre göçü, hücre polaritesi, nöronal şekillendirme ve embriyonik gelişim sırasında organogenezin kritik yönlerini düzenleyen eski ve evrimsel olarak korunan bir yoldur. Diğer yandan sikline bağımlı kinazların da (CDK) kanserle ilişkileri vardır. Hücre döngüsü, hücre bölünmesi ve replikasyonu için gerekli olan büyüme, kromozomal replikasyon ve mitozun çeşitli aşamalarında görev alırlar. Karmaşık bir etkileşime giren proteinler kümesi, memeli hücrelerinde hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi sıkı bir şekilde düzenler. Bu nedenle kanser tedavisinde CDK'ların inhibisyonu büyük önem arz etmektedir. CDK inhibitörü olarak kullanılması için prelinik ve klinik olmak üzere birçok çalışma vardır. Palbociclib de bunlardan biridir. İlk olarak 2014'te meme kanserinin tedavisi için geliştirilmiş daha sonrasında diğer kanserler üzerine de etkileri incelenmeye başlanmış ve hala daha bu araştırmalar büyük bir hızla devam etmektedir. Bu tez kapsamında A549 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri üzerinde Palbociclib'in enflamasyon ile ilişkili moleküller üzerine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

ABSTRACT

Lung cancer is one of the leading causes of cancer deaths worldwide. Classifies two broad subtypes: Non-small cell lung cancer (NSCLC), which causes approximately 85 % of the cases, and small cell lung cancer, which constitutes 15 %. The molecular mechanisms underlying lung cancer are the result of the onset of cancer, the accumulation of combinations of permanent genetic changes including point mutations, deletions, displacements and/or amplifications, as well as the dynamic epigenetic changes affected by environmental factors. Intracellular signal transductions are well-defined MAPK, mTOR, Notch, hedgehog, Wnt as well as many signaling pathways. Disturbances on signal transduction mechanisms are also one of the causes of cancer. One of these pathways, the Wnt signaling pathway, is an ancient and evolutionary pathway that regulates critical aspects of organogenesis during cell fate determination, cell migration, cell polarity, neuronal styling, and embryonic development. On the other hand, Cyclin-dependent kinases (CDK) have frequent associations with cancer. They are involved in various stages of growth, chromosomal replication and mitosis necessary for cell cycle, cell division and replication. A complex set of interacting proteins strictly regulates progression through the cell cycle in mammalian cells. Therefore, the inhibition of CDKs in cancer treatment has great importance. There are many studies, including preclinical and clinical, for use as CDK inhibitors, Palbociclib is one of them. It was first developed for the treatment of breast cancer in 2014, and then its effects on other cancers have also started to be investigated and these studies are still continuing in a great pace. In this thesis, we aimed to investigate the effects of Palbociclib on inflammation in non-small cell lung cancer cells.

1. GENEL BİLGİLER

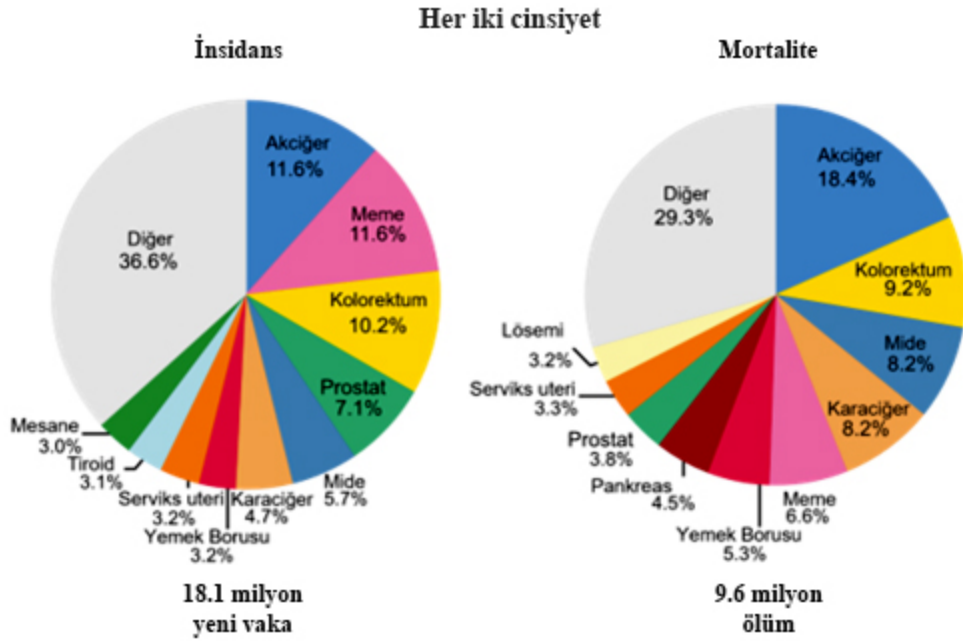
1.1. Dünyada Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri dünyada erkeklerde en sık görülen kanser türüdür (1,1 milyon, % 16,5) ve Güney Avrupa, Orta Doğu, Kuzey Amerika ve Doğu Asya'da görülme sıklığı yüksektir. Batı ve orta Afrika'da çok düşük oranlar tahmin edilmektedir (yaş standardize edilmiş oran sırasıyla 100.000'de 2,8 ve 3,1). Genel olarak, kadınlarda görülme oranı erkeklerden daha düşüktür. Ancak akciğer kanseri şu anda kadınlar arasında dünya çapında en yaygın dördüncü kanserdir (513,000 vaka, tüm kanserlerin % 8,5'i) ve kadınlarda ikinci sırada kanser ölüm nedenidir (427.000 ölüm, toplamın % 12,8'i). En yüksek akciğer kanseri insidansı Kuzey Amerika'da (kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir) ve Orta Afrika'da (en yaygın onbeşinci kanser) görülme sıklığı en düşüktür (Rafiemanesh ve ark., 2016).

Akciğer kanseri, hem erkek hem de kadınlarda dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir (Şekil 1.1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) akciğer kanserini iki geniş histolojik alt tipte sınıflandırır: Birincisi vakaların yaklaşık % 85'ine neden olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve ikincisi % 15'ini oluşturan küçük hücreli akciğer kanseridir (KHAK) (Zappa ve ark., 2016).

KHDAK'nın en sık görülen histolojik iki alt tipi akciğer adenokarsinoma (AAK) ve akciğer skuamöz hücreli karsinoma (ASHK). Bir diğer üçüncü alt tip ise büyük hücreli karsinomadır. akciğer adenokarsinoma tüm KHDAK'lerin % 40'ı, akciğer skuamöz hücreli karsinoma (tüm KHDAK'lerin % (20-30)'u, büyük hücreli karsinoma ise % (2-5)'ini oluşturur. Diğer %20'lik kısım ise mutasyona uğramış (onkojen bağımlı) veya bilinen bir mutasyon olmayan gruptur (Malapelle ve ark., 2019). Akciğer kanseri için en yaygın etiyoloji, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer ülkelerde vakaların % 80'inden fazlasını tütün ürünlerinin kullanımı oluşturur. Sigara içmeyenlerde akciğer kanseri kadınlarda ve Doğu Asya'da daha yaygındır ve pasif içicilik, kirlilik, mesleki kanserojenler ve kalıtsal genetik duyarlılığı arttıran çevresel risklerle ilişkilendirilmiştir (Herbst ve ark., 2018). Bununla birlikte, akciğer kanseri oranlarındaki potansiyel farklılıklar ülkeler arasındaki sosyoekonomik gelişme

düzeyleriyle daha az açıklanmaktadır. Bu, tüm akciğer kanseri vakalarının neredeyse yarısının (% 49), İnsani Gelişme Endeksi'nde (İGE) orta ila düşük seviyelerde sıralanan ülkelerde meydana gelmesi nedeniyle önemlidir (Cheng ve ark., 2016). Tütün kullanımı, tüm akciğer kanserlerinin % (80-90)'ına neden olmaktadır. Sigara dumanına maruz kalma, akciğer kanseri riskinin yüksek olmasıyla ilişkili olarak önemli bir risk faktörüdür. Pasif içicilik ile akciğer kanseri arasındaki ilişki akciğer kanserlerinin % 1,6'sını oluşturur (Molina ve ark., 2008). Risk faktörleri tipik olarak doza ve süreye bağlıdır ve birçok kanserojen, tütün dumanıyla birleştirildiğinde sinerjik olarak etki eder. Örneğin, içme suyunda arsenik, aynı anda tütün dumanına maruz kalmayla birleştiğinde akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Bazı evlerde doğal olarak bulunan bir radyoaktif gaz olan Radon'un, yılda 21.000 akciğer kanseri vakasına neden olduğu tahmin edilmektedir. Açık veya kapalı hava kirliliği akciğer kanseri için önemli bir çevresel risk faktörüdür; kirli havaya uzun süre maruz kalmak kesinlikle akciğer kanseri riskini artırır (Mao ve ark., 2016).



Şekil 1.1. 2018'de her iki cinsiyet için en sık görülen 10 kanser türünün olguları ve ölümlerinin dağılımları (Bray ve ark., 2018)

1.2. Türkiye’de Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri ülkemizde en sık görülen ve ölüme neden olan kanser türlerinden biridir. Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı’nın 2012 yılı araştırmalarına göre akciğer kanseri ülkemizde hem tüm nüfusta hem de erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Kadınlarda ise beşinci sıradadır (Tablo 1.1) Erkeklerde tüm kanserlerin % 21,8’ini, kadınlarda ise % 4,9’unu oluşturmaktadır. Türkiye’de akciğer kanserinin yaşa göre insidansı erkeklerde 100.000’de 60,4’tür, kadınlarda ise 100.000’de 9,3 olarak bildirilmektedir. Akciğer kanserinin görülme sıklığı ülkemizde batı bölgelerinde daha fazladır. Türk Toraks Derneği’nin 2009 yılında gerçekleştirdiği “Türkiye’nin akciğer kanseri haritası” projesinde her yıl Türkiye’de 29.314 yeni akciğer kanseri olgusu ortaya çıktığı hesaplanmıştır. Akciğer kanserlerinin % 80,7’si küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), % 16,4’ü küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve % 2,9’u ise diğer alt tiplerdir. Yaş ilerledikçe görülme sıklığı artmaktadır. Bu çalışma sonuçlarına göre Türkiye’de akciğer kanserine yakalanan hastaların yaş ortalaması 60 olup, % 90,4’ü erkektir. En sık rastlanan tip skuamöz olmayan hücreli iken 45 yaş altı genç popülasyonda ve kadınlarda en sık adenokarsinoma saptanmaktadır. Olguların tanı konduğu sırada % 47 gibi en büyük çoğunluğu metastatik evrede iken, % 37’si lokal ileri evrede, sadece % 16’sı operasyona uygun evrede yakalanmaktadır (Uluç ve ark., 2016).

Tablo 1.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan globacean 2012 verilerine göre kadınlarda ve erkeklerde sık görülen ilk beş kanser türünün dağılımı (Gültekin ve ark., 2018)

Erkeklerde En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı					
	Türkiye	Dünya	IARC’a üye 24 ülke	AB (28 ülke)	ABD
1	Akciğer	Akciğer	Prostat	Prostat	Prostat
2	Prostat	Prostat	Akciğer	Akciğer	Akciğer
3	Mesane	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
4	Kolorektal	Mide	Mide	Mesane	Mesane
5	Mide	Karaciğer	Mesane	Böbrek	Böbrek

Kadınlarda En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı					
	Türkiye	Dünya	IARC’a üye 24 ülke	AB (28 ülke)	ABD
1	Meme	Meme	Meme	Meme	Meme
2	Tiroid	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Akciğer
3	Kolorektal	Uterus serviksi	Akciğer	Akciğer	Kolorektal
4	Uterus korpusu	Akciğer	Uterus serviksi	Uterus korpusu	Tiroid
5	Akciğer	Uterus korpusu	Uterus korpusu	Uterus serviksi	Uterus

1.3. Akciğer Kanserlerinin Sınıflandırması

Akciğer kanserleri geleneksel olarak küçük hücreli dışı olmayan akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olarak ayrılır. Vakaların % 80'ini KHDAK, % 20'sini de KHAK oluşturur. KHAK'ler agresif karakterli ve çoğu durumda cerrahi dışı tedavi edilen tiptir, KHDAK'ler ise cerrahi ve adjuvan tedavinin bir kombinasyonu tarafından yönetilir. KHDAK'de 2004'te bir sınıflandırma yapmış ve sonraki yıllarda yapılan araştırmalar ışığında yeni gelişmelerle birlikte son olarak 2015'te Dünya Sağlık Örgütü yeni sınıflama tanımlarına gerek duymuştur (Tablo 1.2). Ana KHDAK'lerin tipleri arasında adenokarsinoma, skuamöz hücreli karsinoma (SHK) ve büyük hücreli karsinoma (BHK) bulunur. Böylece, KHDAK'nin alt tipi tanımlanırken, KHAK'ler nöroendokrin farklılaşması gösteren diğer tümörler ile birlikte gruplandırılmıştır (Zheng, 2016).

Tablo 1.2. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 akciğer kanseri sınıflandırması (Zheng, 2016) uyarlanarak alınmıştır.

1. Adenokarsinoma	4. Büyük Hücreli Karsinoma
Lepidik Adenokarsinoma	5. Adenoskuamöz Karsinoma
Asiner Adenokarsinoma	6. Pleomorfik Karsinoma
Papiller Adenokarsinoma	7. İğsi Hücre Karsinoma
Mikropapiller Adenokarsinoma	8. Dev Hücreli Karsinoma
Katı Adenokarsinoma	9. Karsinosarkoma
İnvaziv Müsinöz Adenokarsinoma	10. Akciğer Blastoma
Kolloid Adenokarsinoma	11. Sınıflanmamış Karsinomalar
Fetal Adenokarsinoma	Lenfoepitelyoma Benzeri Karsinoma
Enterik Adenokarsinoma	NUT Karsinoma
Minimal İnvazif Adenokarsinoma	12. Tükürük Bezi Tipi Karsinomlar
2. Skuamöz Hücreli Karsinoma	Mukoepidermoid Karsinoma
3. Nöroendokrin Tümörler	Adenoid Sistik Karsinoma
a. Karsinoid Tümörler	Epitelyal-Miyoepitelyal Karsinoma
Tipik Karsinoid	13. Mezenşimal Tümörler
Atipik Karsinoid	14. Lenfohistiyositik Tümörler
b. Küçük Hücreli Karsinoma	15. Ektopik Kökenli Tümörler
c. Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinoma	16. Metastatik Tümörler

1.3.1. Akciğer Adenokarsinoma

Genellikle santral fibroz ve plevral büzülme ile periferik olarak yerleştirilmiş bir kitle oluşturur. Aynı zamanda, merkezi olarak yerleştirilmiş kütle, dağınık lober konsolidasyonu, bilateral multinodüler dağılım ve plevral kalınlaşma dahil olmak üzere diğer çeşitli brüt görünümlere de sahip olabilir. Tanım olarak, akciğer adenokarsinoma, glandüler farklılaşma veya müsin üretimi ile malign bir epitelyal neoplazmdır. Bu gibi morfolojik özellikler tanındığında, tümör küçük biyopsi örneklerinde bile adenokarsinoma olarak tanımlanabilir. Akciğer adenokarsinoma hücreleri genellikle pnmositik belirteçleri eksprese eder.

Tiroid transkripsiyon faktörü (TTF-1) ve Napsin A (Surfaktan proteini B'nin olgunlaşmasında rol oynayan pepsin ailesinin yesi olan, akciğerlerde tip II pnmositlerde ve böbreklerde eksprese edilen, asparatik bir proteazdır) NapsinA, akciğer adenokarsinoması görülen vakalarının % 85'inden fazlasında eksprese edilir ve bu nedenle, zayıf biçimde farklılaştırılmış tümörlerde ve sınırlı biyopsi örnekleme materyalinde adenokarsinoma veya adenokarsinoma farklılaşmasının belirteçleri olarak görev yapabilir (Gurda ve ark., 2015).

Yakın yıllarda patolojik ve klinik korelasyona dayanarak adenokarsinoma sınıflamasında belirgin bir iyileşme olmuştur. Ana histolojik tipler, tümörün derecesine göre tanımlanmış prognostik önemi taşıdığı doğrulanmıştır. Adenokarsinomalarda, hastanın sağkalımını iyileştirmek için onaylanmış moleküler hedefli tedavi ile çoklu gen değişiklikleri olabilir (Zheng, 2016).

1.3.2. Skuamöz Hücre Karsinoma

SHK'ler akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Son yıllarda sigara içme davranışındaki değişikliklerden dolayı görülme sıklığı azalmıştır. SHK genellikle akciğerin orta kısmında, ana hava yollarında meydana gelir ve büyük bir boyuta ulaştığında oyuklar oluşturabilir. Mikroskopik incelemede SHK, karakteristik olarak keratinizasyon ve hücreler arası köprüler gösterir ve sağlam bir i ie büyüme deseni

sergiler. Tümör hücreleri genellikle göze çarpmayan nükleollere görülebilen ve sınırlandırılmış hücreler arası köprüler ile orta ila bol miktarda sitoplazmaya sahip, hiperkromatik çekirdeklere sahiptir. Bireysel tümör hücresi keratinizasyonu veya merkezi olarak katı tümör yuvaları içine yerleştirilmiş keratin incileri oluşturan keratinize edici skuamöz hücre grupları olabilir. Tümör hücrelerinde glandüler yapı veya müsin üretimi yoktur. SHK'ler ayrıca keratinize, keratinize olmayan ve bazaloid alt tiplere ayrılır (Travis, 2012). Adenokarsinoma alt tiplerinin aksine, bu alt sınıflandırma, sitotoksik kemoterapiye özgün direnç kazandıran farklı moleküler profil sergileyen bazaloid SHK'ler dışında belirgin bir prognostik fayda göstermez. Keratinizasyon, keratin inci oluşumu ve hücreler arası köprüler gibi skuamöz hücre farklılaşmasının morfolojik özelliklerini tanımak, küçük biyopsi örneklerinde bile SHK tanısı koyar. Tümör kötü bir şekilde ayırt edildiğinde ve kendinden emin morfolojik sınıflandırmaya izin vermediğinde, p40, CK5/6, CK5 ve p63 gibi seçici skuamöz hücre markerleri, skuamöz farklılaşmayı göstermek için kullanılır. (Terry ve ark., 2010). Biyopsi materyali içindeki skuamöz hücre markörlerinin ekspresyonu ile tanımlanan zayıf şekilde farklılaştırılmış tümör, “KHDAK, SHK” olarak tanınır. Bu kategorideki tümörlerin genellikle mevcut moleküler testlerden dışlanmasına rağmen, SHK'deki diskoidin alan reseptörü 2 gibi sürücü mutasyonlarının tanımlanması (DDR2), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt ünite alfa (PI3KCA), fibroblastik büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR1) ve v-akt murin tiroma viral onkojen homolog 1 (AKT1), gelecekte kişiselleştirilmiş terapiyi sağlayabilir. Skuamöz hücre farklılaşmasının kurulması, bazı komplikasyonlardan kaçınmak için kemoterapötik ajan seçeneklerinde önemli etkileri vardır. Örneğin, SHK hastalarında vasküler endotel büyüme faktörü inhibitörü bevacizumab ile tedavide potansiyel olarak yaşamı tehdit edici pulmoner kanamayı artırabilir ve bu nedenle kaçınılmalıdır. SHK için sağkalım oranı adenokarsinomadan anlamlı olarak daha iyidir (Gold ve ark., 2012).

1.3.3. Nöroendokrin Tümörler

Bir grup olarak nöroendokrin tümörler, akciğer kanserlerinin yaklaşık % (20-25)'ini oluşturan nispeten yaygın akciğer tümörleridir. Yaygın morfolojik

immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel özellikleri, diğer akciğer tümörlerinden ayrıdır. Bu özellikler organoid büyüme paternini, ince taneli kromatin paternini ve birçok damara özgü nöroendokrin hedefin ifade düzeyindeki değişimleri içerir. Yaygın nöroendokrin moleküler hedefler arasında kromogranin A, sinaptofizin ve CD56 bulunur. Yukarıda belirtilen özelliklerin çoğunu veya tümünü koruyan iyi farklılaştırılmış tümörler ve kaybedilen zayıf farklılaştırılmış tümörler ile heterojen bir farklılaşma derecesi vardır. Bu histolojik farklılaşma, sırasıyla tümör agresifliği ve prognozu ile ilişkili olan tümör proliferasyon hızı ile özetlenir (Klimstra ve ark., 2010).

1.3.4. Küçük Hücreli Karsinoma

Küçük hücreli karsinomalar veya KHAK'ler tüm akciğer kanserlerinin %10'undan biraz daha fazlasını içerir. Sigara içme öyküsü, neredeyse tüm KHAK vakalarında mevcuttur. KHAK oldukça agresif bir malignitedir. Hastalar genellikle başvuru sırasında metastatik hastalık gösterir. Hastaların çoğu tedaviden sonraki ilk 2 yıl içinde nüks eder ve 2 yıllık sağkalım oranı metastatik hastalarda % 10'dan azdır. KHAK, genellikle ana hava yolunda merkezi bir konumda bulunur. KHAK'nin belirgin morfolojik özellikleri vardır ve rutin hematoksilin ve eozin (H&E) ile kaplanmış kısımlar üzerinde dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi yüksek bir teşhis doğruluğu sağlar. Tümör hücrelerinin, diğer üç tip lenfosit çapından daha az olan diğer akciğer kanserleri ile karşılaştırıldığında boyutu küçüktür. Kromatin, belirgin nükleoller olmadan ince tanelidir. Sitoplazma yetersizdir ve hücresel sınırlar belirgin değildir. Yüksek bir mitotik hızı vardır, genellikle 2 mm² başına 10 mitozdan daha yüksektir (Planchard ve ark., 2011).

Dünya çapında küçük hücreli akciğer kanserinin görülme sıklığı ve mortalitesi bu hastalığı önemli bir sağlık sorunu haline getirmektedir. Hastaların tipik özelliği mevcut veya geçmiş zamanda ağır sigara içicileri olan, pulmoner ve kardiyovasküler rahatsızlıkları bulunan 70 yaşından büyük erkeklerdir. Hastalar genellikle lokal intratorasik tümör büyümesi, ekstrapulmoner uzak yayılım, paraneoplastik sendromlar veya bu özelliklerin bir kombinasyonundan dolayı hızlı başlayan semptomlar gösterir. Evreleme, nihayetinde metastatik veya metastatik olmayan hastalığı tanımlamayı amaçlar. Kombinasyon kemoterapisi, genellikle platin bazlı artı etoposid veya

irinotekan, metastatik küçük hücreli akciğer kanseri için temel tedavidir. Metastatik olmayan hastalık için, kanıtlar erken eş zamanlı torasik radyoterapiyi destekler. İndüksiyon kemoterapisi ve radyoterapiden sonra hastalığı ilerlemeyen metastazı olan veya olmayan hastalar için profilaktik kraniyal ışınlama düşünülmelidir (van Meerbeeck ve ark., 2011).

1.4. Akciğer Kanserin Moleküler Mekanizmaları

Akciğer kanserinin başlaması ve ardından ilerlemesi, çevresel faktörlerden etkilenen dinamik epigenetik değişikliklerin yanı sıra nokta mutasyonları, delesyonlar, yer değiştirme ve/veya amplifikasyonlar dahil olmak üzere kalıcı genetik değişiklikler kombinasyonunun birikmesinin bir sonucudur. Epigenetik değişiklikler, hücrenin çekirdeğindeki bir protein ve DNA kompleksi olan ve replikasyon, onarım, rekombinasyon ve transkripsiyon gibi tüm DNA-bağımlı işlemleri etkileyen kromatinin kalıtsal değişikliklerinin toplamını ifade eder. Kromatin aracılı transkripsiyon düzenleme, DNA metilasyonunu, histon modifikasyonlarını, nükleozom yeniden düzenlemesini, nükleer matriks ile etkileşimi ve küçük kodlayıcı olmayan RNA'lar yoluyla düzenlemeyi içerir. Epitel-mezenkimal geçişi (EMT) ile ilişkili bir gen alt kümesinin, DNA metilasyonundan sonra KHDAK'de önemli ölçüde baskılandığı ve gen artışına özgü DNA metilasyonunun EMT ile korele olduğu gösterilmiştir. EMT, hücre adezyonu kaybı ve artan hücre hareketliliği ile karakterize edilen temel ve korunan bir süreçtir. EMT, mezoderm oluşumu, nöral tüp oluşumu ve yara iyileşmesi de dahil olmak üzere sayısız gelişimsel süreç için esastır. Bununla birlikte, metastazın başlatılması, hücre-hücre yapışması kaybı, hücre mobilitesinde artış ve invazyon da dahil olmak üzere, EMT ile birçok yönden fenotipik benzerliğe sahiptir (Mehta ve ark., 2015). Birçok kanser türünde olduğu gibi akciğer kanserlerine de etki eden çok sayıda mutasyona uğramış, işlevi bozulmuş proteinler vardır (Şekil 1.2).

1.4.1. KRAS

KRAS, RAS proto-onkogen ailesinin bir parçasıdır (KRAS, NRAS ve insanlarda meydana gelen HRAS) ve hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenleyen sinyal iletim yollarını kontrol etmede kritik rol oynayan bir G proteinini kodlar. RAS proteinleri normal hücrelerde guanozin difosfat (GDP) bağlı ve inaktiftir. Yukarı düzenleyici büyüme faktörü reseptörlerinin aktive edilmesinin ardından aktive olmuş guanozin trifosfat (GTP) bağlı forma bir geçiş vardır. Etkinleştirilmiş RAS-GTP daha sonra bir dizi mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), RAS/RAF/MEK/MAPK yolu ve rapamisin (mTOR) yollarının aktive olmasını sağlar. RAS/RAF/MEK/MAPK sinyal transdüksiyon kaskadı, en yaygın KRAS'ta mutasyon olan 188 tümörün 132'sinde tanımlanan yolda en az bir mutasyon bulunan birçok akciğer kanserinde merkezi bir rol oynar (Tímár, 2014).

1.4.2. EGFR

EGFR değişiklikleri KHDAK dahil birçok tümörün patogeneğinde rol oynar. EGFR, hücre dışı bir ligand bağlanma alanı ve bir tirozin kinaz alanı içeren bir hücre içi bileşeni olan bir transmembran tirozin kinazı kodlar. Ligand epidermal büyüme faktörünün bağlanması, EGFR ailesinin diğer üyeleri ile reseptör homo veya heterodimerizasyonuna ve tirozin kinaz alanının aktivasyonuna yol açar. EGFR tarafından uyarılan sinyal iletimi, PI3K/AKT/MTOR, RAS/RAF/MAPK ve JAK/STAT sinyal yollarından meydana gelir. EGFR, hücre çoğalması, hayatta kalma, farklılaşma, neovaskülarizasyon, invazyon ve metastaz gibi çok sayıda onkogenik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynar (Khoo ve ark., 2015). EGFR'deki aktive edici mutasyonlar, yapıcı tirozin kinaz aktivasyonuna ve akciğer epitel hücrelerinin in vitro olarak onkogenik transformasyonuna yol açar. En yaygın EGFR mutasyonlarının indüklenabilir ekspresyonuna sahip transgenik bir fare modeli, küçük molekül inhibisyonuna duyarlı olan çoklu akciğer ADK'nin gelişimini göstermiştir. Artan EGFR sinyalleşmesinin diğer mekanizmaları, arttırılmış protein ifadesi veya arttırılmış gen kopya sayısı içerir. Akciğer kanserinde, adenoskuamöz karsinomalarda da

görülebilmesine rağmen, AK'da hemen hemen tüm EGFR mutasyonları meydana gelir. EGFR'deki mutasyonlar daha sık görülür ancak sadece kadın, genç ve sigara öyküsü olmayan hastalarda bulunur. EGFR mutasyonları histolojik olarak iyi örneklenmiş saf SHK'lerde ancak çok nadir görülür (Cooper ve ark., 2013).

1.4.3. BRAF

BRAF, KRAS'ın aşağı düzenleyici efektör proteini olan bir serin/treonin protein kinazını kodlar ve hücre çoğalmasının ve hayatta kalmasının düzenlenmesinde rol alan MAPK sinyal iletim yolunu aktive eder. BRAF mutasyonlarının aktive edilmesi melanomda sık görülür, KHDAK'nin sadece yaklaşık % 3'ünde görülürler (Paik ve ark., 2011).

1.4.4. PI3K/AKT/MTOR

PI3K/AKT/MTOR yolu, hücre çoğalması, hayatta kalma, farklılaşma yapışma ve hareketliliğinin düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir sinyal iletim yoludur. Bu yolun değişiklikleri, hem KHDAK'de hem de küçük hücreli karsinomada gösterilmiştir. Bu yolak, EGFR, HER2, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü dahil çeşitli membran tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonu ile aktive edilir. PI3K/AKT /mTOR yolu, KHDAK'nin % (50-70)'i dahil olmak üzere birçok tümörde sıklıkla regülasyonu bozulmuştur. PI3K yolunu içeren önemli değişiklikler, Kanser Genom Atlas projesinde SHK'lerin % 47'sinde tanımlanmıştır (Cully ve ark., 2006).

1.4.5. ALK

Reseptör tirozin kinaz ALK'nin yeniden düzenlenmesi, en yaygın olarak ekinoderm mikrotübül bağlı protein benzeri 4'ün (EML4) amino terminal ucu ile hücre içi kinaz bölgesinin füzyonlarına yol açar. ALK aktivasyonu, hücre proliferasyonu ve RAS/RAF/MAPK1, PI3K/AKT ve JAK3-STAT3 sinyalleme yollarının aracılık ettiği

apoptoz inhibisyonu ile bağlantılıdır. ALK düzenlemeleri KHDAK'nın yaklaşık % 4'ünde tanımlanmıştır, ancak bazı çalışmalar biraz daha düşük bir prevalans bulmuştur. Sigara içmeyen veya az içen genç hastalardan daha sık Adenokarsinomalarda neredeyse her zaman bulunurlar (Soda ve ark., 2007).

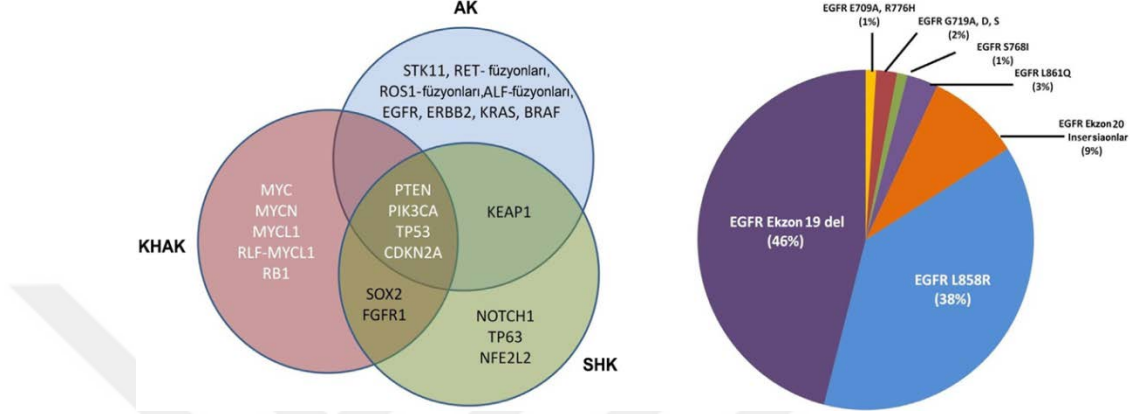
1.4.6. TP53

Kromozom 17p13 üzerinde bulunan TP53, zarar görmüş DNA bölgelerini tanımlayan ve bağlanan ve çok sayıda farklı genin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan 53 kDa'lık bir nükleer fosfoprotein kodlar. Hasarlı DNA veya kanserojen stres, DNA tamirini veya apoptozu sağlamak için sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin ekspresyonunu indükleyerek hücre döngüsünün durdurulmasına yol açan TP53'ü indükler. TP53 inaktivasyonu, küçük hücreli karsinomaların % 90'ında ve KHDAK'nin yaklaşık %65'inde meydana gelen TP53 odağını içeren 17p13 homozigot silinmesi ile akciğer kanserinde en önemli genetik anormalliklerden biridir. Küçük hücreli akciğer karsinomalarının % (80-100)'ünde TP53'teki inaktive edici mutasyonlar (çoğunlukla DNA-bağlanma alanı içindeki hatalı sensör mutasyonları) bildirilmiştir (Mogi ve ark., 2011).

1.4.7. p16^{INK4a}-siklinD1-CDK4-RB Yolağı

p16^{INK4a}-siklinD1-CDK4-RB yolu, G1'den S evresine hücre döngüsü ilerlemesini düzenler. RB1, transkripsiyon faktörü E2F1'i bağlayarak hücre döngüsü G1-S geçişini düzenleyen RB proteinini kodlayan bir tümör baskılayıcı gendir. RB1, akciğer kanserinde tanımlanan ilk TSG idi ve küçük hücreli akciğer karsinomalarının yaklaşık % 90'ında, ancak yaklaşık % 10-15'inde KHDAK'de inaktive edilir. KHDAK'de, yol çoğunlukla siklin D1, CDK4 ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü p16 (CDKN2A) değişiklikleri ile kapatılır. p16^{INK4a}, RB proteininin siklinD1'e bağımlı fosforilasyonunu inhibe eder, böylece G1-S kontrol noktası boyunca hücre döngüsü geçişini önler. p16^{INK4a}, KHDAK'nin yaklaşık % 80'inde inaktiftir ve TCGA tarafından incelenen akciğer SHK'lerinin % 72'sinde, çoğunlukla homozigot delesyon, metilasyon

veya inaktive edici mutasyonların varlığı tespit edilmiştir. Ek olarak, KHDAK'nin yaklaşık % 40'ında gen amplifikasyonu veya diğer mekanizmalar yoluyla siklin D1'in aşırı ekspresyonu vardır (Cooper ve ark., 2013).



Şekil 1.2. Akciğer kanseri içindeki gen mutasyonları, amplifikasyonları ve gen fúzyonları. (a) gen ekspresyonunun üç ortak KHDAK tipi içindeki ilişkilerini gösterir. Gösterilen genlerin paternleri, baskın genetik değişiklikler açısından kanser alt tiplerindeki eğilimleri göstermek için göreceli ve mutlak değildir. Özellikle küçük hücreli akciğer kanserinin skuamöz hücreli karsinoma ve adenokarsinoma ile benzerliği vurgulanmıştır. (b) Bu genetik yerleşim yerlerinde, mevcut mutasyonların niteliği bakımından önemli farklılıklar vardır. Özellikle AK ile yaygın olan ve gösterilen mutasyonları, amplifikasyonları ve delesyonları kapsayan EGFR mutasyonları (Wood ve ark., 2015) uyarlanarak alınmıştır.

1.5. Akciğer Kanserinin Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Akciğer kanserinin en sık görülen semptomları öksürük, solunum güçlüğü, hemoptizi, kilo kaybı ve anoreksi gibi sistemik semptomlardır. Belirtileri olan yüksek riskli hastalar göğüs radyografisine tabi tutulmalıdır. Muhtemel bir alternatif tanı belirlenmezse, bilgisayarlı tomografi ve muhtemelen pozitron emisyon tomografisi yapılmalıdır. Akciğer kanseri şüphesi yüksekse, tanısal bir değerlendirme yapılması garanti edilir. Tanısal değerlendirmede, hepsi tedavi planlamasını ve prognozunu belirlemesini etkileyen üç eşzamanlı aşama (doku tanı, evreleme ve fonksiyonel değerlendirme) vardır. Mümkün olan en az invazif yöntem kullanılmalıdır. Akciğer kanserli bir hastanın tanısal değerlendirmesi ve tedavisi, bir pulmonolog, tıbbi onkolog, radyasyon onkoloğu, patoloğ, radyolog ve göğüs cerrahı dahil olmak üzere bir uzman ekibi gerektirir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri örnekleri, varsa yeni hedef moleküler tedavilerle tedavi edilebilecek çeşitli mutasyonlar için test edilir. Erken palyatif bakım, yaşam kalitesini

iyileştirir ve hayatta kalma süresini uzatabilir. Akciğer kanserli hastalar tanı anında neredeyse her zaman semptomatiktir. Belirtilere primer tümör neden olabilir (örneğin öksürük, hemoptizi); intratorasik yayılma (örneğin, Horner sendromu, superior vena cava tıkanması); ve uzak metastazlar (örneğin, kemik ağrısı). Belirtilere, uygunsuz antidiüretik hormon sendromu gibi paraneoplastik sendromlar da neden olabilir. Bu semptomlar tümörden ektopik hormon üretimi veya vücudun tümöre verdiği reaksiyonun bir sonucudur ve doğrudan tümör veya metastaz ile ilişkilendirilemez. Akciğer kanserli hastaların yaklaşık % 10'unda paraneoplastik sendrom vardır ve bu oran KHDAK'li hastalarda daha yüksektir. Paraneoplastik sendromlar için en iyi tedavi altta yatan kanser tedavisidir (Latimer ve ark., 2015). Hastalar nadiren tek bir semptomla ortaya çıkar ve pozitif öngörü değeri iki veya daha fazla semptom bildirildiğinde daha yüksektir. Örneğin, kilo kaybı ve hemoptizi kombinasyonu, % 9,2'lik pozitif prediktif değere sahiptir (Koo ve ark., 2018).

Akciğer kanseri, risk faktörleri ve semptomları olan 40 yaşın üzerindeki herhangi bir hastada yüksek derecede şüphelenilmelidir. Akciğer kanseri şüphesi olan bir hastanın ilk değerlendirmesi tarih ve fizik muayene ile başlar; tam kan sayımı; alkalın fosfataz, hepatik transaminaz ve kalsiyum seviyelerinin ölçümü; kimyalar (elektrolitler, kan üre azotu, kreatinin); ve göğüs radyografisiyle devam eder. Akciğer grafisinde normal bulgular akciğer kanserini dışlamaz, çünkü mediastende veya göğsün başka bir yerinde küçük bir tümör gizlenebilir. Bu yüzden akciğer grafisinde olası bir alternatif tanı belirlenemediğinden kontrastlı bilgisayarlı tomografi (BT) ve ardından gerekirse pozitron emisyon tomografisi (PET) yapılmalıdır (Postmus ve ark., 2017).

Tıbbi olarak cerrahi rezeksiyona uygun evre I veya II KHDAK olan hastalarda, tercihen video yardımcı torasik cerrahi gibi minimal invazif bir yaklaşım gösterilmelidir. Evre III KHDAK'nin tedavinin amacı, genellikle tümör histolojisine ve hastanın fonksiyonel durumuna dayanan kemoterapi ve radyasyonla azaltılmaya çalışmaktır. Evre IV tümörlerde, multidisipliner yönetim seçenekleri de büyük ölçüde histoloji ve hasta durumu ile belirlenir (Latimer veMott, 2015).

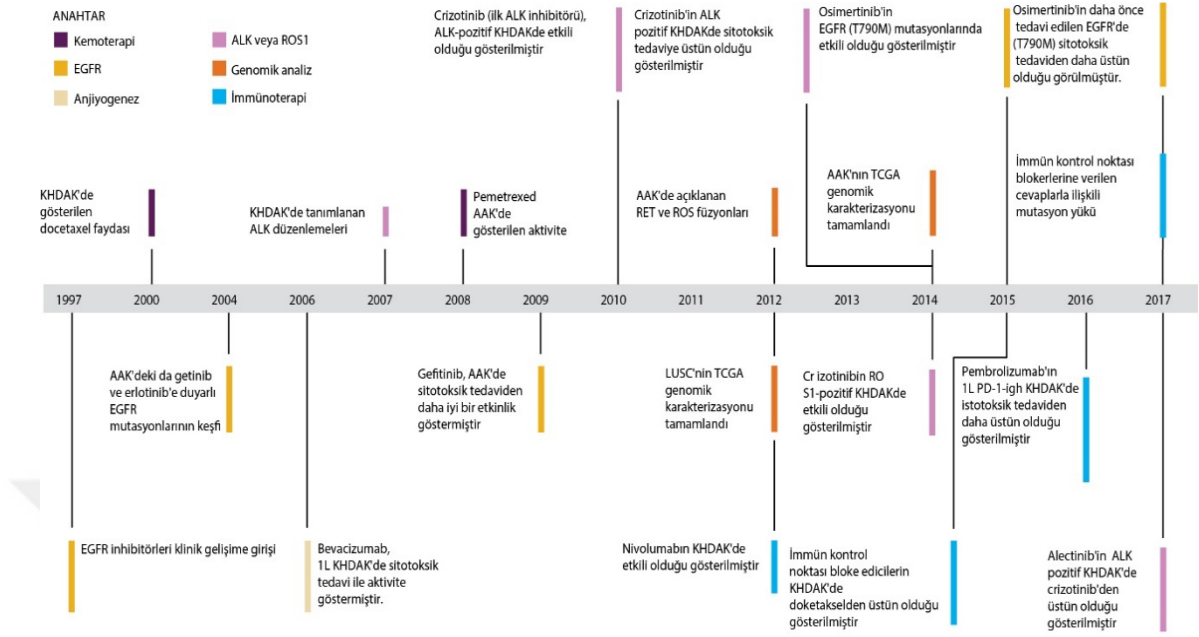
KHAK'ye transformasyon, hem adenokarsinoman hem de KHDAK'nin ortak bir hücre tipinden kaynaklandığını gösterir. Akciğer kanseri için tedavi stratejileri, bireysel bir

hastanın kanserinin yalnızca bir alt tip olduğu varsayımına dayanır. Örneğin, sınırlı aşamalı KHAK ve lokalize KHDAK'nin her ikisi de potansiyel olarak tedavi edilebilir hastalıklardır, ancak tedavi stratejileri büyük ölçüde farklılık gösterir. Şimdi eşzamanlı kemoterapi ve radyoterapi ile tedavi edilen sınırlı evreli KHAK hastalarında cerrahi tedavi yöntemi olarak bırakılmıştır. Buna karşılık, lokalize evre I veya II KHDAK olan hastalar, temel olarak cerrahi işleminden sonra muhtemelen adjuvan kemoterapi ile tedavi edilir, ancak radyoterapi tipik olarak stratejinin bir parçası değildir. İleri evre akciğer kanserinde, kemoterapi, hem KHDAK hem de KHAK için tedavinin temelidir, ancak kullanılan ilaçlar her alt tip için farklıdır. Kemoterapiye ilk müdahale, geniş evre KHAK'li hastalar için metastatik adeno karsinomlu hastalardan çok daha fazladır ve bu, tümör biyolojisinde içsel farklılıklar olduğunu gösterir (Oser ve ark., 2015).

1.6. Akciğer Kanseri Tedavisinde Moleküler Temelli Yaklaşımlar

Hedefe yönelik tedaviler, akciğer kanserlerinin yönetimini büyük ölçüde değiştirmektedir. Bu tedaviler, sürücü mutasyonlarını hedef alan ilaçları, kanser hücresi çoğalmasında ve hayatta kalmasında varsayılan önemli molekülleri hedef alan ilaçları ve immün kontrol noktası moleküllerini önleyen ilaçları içerir. Yeni hedeflerin keşifleri, yeni ilaç geliştirme ve yeni kombinasyon tedavilerinin kullanımıyla günden güne ilerlemektedir. Araştırmacılar ve klinisyenler, öngörücü biyobelirteçleri ve bu hedefli tedavilere içsel veya edinilmiş dirençlerin altındaki moleküler mekanizmaları da kapsamlı bir şekilde araştırmaktadır (Şekil 1.3). Özellikle KHDAK olan hastalar için hedef tedavilerin geliştirilmesinde birçok çalışmalar yapılmaktadır (Hirsch ve ark., 2016).

KHDAK için ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından erlotinib ve afatinib gibi epidermal büyüme faktörü resptörü (EGFR)'ye yönelik hedefli tedavilerin uygulamaya konması, EGFR aktive edici mutasyonlara sahip bir adenokarsinoma alt grubunun tedavisinde devrim yarattı, ancak yaklaşık 12 ay sonra edinilen direnç ortaya çıktı. EGFR mutant kanserli hastalardan alınan biyopsi örneklerinden, adenokarsinomadan KHAK'ye histolojik dönüşümün nadir fakat tutarlı bir şekilde gözlemlenmesi de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmaların edinilmiş direnci sağladığını göstermiştir (Oser ve ark., 2015).



Şekil 1.3. KHDAC'ye yönelik bazı önemli keşifler ve klinik çalışmalar (Herbst ve ark., 2018) uyarlanarak alınmıştır.

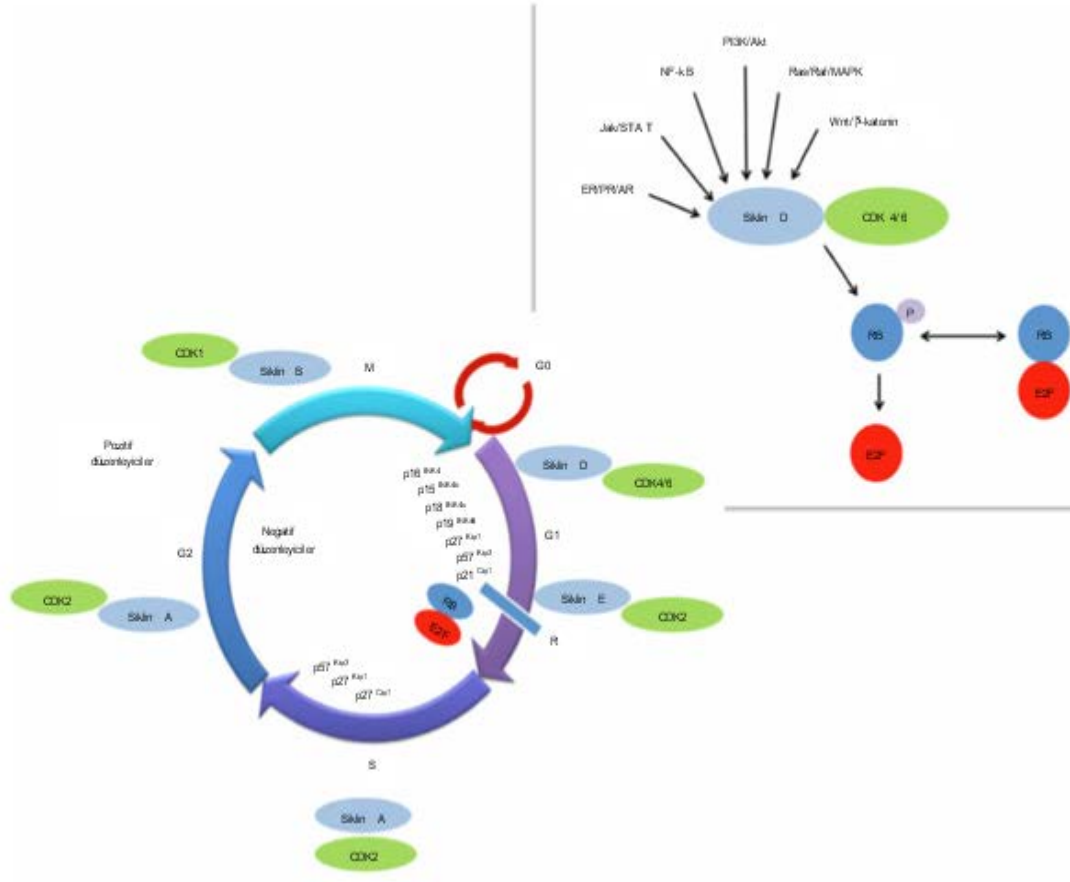
1.7. Kanser Tedavisi İçin CDK4 İnhibitörleri

Hücre döngüsü, hücre bölünmesi ve replikasyonu için gerekli olan büyüme, kromozomal replikasyon ve mitozun çeşitli aşamalarını tarif eder. Karmaşık bir etkileşime giren proteinler kümesi, memeli hücrelerinde hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi sıkı bir şekilde düzenler. Bu düzenlemedeki kilit bileşenler, bir grup sikline bağımlı kinazlardır (CDK). Bu CDK'ler, hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenlemek için siklin adı verilen proteinlerle işbirliği yapar.

Sınırsız büyüme kanserin ayırt edici özelliği olduğundan, malign hücrelerde hücre döngüsü düzenlemesinin bozulması yaygındır ve hücre döngüsünü düzenleyen yolları hedeflemek onkolojide uzun yıllardır önemli bir ilgi alanı olmasına rağmen, selektif ve güçlü gelişme spesifik CDK'lerin inhibitörleri, artan bir ilgiye neden olmuştur.

Hücrelerin bölünmesi ve çoğalması G1, S fazı (DNA sentezi), G2 ve M fazı (mitoz) olmak üzere dört aşamada ilerler: G1-S geçişinin ana düzenleyicisi CDK4'tür. Siklin D1

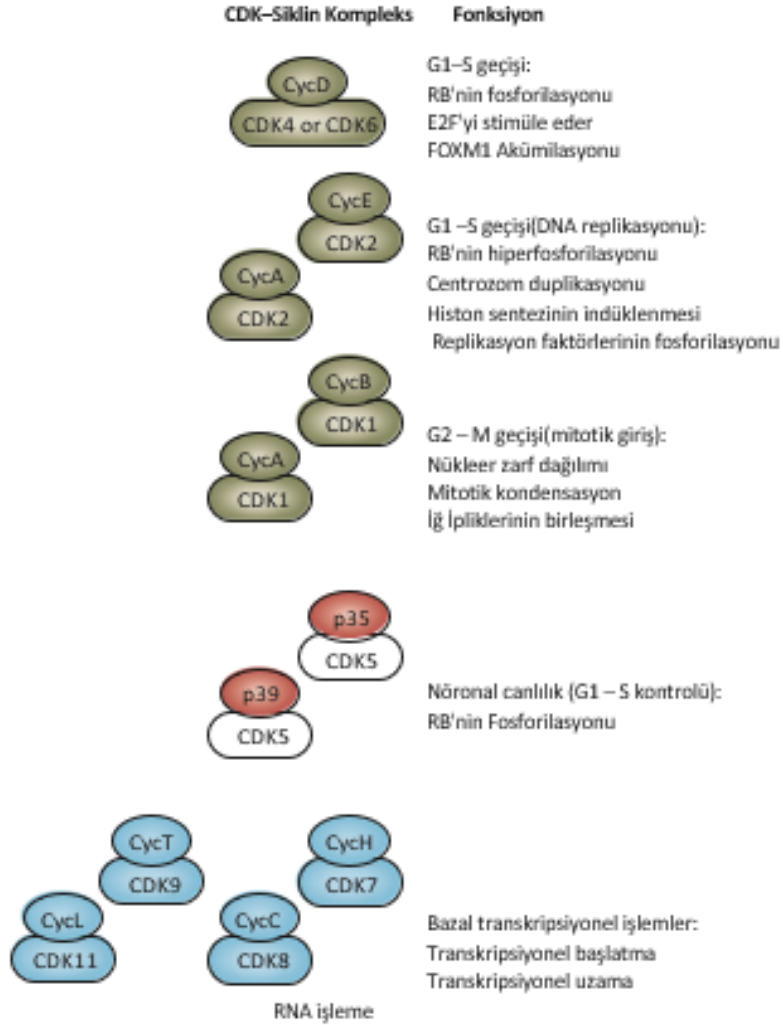
(CCND1), CDK4 ile bir kompleks oluşturur ve retinoblastoma (RB) proteinini fosforile eder, böylece etkisiz hale getirir (Şekil 1.4). Bu, hücreyi hücre döngüsü boyunca ilerlemesine bağlayan transkripsiyon faktörü E2F'nin RB aracılı inhibisyonunu hafifletir. RB'nin düzenlenmesinin CDK4/siklin D1 kompleksinin birincil etkisi olduğu düşünülmekle birlikte, son çalışmalar FOXM1 transkripsiyon faktörünü başka bir potansiyel fosforilasyon hedefi olarak tanımlamıştır. Ancak bu gözlem konusunda çeşitli itirazlar mevcuttur.



Şekil 1.4. Hücre döngüsü ve hücre döngüsünün düzenlenme süreci. (Cadoo ve ark., 2014) uyarlanarak alınmıştır.

Diğer CDK ve siklin kompleksleri hücre döngüsünün sonraki aşamalarını düzenler. G1'in sonlarında, CDK2-siklin E ayrıca RB'yi fosforile eder, hücrenin S fazına (kontrol

noktası adı verilen) ilerlemesini geri döndürülemez şekilde taahhüt eder. Daha sonra S fazında ve G2'de CDK1 ve CDK2, ortakları siklin A ve B'de önemli roller oynar.



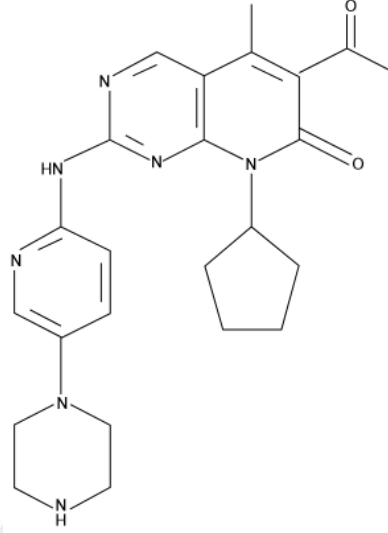
Şekil 1.5. CDK komplekslerinin biyolojik fonksiyonlarının özeti (Asghar ve ark., 2015) uyarlanarak alınmıştır.

CDK4-siklin D regülasyonu, büyük oranda insan kanserinde bozulmuştur. Bu, çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkabilir: (i) Siklin D1'in amplifikasyonu veya aşırı ifadesi. Siklin D1 nin aşırı ekspresyonu ayrıca çeşitli katı tümörlerde de gözlenir. (ii) CDK4'ün amplifikasyonu. Bu, CDK4 amplifikasyonunun neredeyse evrensel olduğu bir hastalık olan iyi ayrışmış ve ayrışmış liposarkomda en yüksek prevalansla görülür. Diğer katı tümörlerde ve hematolojik malignitelerde düşük frekansta CDK4 amplifikasyonu da

gözlenmiştir. (iii) CDK4'ün aktiveştirilmesi mutasyonu. Bunlar çok nadirdir ve ailevi melanom vakalarında tanımlanmıştır. (iv) CDK4 inhibitörü p16'nın kaybı (CDKN2A) Bu birçok kanserde sık görülen bir olaydır (Dickson, 2014). Hücre döngüsünde veya çeşitli biyolojik işlemlerde yer alan farklı siklin-kinaz (CDK) –Siklin kompleksleri sınıfları gösterilmiştir. Yeşil renkte gösterilen CDK-Siklin kompleksleri, hücre döngüsü ilerlemesini teşvik ederken, mavi renkte gösterilenler genellikle transkripsiyonel işlemlerde rol alır. Kırmızı ile gösterilen CDK5 kompleksleri, hem nöronal canlılığın kontrolünde hem de hücre döngüsünün geliştirilmesinde rol oynar (Şekil 1.5).

1.8. Bir Cdk İnhibitörü Olan Palbociclib'in Kanser Üzerine Etkisi

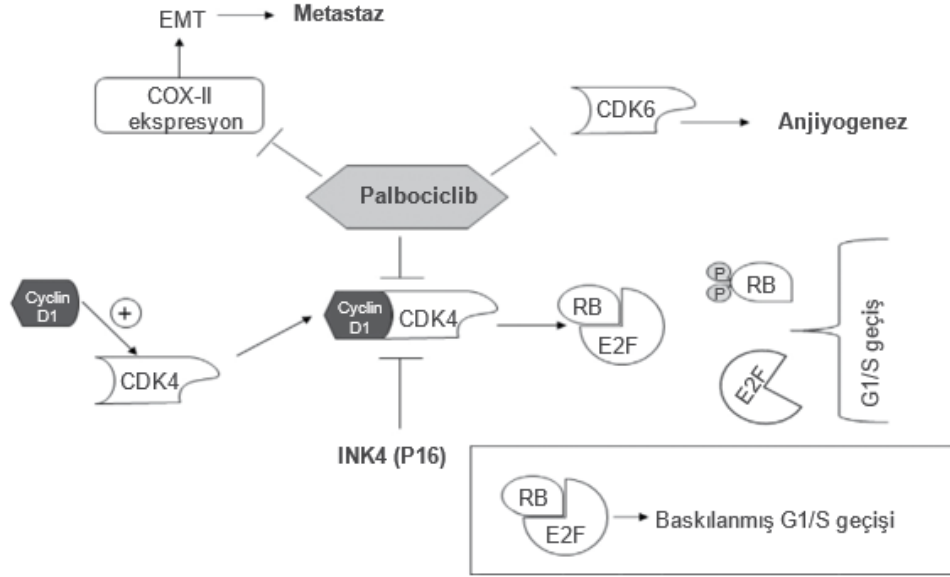
Palbociclib veya PD-0332991 (Pfizer, Inc., New York, NY, ABD), oral olarak temin edilebilen bir CDK4/6 inhibitörüdür. PD-0332991, uygun fiziksel ve farmasötik özelliklerinden dolayı bir grup piridopirimidin bileşiğinden geliştirilmiştir (Şekil 1.6). PD-0332991, hem CDK4 hem de CDK6-siklin D1 kinaz aktivitesini güçlü ve eşit şekilde inhibe eder. Buna ek olarak, CDK4/6 için oldukça seçicidir, PD-0332991 birçok diğer protein kinaz paneline karşı az aktiviteye sahiptir, hücre büyümesini inhibe eder ve meme kanseri de dahil olmak üzere bir dizi RB yetkin insan kanseri hücreesindeki düşük nanomolar konsantrasyonlarda DNA replikasyonunu baskılar. Beklendiği gibi, RB eksikliği olan hücrelerde aktivite görülmez. Bir CDK4/6 inhibitörünün hücre döngüsü ilerlemesi üzerindeki beklenen etkisi ile tutarlı olarak, bu hücreler G1'deki hücre oranında önemli bir artış göstermektedir. *In vivo* olarak, meme kanseri ksenograflarında tümör büyümesinin tamamen baskılanması ile belirgin antitümör aktivitesi gösterilmiştir. Ek olarak, tümör RB fosforilasyonunun sürekli inhibisyonu mümkündür. CDK 4/6-siklin D'yi hedeflemede PD-0332991'in özgüllüğü önemlidir, göreceli olarak aktif olmayan, döngüsel olmayan bir durumda olan normal dokuyu korurken onkogenik olayların inhibe edilmesine izin vermek önemlidir.



Şekil 1.6 Palbociclib (PD-0332991) (Cadoo ve ark., 2014)

Palbociclib, RB protein ifadesi görülen tümörlerde RB fosforilasyonunu nihai olarak engelleyerek G1-S geçişine izin vermeyen güçlü prelinik verilere sahip spesifik sikline bağımlı kinaz (CDK) 4/6 inhibitörüdür. Faz 1 denemeleri güvenlik göstermiştir. Palbosiklib'in endokrin tedaviye eklenmesi, endokrin terapide saf ve endokrin terapiye dirençli metastatik ortamlarda progresyonsuz sağkalımı arttırmaktadır (Clark ve ark., 2016). Meme kanserinin kendine özgü alt tiplerinin farklı itici güçleri ve RB yolu değişikliklerinde bunlara karşılık gelen farklılıkları, CDK 4/6 inhibisyonuna karşı duyarlılığın moleküler fenotipe dayanması şaşırtıcı değildir. Oral Palbociclib monoterapisinin etkinliği, liposarkom, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, mantle hücreli lenfoma, ürotelyal karsinoma, KHDAK ve çok sayıda primer çocukluk çağı beyin tümörü olan hastalarda incelenmiştir. Tamoksifen ve aromataz inhibitörleri gibi meme kanserinde çeşitli hormon antagonistleri ile birlikte yapılan bir kaç kombine tedavi klinik çalışmaları da vardır. Diğer kombinasyon çalışmaları, Palbociclib ile birlikte baş ve boyun kanserlerinin tedavisi için cetuximab (EGFR /HER1/ERBB1'e yönelik monoklonal bir antikor), ER pozitif meme kanserinin tedavisi için AZD2014 (mTOR inhibitörü), KHDAK ve diğer katı malignitelerin tedavisi için PD-0325901 (bir MEK antagonisti) ile birlikte yapılan denemelerdir. (Roskoski Jr, 2016).

Finn ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda PD-0332991'in etkinliğini meme kanserinin moleküler alt tiplerini temsil eden bir dizi hücre hattında araştırmış ve alt tip ile ilaca duyarlılık arasında anlamlı bir ilişki bulmuşlardır, luminal özelliklere sahip ER-pozitif hücre hatlarının en duyarlı olduğunu buldular ve ek olarak, PD-0332991'e cevap veren HER2 ile güçlendirilmiş hücre hatları öncelikle lümen özelliklerine sahiptir. Buna karşılık, bazal hücre hatları dirençlidir. PD-0332991, RB'yi etkili bir şekilde fosforile eder ve tamoksifene dirençli meme kanseri modellerinde hücre döngüsünü inhibe eder (Finn ve ark., 2009). Hormon tedavisine dirençli olan meme kanseri modellerinde, PD-0332991, proliferasyonu etkili bir şekilde durdurabilir ve hücre yaşlanmaya neden olabilir, bu da ER antagonistlerinin etkisinden ayrı stabil bir hücre döngüsü durmasıyla sonuçlanabilir (Şekil 1.7). Endokrin tedavisine karşı direnç kazanmış tümörler için, CDK 4/6 inhibisyonu önemli ve uygulanabilir bir terapötik stratejiyi temsil eder (Cadoo ve ark., 2014)



Şekil 1.7. Palbociclib'in etki mekanizması. Siklin D1, CDK4'ü ve daha sonra ortaya çıkan kompleks fosforilatları retinoblastoma proteinini aktive eder. RB fosforile edildikten sonra (P) E2F transkripsiyon faktörleri ailesi serbest kalır. Böylece G1-S geçişi sağlanmış olur. Palbociclib, RB fosforilasyonunu nihai olarak engelleyerek G1-S geçişini engeller. Palbociclib'in bir başka önerilen etkisi de EMT sürecine katkıda bulunan COX-II enziminin ekspresyonunu inhibe ederek metastazı azaltmasıdır. EMT, hücrelere invazif ve metastatik özellikler verir. Ayrıca, anjiyogenezde rolü olduğu bildirilen CDK6'nın bloke edilmesiyle Palbociclib'in anjiyogenez etkisine sahip olduğu önerilmektedir (Ehab ve ark., 2016) uyarlanarak alınmıştır.

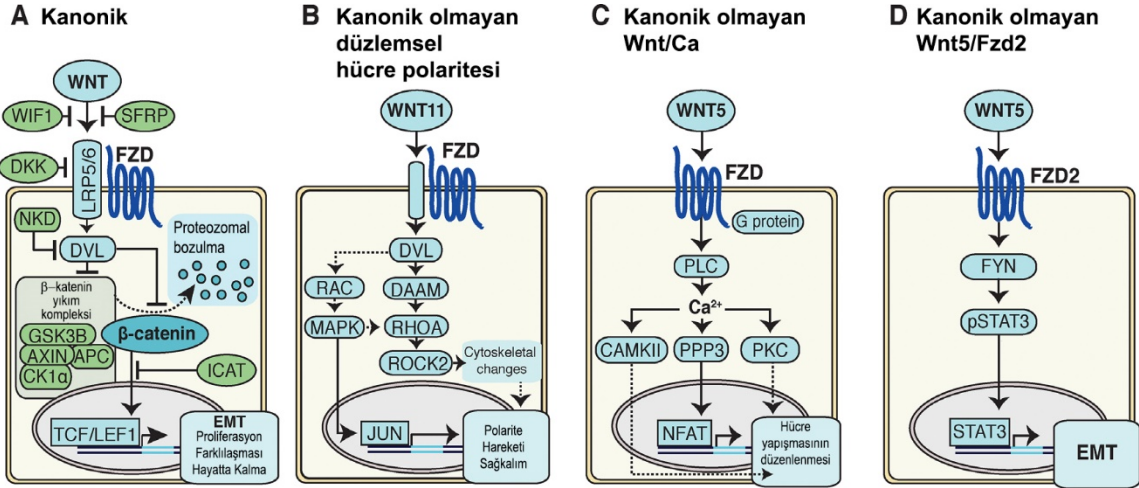
1.9. Wnt Sinyal Yolağı ve Akciğer Kanseri

Wnt günümüzden yaklaşık 40 yıl önce ilk kez *Drosophila melanogaster*'da çeşitli gelişimsel süreçler üzerine etkileri keşfedildi. Daha sonra yapılan genetik çalışmalarda, Wnt sinyal proteinlerinin ailesinin birçok bileşenini olduğu ve embriyonik gelişim sırasında kilit kararlarda rol oynadığı tanımlandı. Evrim yoluyla oldukça korunmuş bir yol olan Wnt/ β -katenin yolağı, çoğalma, farklılaşma, göç, genetik stabilite, apoptoz ve kök hücre yenilenmesi dahil olmak üzere temel hücresel fonksiyonları düzenler (Pai ve ark., 2017). Wnt yolu; kanonik β -katenin bağımlı, kanonik olmayan düzlemsel hücre polaritesi (PCP), kanonik olmayan Wnt/ Ca^{+2} ve kanonik olmayan Wnt5/Fzd2 yolu olmak üzere dörde ayrılır (Şekil 1.8). Kanonik β -katenin bağımlı sinyal yolağında, Wnt sinyalinin yokluğunda, β -katenin yıkım kompleksi proteazomal bozulma için β -katenin'i etiketler. Wnt sinyalinin varlığında, yıkım kompleksi inhibe edilir, hedef genlerin transkripsiyonunu aktive ederek, β -katenin stabilizasyonu ve nükleer translokasyonu ile sonuçlanır. Kanonik olmayan düzlemsel hücre polaritesi (PCP) yolu, hücre iskeleti değişiklikleri, hücre polaritesi, hareketi ve sağkalımındaki değişikliklerle sonuçlanan sinyal kaskadlarını aktive eder. Kanonik olmayan Wnt/Kalsiyum yolu sinyali, hücre içi kalsiyumu aktive eder, bu da daha sonra sinyalleşme yoluyla hücre yapışmasını azaltır. Kanonik olmayan Wnt5/Fzd2 yolu, Wnt5, FZD2 reseptörü ve FYN üzerinden sinyal verir, kanser hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişe (EMT) yol açan STAT3 transkripsiyonunu aktive eder (Sandsmark ve ark., 2017).

β -katenin, Wnt/ β -katenin kaskadının aktivasyonu için gerekli olan kaderin protein kompleksinin çekirdek bir bileşenidir. Bu yoldaki çoklu sapmalar çok sayıda kanserde meydana geldiğinden, Wnt'ye yönelik tedavi, önemli bir terapötik hedef haline gelmiştir. Wnt/ β -katenin yolunun, immün hücre infiltrasyonunun tümör mikroorganizmalarının düzenlenmesindeki açıklanan rolü, immünoterapi tedavilerine potansiyel etkisi göz önüne alındığında, ilgiyi arttırmıştır (Pai ve ark., 2017). Wnt yolunun kanserle olan bağlantısı, farelerde Wnt1 lokusuna proviral olarak sokulması veya farelerde transgenik aşırı ekspresyon ile sonuçlanan int1'in (Wnt1) aktivasyonunun, meme hiperplazisi ve tümörleri ile sonuçlandığı keşfi ile ortaya çıkmıştır (Zhan ve ark., 2017).

1991 yılında, adenomatoz polipozis coli (APC) geninin mutasyonlarının, ailesel adenomatoz polipozu olarak adlandırılan kalıtsal kolon kanseri sendromunun altında yatan neden olarak keşfedildi. APC geninin β -katenin ile etkileşime girdiği ve APC'nin işlev kaybının aşırı aktif T-hücre faktörü (TCF)4/ β -katenin sinyalleşmesine neden olduğu bulundu. Bu bulgular Wnt sinyalleri ile insan kolorektal kanseri arasında doğrudan bir bağlantı kurdu. Yapılan çalışmalarda Fare modellerinde, tümör başlatma potansiyelinin artması ve Wnt yolunun KHDAK gelişiminde önemli olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Solunum epitel kültürlerinde, sigara dumanı bileşenleri Wnt ve Hedgehog sinyallerini arttırmıştır. Wnt yolağı genleri, Kras transgenik farelerin akciğerlerinde de ayrıca düzenlenir ve Kras mutant farelerinde Wnt yolağı aktivasyonu, tümörü belirgin şekilde artırır. Wnt ile indüklenebilir farelerde, Wnt indüksiyonu durdurulduğunda tümörler gerilerken, tümörler p53 eksikliği olan farelerde Wnt'den bağımsız oluşmuştur (Stewart, 2014).

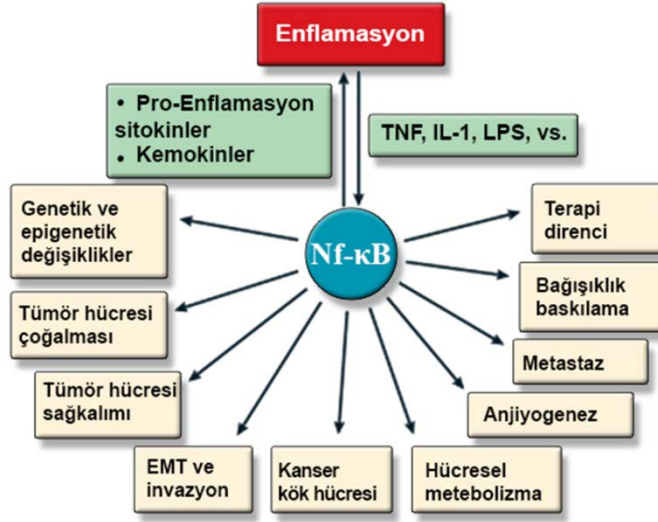
KHDAK'de birkaç Wnt yolu bileşeni aşırı eksprese edilebilir. KHDAK hücre hatlarının büyük bir kısmı aktif Wnt sinyaline veya Wnt-1'in aşırı ifadesine sahiptir. Wnt sinyali, akciğer kanseri hücrelerinde, sülfatazlar Sulf-1 ve Sulf-2 (yüksek oranda KHDAK'ler ile ifade edilir), miR21 ve periostin ile teşvik edilebilir. KHDAK'lerin % (37-63)'ü Wnt-1 için immünohistokimya ile pozitif boyanmış ve Wnt-1 pozitifliği düşük apoptotik indeks, aberant β -katenin ifadesi ve c-Myc, siklin D1, VEGF-A, MMP-7, Ki-67, survivin ve intratumoral mikrodamar yoğunluğunun ifadesinin artışı gözlenmiştir. Wnt-yolu aktivasyonu ve Wnt-1'in aşırı ekspresyonu ayrıca klinik olarak kötü prognoz ile ilişkilidir. Wnt sinyalinin anti-Wnt1 monoklonal antikoru veya küçük engelleyici RNA (siRNA) veya Wnt-1 eksprese eden kanser hücrelerinde apoptozu indükleyen, KHDAK hücre hattının çoğalmasını ve ksenograft büyümesini, düşük hücre motilitesini ve istilasını inhibe ederek Wnt sinyalinin down regülasyonu etkileyerek daha farklı bir fenotip oluşturmuştur (Stewart, 2014).



Şekil 1.8. Kanser hücrelerinde Wnt sinyallerinin şematik gösterimi. A. Kanonik Wnt yolu B. Kanonik olmayan düzlemsel hücre polaritesi (PCP) yolu C. Kanonik olmayan Wnt/Ca²⁺ yolu D. Kanonik olmayan Wnt5/Fzd2 yolu. (Sandsmark ve ark., 2017) uyarlanarak alınmıştır.

1.10. NF-κB Sinyal Yolağı

1986 yılında David Baltimore'nun grubu tarafından keşfedilen B hücresine özgü transkripsiyon faktörü olarak NF-κB ailesi, çeşitli homodimerler ve heterodimerler oluşturan beş farklı DNA-bağlayıcı proteinden oluşur. NF-κB proteinleri, hücre proliferasyonunu hızlandırabilen, apoptozu inhibe edebilen, hücre göçünü ve istilasını teşvik edebilen ve anjiyogenez ve metastazı uyarabilen doğuştan ve adaptif immün yanıtların ana düzenleyicileridir (Şekil 1.9). NF-κB'nin aktivasyonu, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, nekrotik hücre ürünleri, DNA hasarı, oksidatif stres ve proinflamatuvar sitokinler tarafından hızlı ve geçici olarak indüklenir. Özellikle, hem kanser hücrelerinde hem de tümör mikroçevresinde birçok kanser türünde, NF-κB yapısal olarak aktiftir (Taniguchi ve ark., 2018).



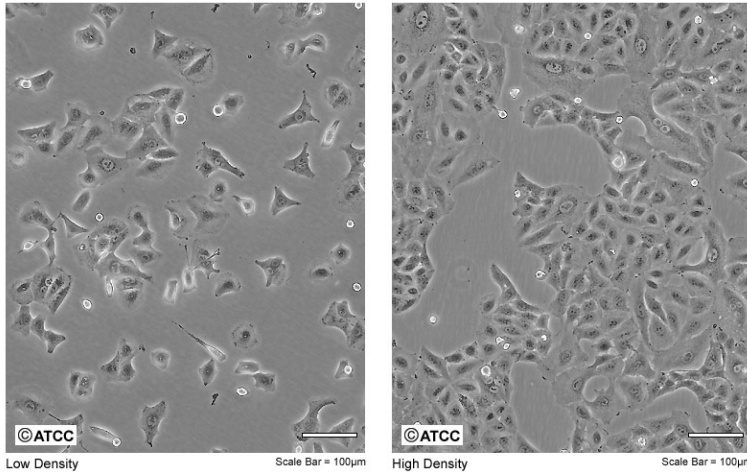
Şekil 1.9. Kanserde NF-κB'in rolleri (NF-κB) doğrudan ve dolaylı olarak enflamasyonu, kanser hücreleri proliferasyonunu ve sağkalımını, epitelyal mezenşimal geçişi (EMT), invazif davranışı, anjiyogenez ve metastazı, genetik ve epigenetik değişiklikleri, kanser kök hücre oluşumunu kontrol eder. Hücreler metabolizma ve terapi direnci. NF-κB aktivasyonu, çeşitli mekanizmalar yoluyla immüno-supresyona neden olur. (LPS, lipopolisakarit; TNF, tümör nekroz faktörü) (Taniguchi ve Karin, 2018)'den değiştirilerek alınmıştır.

NF-κB transkripsiyon faktörü ailesi, aktif olmayan koşullar altında sitoplazmada sıkışık kalmış beş üyeden oluşur: NF-κB1 (p50 / p105), NF-κB2 (p52 / p100), RelA (p65), RelB ve c-Rel. Hepsinde, dimerizasyon, nükleer lokalizasyon ve DNA bağlama alanlarını içeren yapısal olarak korunmuş bir amino-terminal Rel-homoloji alanı (RHD) vardır. RelA, RelB ve c-Rel (ancak p50 veya p52 değil) ayrıca gen transkripsiyonunu destekleyen bir işlem alanı vardır. Aktivasyon üzerine, NF-κB alt birimleri bir homo veya heterodimer oluşturur. NF-κB sinyalleri, NF-κB temel modülatörüne (NEMO) bağımlı, kanonik yola ve NEMO'dan bağımsız, kanonik olmayan yola ayrılmıştır. Sitokinler, büyüme faktörleri, mikrobiyal ürünler, radyasyon ve oksidatif stres gibi strese neden olan uyaranlar ve T hücreleri reseptörünün (TCR) birleşmesi dahil olmak üzere çeşitli sinyaller kanonik NF-κB sinyalini uyarır. Bu uyarıcılar, tümör nekroz faktörü reseptörü üst ailesi (TNFRSF) ve interlökin-1 reseptörü (IL 1R) / Toll benzeri reseptör (TLR) üst familyasının yanı sıra TCR'nin veya hücre içi ortamlarının aktivasyonu ile sonuçlanan, membran bağlı reseptörleri aktive eder. (NEMO (IKK γ) ve iki IKK alt ünitesinden (IKK α ve IKK β) oluşan kappa B (I κ B) kinaz (IKK) kompleksinin inhibitörü) IKK kompleksi daha sonra I κ B proteinlerini fosforile eder, bu da onların

ubiquitinasyonuna ve proteazomal bozulmasına neden olur. Sonuç olarak, NF- κ B dimerleri artık hedef genlerin ekspresyonunu düzenledikleri çekirdeğe yer değiştirir (Ma ve ark., 2016).

1.11. A549 Epitel Akciğer Karsinoma Hücreleri

A549 hücre hattı, 1973 yılında sürekli hücre hatları oluşturmak için yapılan çalışmada 200 farklı tümörden, bir akciğer adenokarsinomadan izole edilmiştir (şekil 1.10). Kanser araştırması için bir araç olarak geliştirilmesine rağmen, hücre hatları sonuç olarak insan akciğerinin Alveolar Tip II pnömositlerini temsil ediyor olması ile karakterize edildi ve bu nedenle hücre hattı yaklaşık kırk yıldır solunum araştırmalarının temeli oluşturmuştur. Erken pasaj A549 ile yapılan çalışma, hücre hattının izolasyonundan kısa süre sonra, bir Alveolar Tip II epitel hücre fenotipinin özelliklerini sergileme yeteneğinin kanıtı sunmuştur. A549 hücrelerinin kullanım alanlarının içinde Kanser araştırması, hava yolu fonksiyonu, hastalık ve viroloji çalışmaları için distal akciğerin epitelyal modellerinin üretilmesi vardır.



Şekil 1.10. A549 hücreleri (<https://www.atcc.org/~ps/CCL-185.ashx>)

Amaç: A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde bir CDK 4/6 inhibitörü olan ve metastatik meme kanseri tedavisinde endikasyonu olan Palbociclib'in hücre sağkalımı, ölümü üzerine etkisinin modellenmesi ve enflamasyon ilişkili sinyal yollarının irdelenmesidir.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1. Materyaller

2.1.1. Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ek A bölümünde yer almaktadır.

2.1.2. Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan malzemeler Ek B bölümünde yer almaktadır.

2.1.3. Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar Ek C bölümünde yer almaktadır.

2.1.4. Çözeltiler

Kullanılan çözeltiler ve içerikleri Ek D bölümünde yer almaktadır.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Hücre Kültürü

A549 hücreleri American Type Culture Collection (ATCC® CCL-185™) katalog numarasıyla alınmıştır. Hücreler % 10 fetal sıgır serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde, %5 CO₂ ve 37 °C'lik nemli etüvde büyütülmüştür. Hücreler yoğunlaştığında eski besiyeri atılarak 1X fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra % 0,25'lik tripsin-EDTA eklenerek hücreler 37 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Eşit miktarda besiyeri kullanılarak enzim inaktivasyonu sağlandıktan sonra hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 1 ml besiyerinde çözüldükten sonra hücre sayımı gerçekleştirilmiş ve ana stok hücreleri ile yapılacak deneyler doğrultusunda gerekli olan hücrelerin uygun petrilere ekimi gerçekleştirilmiştir.

2.2.2. Hücrelerin Dondurulması

Petri yüzeyine tutunmuş halde bulunan hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek kaldırılmıştır. Kullanılan tripsin-EDTA ile eşit miktarda besiyeri kullanılarak enzim aktivitesi inhibe edilmiş ve 15 ml'lik tüp içerisinde toplanan hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifuj edilmiştir. Pellet 1 ml PBS içerisinde çözülerek hücre sayımı yapılmıştır. Yaklaşık 1×10^6 hücre üzerine 1 ml dondurma medyası eklenerek hücreler kriyo tüplerine aktarılmış sıvı azot tankında saklanmıştır.

2.2.3. Hücrelerin Çözülmesi

Hücreler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra hızlı bir şekilde çözülerek dondurma medyası üzerine besiyeri eklenmiştir. Hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifuj edilmiş ve medya atılmıştır. Hücreler 1 ml besiyerinde çözülerek 25 veya 75 cm²'lik petrilere ekilmiştir.

2.2.4. Hücre Sağkalım Analizi

A549 hücreleri 100×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece inkübasyon sonrasında hücrelere canlılığı analizi ile belirlenen dozlarda sırasıyla 1, 2,5 ve 5µM Palbociclib uygulanmıştır. 24, 48, 72 ve 96 saatlik ilaç uygulamaları tamamlandıktan hücreler % 0,25'lik tripsin-EDTA ile kaldırılarak tüplere toplanmış 2000 rpm'de beş dakika santrifuj edilmiştir.-Her hücre pelleti 500 µl PBS ile çözülerek 50 µl Tripan mavisi eklendikten sonra canlı ve ölü hücrelerin sayımları yapılmıştır.

2.2.5. Yara İyileşmesi Deneyi

6 kuyucuklu petriye her bir kuyuda 100.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 ve 48 saatlik zamanda kontrol, 1, 2,5 ve 5 µM Palbociclib uygulaması yapılmıştır. Hücreler DiOC6 mitokondri membran potansiyeli açısından fluoesan mikroskopunda incelenmiştir.

2.2.6. Koloni Formasyon Deneyi

6 kuyucuklu petriye kuyu başına 2500 tane A549 hücresi ekilip 24 saat için kontrol, 1, 2,5 ve 5 µM Palbociclib uygulaması yapılmıştır. 24 saatin sonunda ilaçlı medya çekilip taze medya konulmuştur. Her 2-3 günde bir medyası değiştirilerek yaklaşık 10 gün sonra kuyulardan medya tamamen çekilip atıldı. Daha sonra 1X PBS ile yıkanmıştır. Her bir

kuyuya 1 ml 3:1 oranında metanol/asetik asit eklenerek 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra metanol/asetik asit çekilip atıldı. 1ml kristal viyole eklenip 20 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra boya atılmış ve distile su ile yıkama yapıldıktan sonra chemidoc ile çekim yapılmıştır.

2.2.7. Floresan Mikroskopi

A549 hücreleri 100.000/kuyu olacak şekilde 12'lik hücre petrilere ekimleri gerçekleştirildikten bir gün sonra farklı kondüsyonlara (kontrol grubu ve 1 µM Palbociclib'e maruz bırakılmıştır. Bu uygulamadan 24 saat sonrasında farklı floresan boyaları uygulanmıştır.

2.2.8. Propidyum İyodür (PI) Boyama ile Ölü Hücrelerin Gösterilmesi

PI, DNA'ya bağlanan ancak canlı hücre membranlarından nüfuz edemeyen bir boyadır. Floresan mikroskobunda yeşil renkli dalga boyuna ait ışığı absorbe ettiğinde kırmızı renkte ışık yayımlanmaktadır. Bu nedenle 1 ml RPMI besiyerine ana stok konsantrasyonu 1 mg/ml olan PI (485/535 nm) boyasından eklendikten sonra 12'lik hücre petrisi 30 dakika etüvde karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından her bir kondüsyona ait hücre grupları floresan mikroskobunda görüntülenmiştir.

2.2.9. 2,4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile Apoptotik Hücrelerin Gösterilmesi

DAPI boyası oluşan DNA kırıklarına bağlanarak apoptotik hücrelerin floresan mikroskobu altında analizini sağlamaktadır. DAPI boyası floresan mikroskobu altında açık mavi renk dalga boyuna karşılık gelen ışığı absorbe ettiğinde mavi renkte ışık yayımlanmaktadır. Bu nedenle besiyerine ana stok konsantrasyonu 5 mg/ml olan DAPI (350/470 nm) boyasından eklendikten sonra 6'lık hücre petrisi 10 dakika etüvde karanlık etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kondüsyona ait hücre grupları floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

2.2.10. DiOC6 ile Mitokondri Membran Potansiyelindeki Değişikliklerin Gösterilmesi

3,3'-Diheksilokarbosiyanin İyodür (DiOC6) lipofilik karakter taşıyan ve düşük konsantrasyonlarında canlı hücre mitokondrilerine seçici olarak bağlanan bir boyadır. Bu özelliği nedeniyle DiOC6 boyası fluoresan mikroskobu altında canlı hücrelerin tayininde kullanılmaktadır. DiOC6 (482/504 nm) boyası fluoresan mikroskobu altında mavi renge ait dalga boyundaki ışığı absorbe ettiğinde yeşil renkte dalga boyuna sahip ışık yayımlamaktadır. Bu nedenle 1 ml RPMI besiyerine ana stok konsantrasyonu 4 mM olan DiOC6 boyasından 1 µl eklendikten sonra 6'lık hücre petrisinin 15 dakika karanlık etüvde inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından her bir kondüsyona ait hücre grupları fluoresan mikroskobu altında incelenmiştir.

2.2.11. Acridine Orange ile Otofagolizozomların Tespiti

Kapalı formülü $C_{17}H_{19}N_3$ olan ve Acridine Orange baz olarak da bilinen bu katyonik boya pH'a bağlı olarak çift iplikli DNA'ya bağlandığında yeşil, tek iplikli DNA veya RNA'ya bağlandığında ise kırmızı fluoresans ışımaya yapmaktadır. Ayrıca yüksek asidik ortamlar olan geç otofajik vakuollerde birikerek kırmızı fluoresans ışımaya yapmaktadır. Belirtilen kondüsyonlara maruz bırakılan 12'lik petri konsantrasyonu 1 µM olacak şekilde Acridine Orange (460/650 nm) ilave edildikten sonra karanlık etüvde inkübe edilmiştir ve ardından fluoresan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

2.2.12. Total Protein İzolasyonu

Toplam protein izolasyonu için bir kontrol ve bir de 1µM Palbociclib uygulaması için A549 hücreleri 60 cm²'lik petrilere ekilmiş; ilaç uygulamasından 24 saat sonra hücreler kazıyıcılar ve 1X PBS yardımıyla petri yüzeyinden kaldırılmıştır. Soğuk santrifüjleme işlemiyle hücre pelleti elde edilip, toplam protein içeriği eldesi için PhosSTOP, Roche® fosfataz inhibitör koktail ve cComplete EDTA-free, Roche® proteaz inhibitör koktail tabletleri çözdürülmüş Complete Lysis-M, Roche® lizis tamponu içerisine alınan hücreler 20 dakika oda ısısında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. 20 dakika 13200 rpm'de +4°C'de santrifüjlenen örneklerin üst sıvısı yeni bir tüpe alınarak -80°C'de saklanmıştır.

2.2.13. Protein Miktarının Bradford Analizi Ile Belirlenmesi

Bradford yönteminde proteinler G250 formundaki Coomassie parlak mavi boyasına bağlanarak kullanım öncesindeki kırmızı halinin yerine boyanın mavi halini stabilize eder. Söz konusu proteine bağlı formundayken boya 595 nm dalgaboyunda en yüksek absorbans değerini verir. Protein miktarları belirlenirken bu absorbans değerleri baz alınarak işlemler gerçekleştirilir. Öncelikle konsantrasyonu bilinen bir protein çözeltisi olarak 1,5 mg/ml sığır serum albumin (BSA) hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltden 1,5-7,5 µg (1-5 µl) aralığında örnekler alınarak 96 kuyucuklu petriye aktarılmıştır. Protein miktarı belirlenecek olan her bir örnekten de birer µl alınarak kuyucuklara aktarıldıktan sonra her kuyucuğa 200 µl Bradford çözeltisi eklenmiştir. Petri beş dakika boyunca karanlık ortamda bekletilerek proteinler ile boyanın bağlanması beklendikten sonra mikropilaya okuyucu kullanılarak 595 nm'deki absorbans verileri elde edilmiştir. Öncelikle farklı miktarlardaki BSA örneklerinden elde edilen absorbans değerleri ve bunların konsantrasyon bilgileri ile bir standart oluşturulmuş ve buradaki denklem kullanılarak absorbans değeri bilinen total protein örneklerinin konsantrasyonları tayin edilmiştir.

2.2.14. İmmunoblotlama

Her bir kondüsyona ait proteinler konsantrasyonları belirlendikten sonra içeriğinde; sodyum dodesil sülfat (SDS) deterjanı, gliserol, 2-merkaptoetanol, bromofenol mavisini ve pH-6,8 tris-hidroklorik asit (HCL) bulunan 4X-laemmlili solüsyonu ile karıştırılmıştır. Ardından 95°C'de 5 dakika denatüre edildikten sonra hedef kDa'ya göre % 12 akrilamid konsantrasyonuna sahip jelle yüklenerek SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile ayrılmışlardır. Jellerdeki kDa'larına göre ayrılan proteinler, hedef kDa'ya göre farklı sürelerde voltaj uygulanarak, farklı kalınlardaki 0,45 mm poliviniliden diflorür (PVDF) membran kullanılarak transfer edilmiştir. Protein transfer edilen PVDF membranlar % 5 yağsız süt kullanılarak bloklanmıştır, ardından sırasıyla birer gece hedef proteine özgün 1:1000 oranında % 5 yağsız süt ile dilüe edilen birincil antikorlar ve *Armoracia rusticana* (bayır turpu) bitkisinden izole edilen peroksidaz (HRP) enzimi konjuge edilmiş olan birincil antikorlara özgün 1:1000 oranında % 5 yağsız süt ile dilüe edilen ikincil antikorlar ile muamele edilmiştir. Ardından birincil ve

ikincincil antikörlerin spesifik olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla tween deterjanı içeren TBS solüsyonu ile muamele edilen PVDF membranlar daha sonra TBS solüsyonu ile muamele edilerek tween deterjanından arındırılmıştır. Hedef proteine özgül antikörler ile muamele edilen PVDF membranlar daha sonra içeriğinde; HRP'nin substratı hidrojen peroksit (H_2O_2) ve kemilüminesans madde lumünol de bulunan bir solüsyonla muamele edilerek BioRad ChemiDoc™ cihazında UV ışığı altında görüntülenmiştir.

2.2.15. İstatistiksel Analizler

Hücre sağkalım analizi ile ilişkili veriler Windows için GraphPad Prism 6 yazılımı (La Jolla California USA, www.graphpad.com) ile grafik halinde düzenlenerek iki yönlü ANOVA testi kullanılmış, anlamlı değişimler için p değeri <0,05 olarak belirlenmiştir.

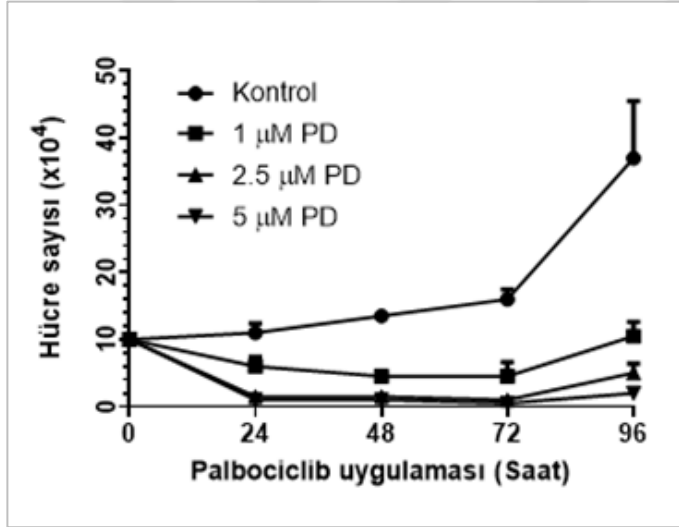
2.2.16. PathScan İnflamasyon Çok Hedefli Sandwich ELISA Kit

PathScan® Enflamasyon çok hedefli sandviç ELISA Kiti, Cell Signalling Technology'den #7276 katalog numarasıyla temin edilmiştir. Stres ve enflamasyonla ilişkili olan NF- κ B p65, fosfo-NF- κ B p65 (Ser536), fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), fosfo-p38 MAPK (Thr183 / Tyr185) protein miktarlarını tayin etmek için bu kit kullanılmıştır. Öncelikle 100'lük iki tane petri kabına her birine yaklaşık 2×10^6 tane olacak şekilde A549 hücreleri ekilmiş sonra kontrol ve $1 \mu M$ 24 saat Palbociclib uygulamasını takiben ELİSA kit protokolüne göre protein izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra bir mikrosantrifüj tüpüne 1:1 oranında protein örneği ve hücre lizis tamponuyla seyreltilir. Bu amaçla bradfordta okutulan protein miktarları her kuyucuk için normalize edilmiş ve 29.1 μl : 29.1 μl oranında kullanılmıştır. Plaka, 2 saat $37^\circ C$ 'de inkübe edilmiştir. Her kuyu 200 μl , 1X Yıkama Tamponu ile 4 kez yıkanmıştır. Her kuyucuğa 100 μl Detection Antibody eklenip plaka $37^\circ C$ 'de 1 saat bekletilmiştir. Yıkamalardan sonra her kuyucuğa 100 μl HRP-bağlı sekonder antikör eklenip plaka $37^\circ C$ 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yıkama işlemleri tekrarlandıktan sonra her kuyucuğa 100 μl TMB Substrat eklenip plaka $37^\circ C$ 'de 10 dakika etüvde bektilmiş sonra her kuyucuğa 100 μl STOP Solüsyonu eklenip 30 dk içerisinde 450 nm'de absorbans değerinde okutulmuştur.

3. SONUÇLAR

3.1. A549 Hücrelerinde Palbociclib'in Sağkalım Üzerine Etkileri

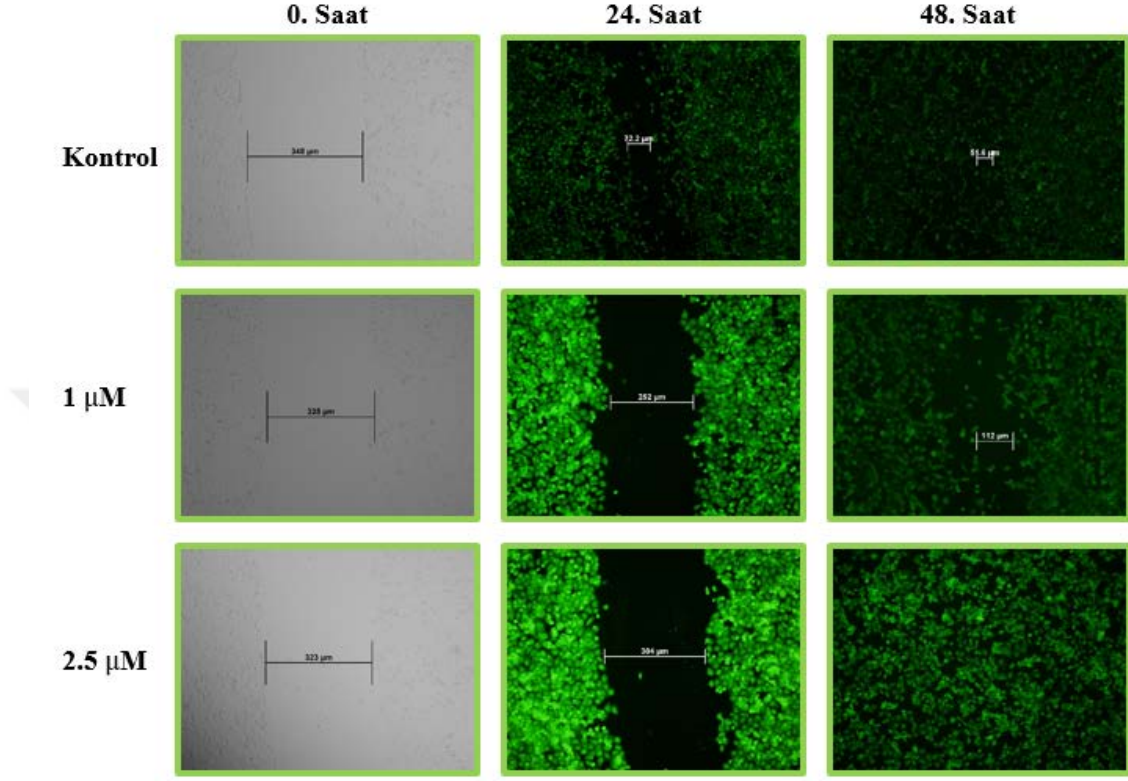
Palbociclib'in hücre sağkalım üzerine etkilerinin gösterilebilmesi amacıyla A549 akciğer kanseri hücrelerine farklı dozlarda ilaçla muamele edilmiş (1, 2,5 ve 5 μM) ve (0-96) saat boyunca hücreler izlenmiştir (Şekil 3.1). Bu süreçte kontrol hücrelerinin 72 saat boyunca petri kabında çoğalma göstermediği, ancak 72. saatten sonra yaklaşık sayıca 2 kat arttığı tespit edilmiştir. Bu veriden yola çıkarak, petriye ekilen hücre yoğunluğunun deneye başlangıç aşamasında kritik önem taşıdığı düşünülmüştür. Ardı ardına en az iki kez tekrar edilen bu deney kapsamında petriye hücrelerin % 50 den fazla yoğunlukla ekilmesinin, hücre çoğalması açısından önemli olduğuna karar verilmiştir.



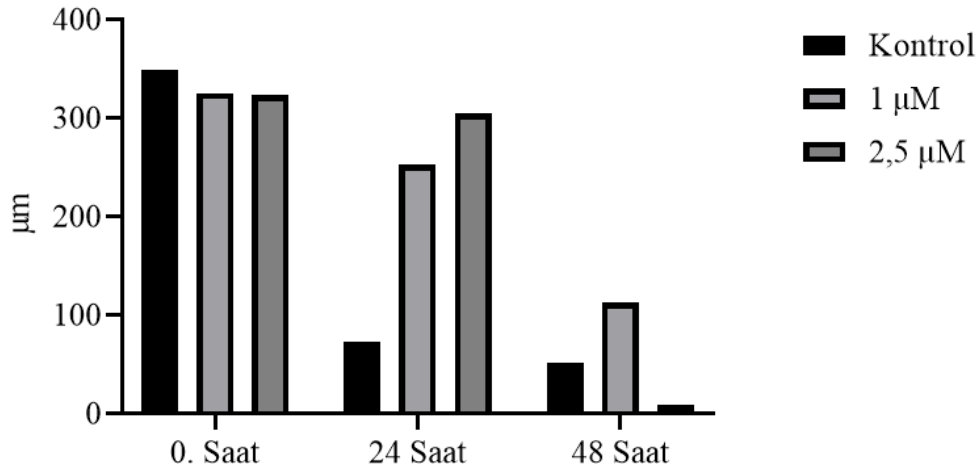
Şekil 3.1. Palbociclib ile muamele edilen A549 akciğer kanseri hücre hatlarındaki (KHDAK) hücre sağ kalım potansiyelinin doza bağlı olarak (0-96) saat arasında gösterilmesi. Lineer grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması \pm standart hatası olarak sunulmuştur ($n=2$). Her bir deney 100000 hücre ile başlatılmıştır.

A549 hücreleri sırasıyla 1, 2.5 ve 5 μM dozlarıyla, 24, 48, 72 ve 96 saat süre ile bir CDK inhibitörü olan Palbociclib ile muamele edilmiştir. Tüm konsantrasyonlar için 72 saate kadar sitotoksik bir etki olduğu gözlenmiştir. 72 saatten sonra hücrelerin tüm konsantrasyonlarda dirençli hale geldiği görülmüştür. 2,5 μM ve 5 μM doz uygulanmış hücrelerde sitotoksik etkinin çok yüksek olduğu ve bundan sonraki araştırmalarda 1 μM Palbociclib dozunun 24 saatlik etkisinin incelenmesi uygun görülmüştür (Şekil 3.1).

3.2. A549 Hücrelerinde Palbociclib'in Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri



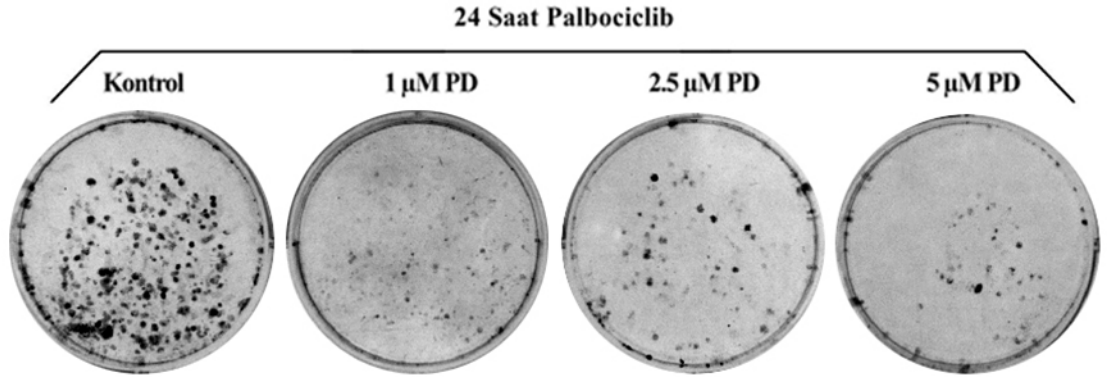
Şekil 3.2. Farklı dozlarda Palbociclib ile muamele edilen A549 akciğer kanseri hücreleri 0-24 ve 48 saatten sonra DiOC6 ile mitokondri membran potansiyeli açısından fluoresan mikroskopunda incelenmesi.



Şekil 3.3. Farklı doz ve zamanlarda Palbociclib ile muamele edilen A549 hücrelerinde yara kapanma mesafelerinin sütun grafik ile gösterilmesi. (GraphPad Prism 8 kullanılarak çizilmiştir.)

A549 akciğer kanseri hücreleri (KHDAK) yara iyileşmesi deneyi için 0-24 ve 48 saat sürelerde 1 ve 2,5 μM Palbociclib ile muamele edildi. Hücreler DiOC6 mitokondri membran potansiyeli açısından fluoresan mikroskopunda incelendi (Şekil 3.2). Kontrol hücrelerinde 24 saat sonrasında yara bölgesinde hücrelerin sayıca artması ve hücrelerin yara alanına yönelimleri mevcutken, 1 ve 2,5 μM Palbociclib uygulaması sonucunda ilk 24 saat içerisinde ilaç etkili bir şekilde hücre çoğalmasını azaltmış ve hücre hareketlerine ket vurmuştur (Şekil 3.3). 48. saate bakıldığında ilaç etkinliğini kısmen kaybetmiştir. DiOC6 boyaması ile hücrelerde fluoresan yoğunluğunun azalması, Palbociclib'in mitokondri membran permeabilizasyonu aracılı olarak hücre sağkalımında ket vurucu etki gösterebileceği düşünülmüştür.

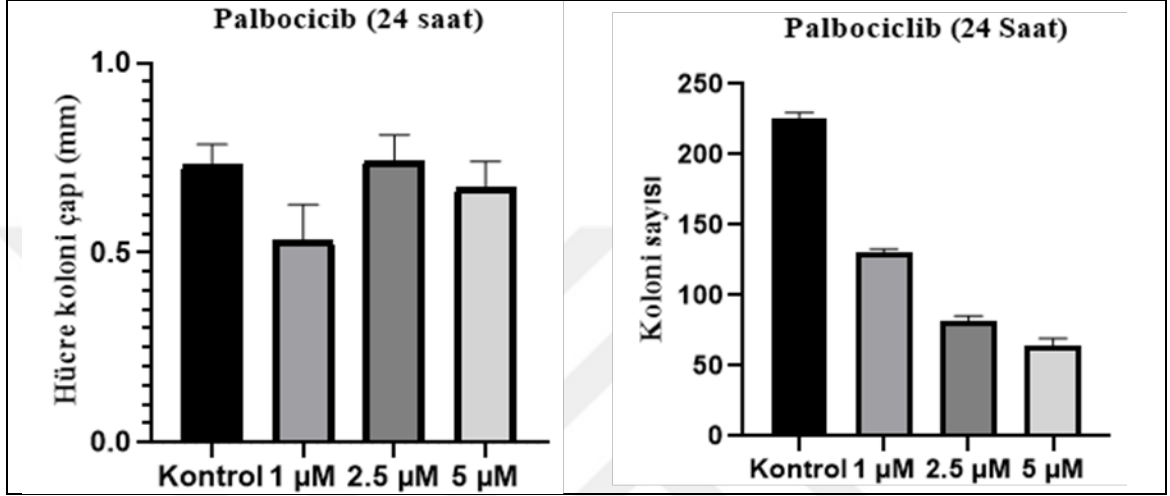
3.3. A549 Hücre Hattında Koloni Formasyonunun Gösterilmesi



Şekil 3.4. A549 akciğer kanseri hücrelerinde Palbociclib uygulaması sonucunda koloni oluşturma potansiyeli hücrelerin gösterilmiştir. Kristal boyama sonuçları sunulmaktadır.

6 kuyucuklu petri kabına her kuyuda 2500 hücre olacak şekilde A549 KHDAK hücreleri ekilip, 1, 2.5 ve 5 μM konsantrasyonlarda Palbociclib ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir (şekil 3.4). Kontrol gruplarına kıyasla ilaçlı gruplarda koloni formasyonunda azalış görülmüştür. Her kuyudan rasgele 3 hücre kolonisi seçilerek kuyu çapına göre ölçeklendirilip koloni çapları hesaplanmış ve ortalamaları alınarak sütun grafik elde edilmiştir (şekil 3.5).

Koloni sayılarını bulmak için her bir kuyucuk alanı karelere bölünüp karelere denk gelen kolonilere 3 kere kör sayım yapılarak graphpad programı kullanılarak sütun grafik elde edilmiştir (şekil 3.5).

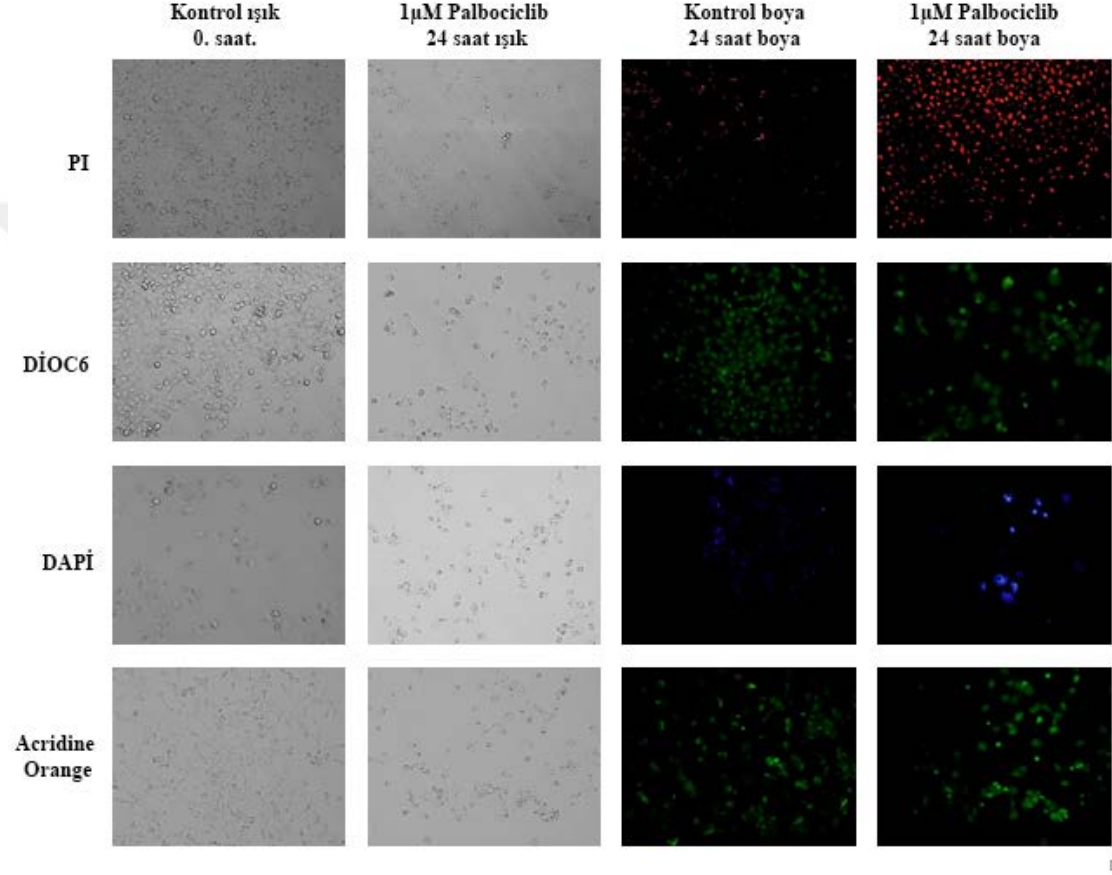


Şekil 3.5. A549 KHDAC hücrelerine 1 µM ,2.5 µM ve 5 µM Palbociclib 24 saat süre ile uygulanmıştır. Hücre koloni çapı ve koloni sayısı graphpad programı kullanılarak sütun grafik elde edilmiştir. Sütun grafik örneklerden elde edilen verilerin ortalaması ± standart hatası olarak sunulmuştur (n=3). Her bir deney 2500 hücre ile başlatılmıştır.

Hücre koloni çapları kontrolle karşılaştırıldığında 1µM için en az olduğu daha yüksek konsantrasyonlarda ise arttığı görülmüştür. Bu da A549 hücrelerinin 1µM 'dan daha yüksek konsantrasyonlarda Palbociclib'e direnç gösterdiğini düşündürmüştür. Koloni sayılarına bakıldığında kontrole kıyasla 1, 2,5 ve 5µM için sırasıyla bir azalma gözlenmiştir. Sonuç olarak ilaç konsantrasyonu arttıkça hücre koloni sayısının azaldığı, koloni çapları karşılaştırıldığında ise 1µM'dan sonra hücrelerin Palbociclib'e direnç gösterdiği düşünülmektedir.

3.4. A549 Hücrelerinde Palbociclib'in Etkisini Floresan Boyamalar ile Gösterilmesi

Floresan boyalar hücrelerin canlı-ölü tayinini, eğer ölüm varsa otofajik mi, apoptotik mi olduğu konusunda bilgi veren boyama yöntemleridir.



Şekil 3.6. A549 hücrelerinde 1 μM Palbociclib'in 24 saat uygulanması sonucunda hücre ölümü ile ilgili verilerin floresan mikroskobu ile gösterilmesi. Görüntüler en az 2 bağımsız deneyi temsil etmektedir.

PI, DNA'ya bağlanan ancak canlı hücre membranlarından nüfuz edemeyen bir boyadır, bu özelliği sayesinde floresan mikroskobu altında canlı-ölü hücrelerin ayrımının teşhis edilmesinde kullanılır. Floresan mikroskobunda yeşil renkli dalga boyuna ait ışığı absorbe eder ve kırmızı renkteki ışığı yansıtır. 1 μM Palbociclib'in 24 saatlik uygulaması sonucunda ölü hücre sayısının arttığı gözlemlenmektedir (Şekil 3.6).

Apoptotik hücre ölümünün göstergelerinden birisi DNA'nın çeşitli endonükleazlar tarafından kesilmesidir. Bunun sonucunda DNA'da ip merdiven görüntüsü ortaya çıkmaktadır ve DAPI boyası oluşan DNA kırıklarına bağlanarak apoptotik hücrelerin floresan mikroskobu altında analizini sağlamaktadır. DAPI boyası floresan mikroskobu altında açık mavi renk dalga boyuna karşılık gelen ışığı absorbe ettiğinde mavi renkte ışık yayımlamaktadır. 1µM Palbociclib'in 24 saatlik uygulaması sonucunda açık mavi ışımının varlığı DNA kırıklarının varlığını göstermektedir.

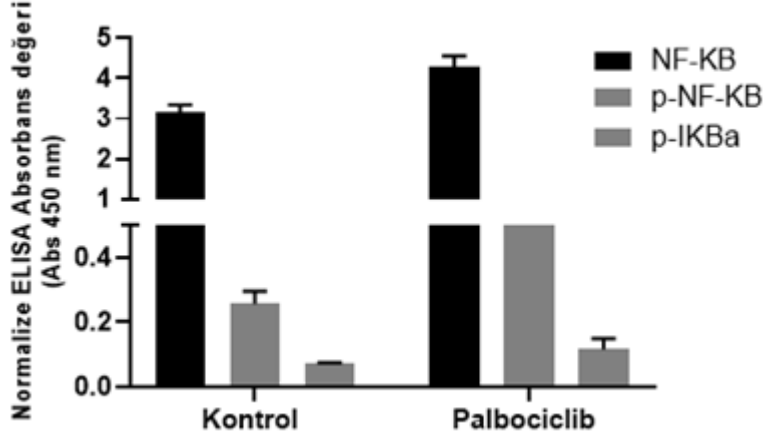
İçsel yolak aracılığıyla apoptotik hücre ölümünün temel göstergesi mitokondri membran potansiyelinin bozulması ve bu şekilde membrana ait bazı bileşenlerin sitozole salınmasıdır. DiOC6 lipofilik karakter taşıyan ve düşük konsantrasyonlarında canlı hücre mitokondrilerine seçici olarak bağlanan bir boyadır. Bu özelliği nedeniyle DiOC6 boyası floresan mikroskobu altında canlı hücrelerin tayininde kullanılmaktadır. 1µM Palbociclib'in 24 saatlik uygulamasının canlı hücre sayısını azalttığını göstermektedir (şekil 3.6).

Acridine Orange baz olarak da bilinen bir katyonik boyadır, pH'a bağlı olarak çift iplikli DNA'ya bağlandığında yeşil, tek iplikli DNA veya RNA'ya bağlandığında ise kırmızı floresan ışımaya yapmaktadır. Ayrıca yüksek asidik ortamlar olan geç otofajik vakuollerde de birikerek kırmızı floresan ışımaya yapmaktadır. 1µM Palbociclib'in 24 saatlik uygulaması sonucunda sadece yeşil ışımaya gözlenmektedir. Bu da çift iplikli DNA'ya bağlandığını ve aynı zamanda hücre sayısının azaldığını ortaya koymaktadır.

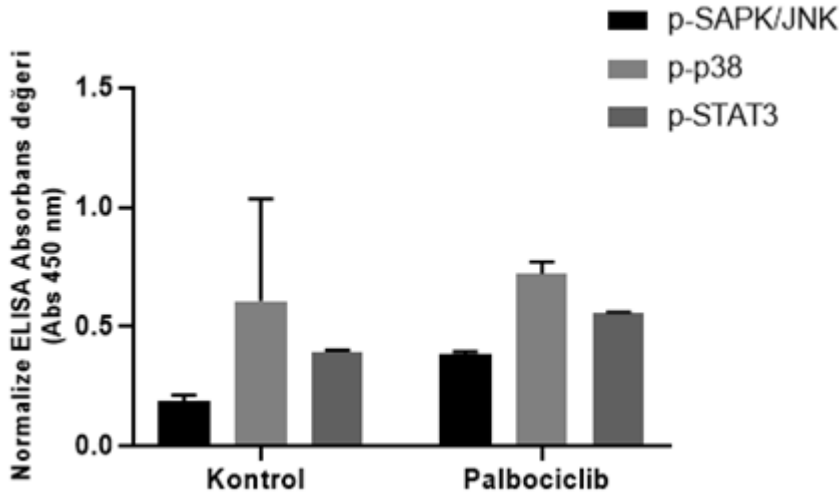
3.5. A549 Hücre Hattında Palbociclib'in Moleküler Hedefler Üzerine Etkilerinin Gösterilmesi

Hücre sağkalımı ve ölümü ile ilgili olarak A549 hücrelerinde hedef proteinler olarak NFκB, P38, SAPK/JNK gibi önemli moleküler hedeflerin değişimleri ELISA yöntemi ile irdelenmiştir. Bu amaçla ilaç uygulamasını takiben 24 saat sonra A549 akciğer kanseri hücrelerinde protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve PathScan Enflamasyon kiti ile fosfo-NfκB p65 (Ser536), fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), fosfo-STAT3 (Tyr705) ve fosfo-1B-α (Ser32) seviyeleri belirlenmiştir. ELISA kitinin kullanımında önerildiği üzere protein miktarı özütlerde

kontrol edilmiş ve veriler normalize edilmiştir. Palbociclib uygulaması sonucunda NFκB miktarı artmakta, ve bu oran p-NFκB ve p-IKBα ile uyumlu olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre Palbociclib'in NFκB aktivitesini arttırmakta olduğunu düşündürmüştür (şekil 3.7).



Şekil 3.7. NF-κB sinyal kaskadında görülen değişimlerin sandviç ELİSA yöntemi ile belirlenmesi. Kolon grafikler ortalama±Std. hata olarak sunulmaktadır. Absorbans 450 nm. (n=2).

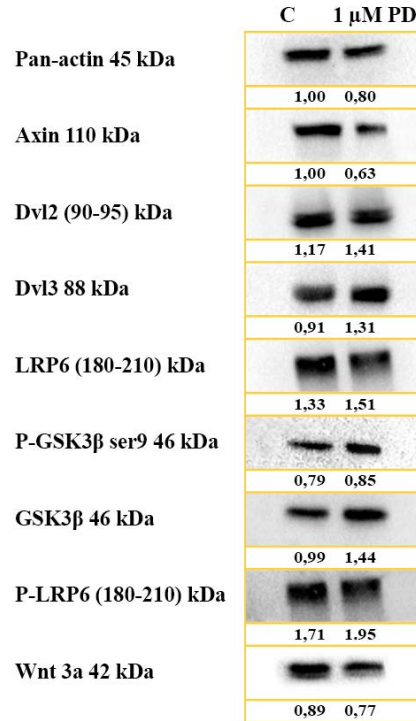


Şekil 3.8. MAPK sinyal yolağı ve STAT3 aktivitesinin sandviç ELİSA yöntemi ile A549 akciğer kanseri hücrelerinde gösterimi. Kolon grafikler ortalama ± Std. hata olarak sunulmaktadır. Absorbans 450 nm. (n=2).

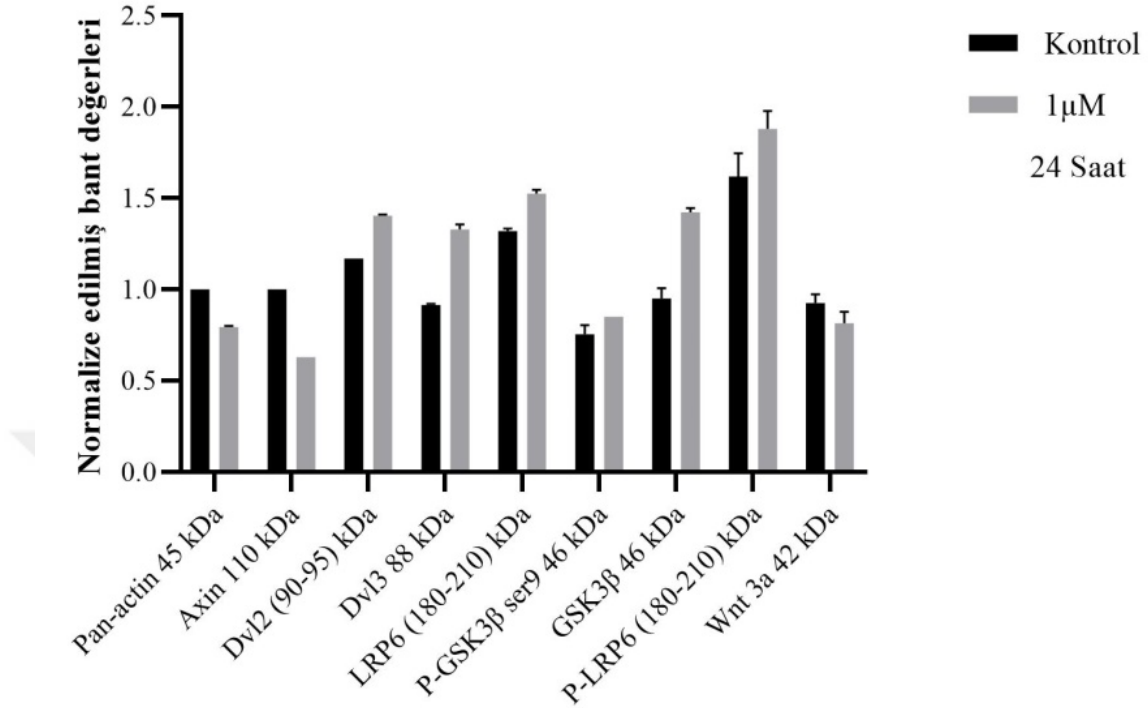
Stresle aktive olan protein kinaz/Jun-amino-terminal kinaz SAPK/JNK birçok farklı stress indükleyicisi tarafından aktive edilmekte ve böylece enflamasyon tetiklenmektedir. Palbociclib uygulaması enflamatuvar yanıtı aktive ederek, hem NF- κ B hem de SAPK/JNK üzerinden sinyal yolları üzerinde bulunan protein miktarlarını, uygulama yapılmayan kontrole göre arttırmıştır. Benzer şekilde p38 MAPK'nın aktive edilmesi ve STAT3 transkripsiyon faktörünün fosforilasyonu sitokin etkileşimlerinde önemli veriler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.8).

3.6. Western Blot Yöntemiyle Palbociclib Etkisi Altında A549 Hücrelerinde Wnt Sinyal Yolağındaki Protein Miktarlarının Belirlenmesi

A549 akciğer kanseri hücreleri üzerinde kontrol ve 1 μ M 24 saatlik Palbociclib uygulaması sonucunda izole edilen proteinler jelde yürütülerek membran üzerine transferi yapılmıştır. Primer ve sekonder antikorlar uygulandıktan sonra BioRad ChemiDoc cihazında elde edilen protein miktarı görüntüleri aşağıda listelenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. 24 saatlik 1 μ M Palbociclib uygulaması sonucunda Wnt sinyal yolağı üzerindeki proteinlerin anlatımının Western Blot tekniği ile gösterilmesi. Yükleme kontrolü olarak pan-Actin kullanılmış olup bu sonuçlar en az n=3 bağımsız deneyi temsil etmektedir.



Şekil 3.10. Western Blot sonuçlarına göre elde edilmiş protein miktarlarının ImageJ programı kullanılarak normalize edilmesi. Pan-aktin yüklem kontrolü olarak kullanılmıştır.

Wnt yolağı aktifken Wnt sinyal yolağında GSK3β ve kazein kinaz (CK1) gibi β-kateninin fosforilasyonu sonucunda yıkımını tetikleyen kinazları tutan Axin, dvl2, dvl3 gibi yapı iskele proteinlerinin anlatımlarıyla ilgili sonuçlara göre Axin'in anlatımının belirgin biçimde azaldığı, dvl2 ve dvl3'ün ise anlatımlarında belirgin bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Wnt 3a ligandının bir transmembran proteini olan LRP6'ya bağlanmasıyla LRP6 reseptörünün konformasyonunun değişmesiyle sitozol içindeki fosfat bağlanma bölgelerinin kinazlar tarafından fosfatlanmasıyla sinyalin içeri alınıp Wnt sinyal yolağının aktif hale gelmesini sağlayan protein ve reseptör proteinlerinin western blot sonuçlarıyla ilgili olarak Wnt3a, LRP6 ve P-LRP6'nın anlatımlarında önemli bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir. Wnt sinyali yokluğunda GSK3β'nin inhibe edici serin9 fosforilasyonu sonucunda β-kateninin nukleusa göçünü engelleyerek proteozomal bozunmasına neden olan GSK3β'nin protein anlatımında belirgin bir artış görülmüştür (Şekil 3.10).

4. TARTIŞMA

Anormal hücre proliferasyonuna yol açan düzensiz hücre bölünmesi, kanserin kilit özelliklerinden biridir ve hücre bölünmesini bloke etmek için terapötik hedeflerin belirlenmesi, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Bir hücrenin bölünmesi, hücre döngüsü olarak adlandırılan ve evrimsel açıdan yüksek oranda korunan karmaşık bir düzenleyici faktörlerin kontrolünde olur. Hücre döngüsünün her aşamasında, sıkı kontrol noktaları vardır. Hücre döngüsünün bir aşamasından diğerine geçiş, ortak siklinleri ile etkileşime girerek aktive olan CDK'lerin hareketleriyle kontrol edilir. Bu nedenle, CDK'ler uzun süre önce kanser terapileri için umut verici hedefler olarak kabul edilmiştir (O'Leary ve ark., 2016).

CDK 4/6 inhibisyonu için uygun hedef grupların seçimi, CDK 4/6'nın G1'den S'ye geçiş yaptığı ve CDK 4/6 inhibisyonunun etkilerinin diğer CDK'ların aktivitesi ile kurtarılamadığı tümör tiplerinin başarılı bir şekilde tanımlanmasına dayanır. Siklin D-CDK 4/6 eksenindeki sapmalar kanserli hastalarda sık görülen durumlardır. Ayrıca, baş ve boyun kanseri meme kanseri olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), özofagus kanserleri melanoma ve glioblastoma hastalarında siklin D'nin amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu tarif edilmiştir (O'Leary ve ark., 2016).

Palbociclib (Ibrance), kanser tedavisi için Pfizer tarafından geliştirilen oral, tersinir, seçici, küçük moleküllü bir sikline bağımlı kinaz CDK4 ve CDK6 inhibitörüdür. CDK4 ve CDK6, bunların ortak partner siklin D1 ile birlikte, retinoblastoma protein (RB) fosforilasyonunun düzenlenmesi yoluyla G1-S geçişinin düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. CDK'lar, büyüme sinyallerine cevap olarak hücre döngüsüne giriş ve ilerlemenin önemli modülatörleridir ve bu kinazların Palbociclib ile inhibe edilmesi, tolere edilebilir rejimlerde diğer antikanser ilaçların aktivitesini artırabilir. Palbociclib, letrozol ile kombinasyon halinde, ABD'de ilk meme kanseri tedavisi için onaylandı. Faz III gelişimi, ilerlemiş meme kanserinde ilk tedavi olarak kullanımının yanı sıra tekrarlayan veya ilerlemiş meme kanseri ve yüksek riskli erken evre meme kanserinin tedavisi olarak kullanımını araştıran çalışmalar dünya çapında devam etmektedir. ABD Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından finanse edilen bir araştırma işbirliğinde küçük

hücreli dışı akciğer kanseri için ABD'de bir faz II denemesi yürütülmekte olup, çeşitli diğer katı tümör tipleri ve hematolojik maligniteler için çeşitli faz I ve II araştırmaları yapılmaktadır (Hamilton ve ark., 2016).

Tek kollu bir faz II çalışmasında daha önce tedavi görmüş, ilerlemiş KHDAK'li hastalarda Palbociclibin etkinliği değerlendirilmiştir. Palbociclib ile en az 1 ay tedavi alan, değerlendirilebilir 16 hastada hiçbir yanıt görülmemiş ve denemeye edilmiştir. Bununla birlikte, ilerlemiş KHDAK olan 8 hastanın Palbociclib tedavisinden 16-42 hafta sonra hastalık stabil olup; kalan 8 hastanın 8 hafta içindeki durumunun progresif olduğu görülmüştür (Dhillon, 2015). Yapılan başka bir çalışmada daha önce tedavi edilmiş, ileri KHDAK'li RB ekspresyonu ve CDKN2A inaktivasyonu (negatif p16^{INK4A} ekspresyonu) sergileyen 19 hastada Palbociclib'in II. faz çalışmasında, medyan PFS 12,5 haftayken beş hasta en az 24 hafta boyunca hayatta kalıp çalışmaya devam etmiştir (Hamilton ve Infante, 2016).

Bir MEK inhibitörü olan PD-0325901 ve CDK 4/6 inhibitörü Palbociclib'in kombine olarak kullanıldığı birçok çalışmada başta K-RAS mutant küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve diğer tüm katı tümörlerin tedavisine yönelik araştırmalar devam etmektedir (Uehling ve ark., 2015).

Palbociclib daha çok meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere ortaya çıkmıştır. Yukarıda da bahsedildiği gibi diğer kanserler üzerine de etkinliği araştırılmaktadır. Bu tez kapsamında bir CDK inhibitörü olan Palbociclib'in A549 KHDAK hücreleri üzerine etkisi ve aynı zamanda enflamasyonla ilişkili olarak NF-κB ve Wnt sinyal yolağı üzerindeki davranışları incelenmiştir.

Bilindiği üzere CDK'lar hücre döngüsünde çok kritik öneme sahip kinazlardır. Bu yüzden birçok kanser araştırması hücre bölünmesini ve çoğalmasını engellemek adına CDK'yı hedef alan ajanların geliştirilmesi üzerine yapılmaktadır. Bu nedenle hücre bölünmesini yavaşlattığı veya durduğunu anlamak adına bu çalışmada zamana ve doza bağlı olarak hücre sağkalım analizi, koloni oluşturup oluşturamadığı, yara iyileşmesi ve floresan boyamalar gibi deneyler yapılmıştır. Doza ve zamana bağlı sağkalım analizinin hem öldürücü aynı zamanda da olabilecek en az sitotoksik değerinin 1 µM ve 24 saat olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan diğer doz belirleme çalışmalarında

Palbociclib'in tek başına veya kombine ajanlarla birlikte kullanıldığında da çok düşük dozlarda bile etkili olduğu ortaya konulmuştur. Örneğin Kombine tedaviye cevap olarak büyüme inhibisyonunun mekanizmasını analiz etmek için 24 saatlik tedaviden sonra hücre döngüsü dağılımı çalışmaları yapılmış ve G1 fazında olan A549 hücrelerinin yüzdesi, kombine tedaviye (1 μ M Palbociclib ve 1 μ M selumetinib) cevap olarak önemli ölçüde artmıştır, hücre ölümünde artış gözlenmiştir (Zhou ve ark., 2017). Yapılan başka bir derlemede Palbociclib'in sikline bağlı kinaz (CDK) üzerine yarı maksimum inhibitör konsantrasyonların (IC50), CDK1: >10 μ M CDK2: >10 μ M CDK4: 9–11 nM CDK5: >10 μ M CDK6: 15 nM olarak gösterilmiştir (O'Leary ve ark., 2016).

Yapılan başka bir çalışmada CDK4/6 inhibitörü Palbociclib'in mTOR inhibisyonunu sağlayan Everolimus ile kombinasyon halinde ilerlemiş akciğer kanserli hastalarda palbociclib'in iyi tolere edilebilirliğini ve daha küçük dozlarda bile etkisini göstermesini sağlamıştır. Yüksek Palbociclib konsantrasyonlarının, klinik çalışmalarda hastaların tedavisinde zararlı olabilecek RB'nin spesifik olmayan proteozomal bozulması ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Buna karşılık, daha düşük palbociclib konsantrasyonları ile kararlı durumdaki RB protein seviyeleri korunmuştur (Gopalan ve ark., 2018).

Tüm CDK 4/6 inhibitörleri, proteinlerin ATP bağlayıcı alanlarını hedef alarak tasarlanmıştır. Klinik kullanıma çevrilen palbociclib (Ibrance; Pfizer), ribociclib (Kisqali; Novartis) ve abemaciclib yakın zamanda FDA'nın endokrin terapisi ile kombinasyon halinde kullanımı onaylanmıştır ve birinci basamak tedavi ortamında ileri östrojen reseptörü pozitif meme kanseri olan hastaların ilerlemesiz sağkalımlarını önemli ölçüde arttırmışlardır. Bu bileşikler, CDK 4/6 için, diğer CDK familyası üyeleri üzerinde, tarihsel benzerlerine kıyasla oldukça seçici olduğu görülmüştür. Hem palbociclib hem de ribociclib, CDK4 ve CDK6 için diğer hücre döngüsü CDK'lerine ve CDK9'a göre 100 kat daha yüksek afiniteye sahiptir. Buna karşılık, abemaciclib daha az seçicidir, CDK 4/6 için CDK9'a göre sadece altı kat daha fazla afinite ile ve CDK9'a göre daha fazla aktiviteye sahiptir ve daha yüksek dozlarda CDK1, CDK2 ve CDK5'e karşı bazı aktiviteye sahiptir. Daha az seçici olmasına rağmen, doğrudan bir karşılaştırmada, abemaciclib'in palbociclib'e göre kan-beyin bariyerinden daha etkili bir şekilde geçtiği ve bu ilacın potansiyel uygulamasını beyin kanserleri ve ikincil beyin

metastazlarına genişletildiği tespit edildi. Preklinik hücre hatları modellerinde Abemaciclib'in, ancak palbociclib veya ribociclib'in olmadığı, GSK3 β inhibisyonu ve ardından β -katenin stabilizasyonu yoluyla wnt sinyalini aktive ettiği bulunmuştur. GSK3 β aktivitesi ayrıca, hem transkripsiyonel hem de proteomik seviyede siklin D ailesi proteinlerinin düzenlenmesinde, GSK3 β inhibisyonunun siklin D seviyelerini arttırması beklenen önemli bir rol oynar (Portman ve ark., 2019).

İkinci nesil tirozin kinaz inhibitörü (TKI) olarak, afatinib, ilerlemiş/metastatik EGFR mutant KHDAK'yi (küçük hücreli dışı akciğer kanseri) tedavi etmek için onaylanmıştır. Bununla birlikte, afatinibin klinik uygulaması kazanılmış dirençle sınırlıdır. Yapılan çalışmalar CDK 4/6 inhibitörlerinin, hücrelerin çoğalmasını engellediği ve sadece *in vivo* değil aynı zamanda *in vitro* olarak çoğalan malign hücrelerin ölümünün yanı sıra farklılaşma gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Palbociclib ve afatinib tedavisinin kombine edilmesinin, edinilmiş dirençli hücrelerin sağkalımını azaltmada sinerjizme yol açtığını göstermiştir (Nie ve ark., 2019).

Wnt'ler (Wnt geninin çevrilmiş ürünleri) hücreler tarafından yakın bir zamanda reseptör aracılı sinyallemeyi aktive eden hücre dışı matris içine salgılanan sistein bakımından zengin glikoproteinlerdir. Wnt protein ailesi, omurgasız hayvanlardan memelilere kadar türler arasında yüksek oranda korunan en az 19 tane glikoproteinlerden (uzunluğu 350-400 amino asit) oluşur. Wnt, G-protein ile birleştirilmiş reseptörlerin üst ailesinin bir üyesi olan bir Frizzled aile reseptörünün N terminal hücre dışı sistein bakımından zengin alanına bağlanır. LRP düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ailesinin bir üyesidir ve Wnt/ β -katenin sinyal yolunun diğer bir reseptörü olan Fz reseptörü gibi hücre zarına yerleşmiştir. LRP reseptörü hem metabolizmanın düzenlenmesinde görev alırken hem de Wnt ve Fz ile birlikte sinyalin başlaması için gerekli olan üçlü kompleksin içinde yer alır. Sonuç olarak hücreden içeri alınan Wnt sinyali, β -katenin (Axin, adenomatous poliposis coli (APC), CK1 α ve GSK3 β tarafından oluşturulan üçüncül bir kompleks) yıkım kompleksini bozar ve β -katenin'nin sitoplazmik birikimini tetikler. Böylece β -katenin nukleusa göç eder ve transkripsiyonu başlatır (Pai ve ark., 2017).

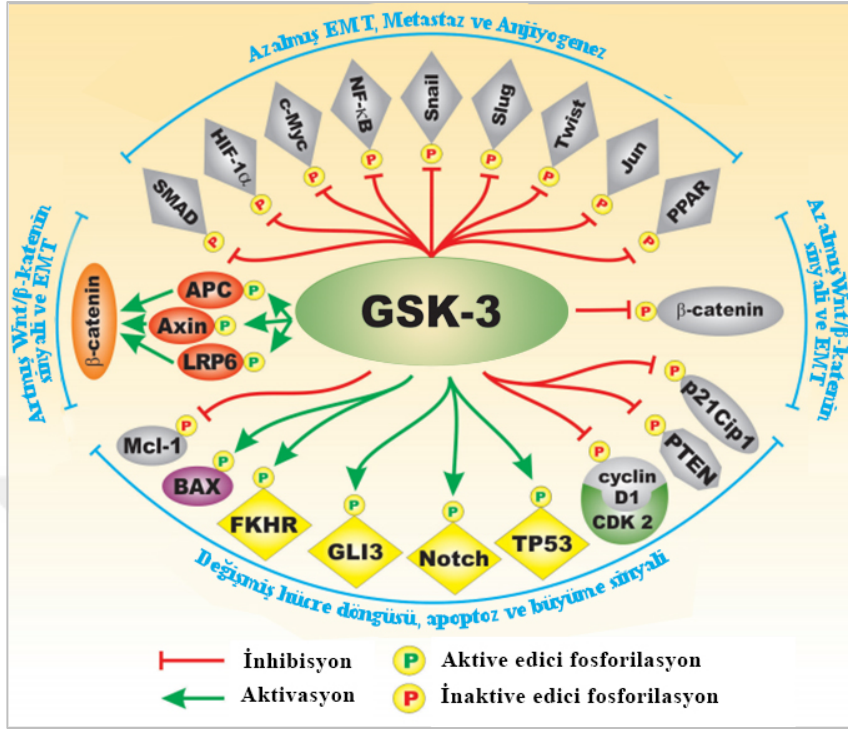
Bu tez kapsamında Palbociclib'in A549 hücrelerinde wnt sinyal yolağı üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla yapılan western blot analizinde Wnt sinyal yolağının aktif

hale gelmesini sağlayan protein ve reseptör proteinlerinin Wnt3a, LRP6 ve P-LRP6'nın anlatımlarında önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. LRP6 ve P-LRP6 Transmembran proteinlerinin anlatımlarının daha iyi anlaşılması için gerçek zamanlı qRT- PCR ile gösterilmesi daha sağlıklı sonuçlar verebilir. Ayrıca bir transmembran proteininin anlatımı için farklı izolasyon teknikleri denenebilir (Muinao ve ark., 2018).

İskele proteini olan Axin, β -katenin stabilitesini sıkı bir şekilde düzenleyen çok parçalı imha kompleksinin kritik bir bileşenidir. Western blot sonuçlarına göre axin proteininin anlatımı belirgin bir şekilde düşmüştür. Bu sonuç, Axin seviyesinin düşmesiyle β -katenin yıkım kompleksinin aktivitesinin arttığı dolayısıyla Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivitesinin azaldığı şeklinde yorumlanabilir.

Yapılan araştırmalar Axin seviyesini, poliadenozin difosfat (ADP) -ribosile edici enzimler tankiraz-1 (TNKS1) ve tankiraz-2 (TNKS2) tarafından düzenlendiği ve ubiquitinasyon ve proteozomal bozunma için Axin'i yönlendirdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca TNKS1/2'nin inhibisyonu, Axin stabilizasyonuna yol açtığı, bu nedenle β -katenin yıkımına neden olduğu sonuç olarak Wnt sinyalini azalttığını da meydana çıkartmıştır. (Badder ve ark., 2019).

Western blot sonuçlarına göre Dvl2 ve Dvl3 proteinlerinde belirgin bir artış olmamıştır. Wnt sinyali yokluğunda GSK3 β 'nin inhibe edici serin9 fosforilasyonu sonucunda GSK3 β 'nin nukleusa göçünü engelleyerek proteozomal bozunmasına neden olan GSK3 β 'nin protein anlatımında belirgin bir artış görölmüştür. GSK3 β 'nin artması Wnt sinyal yolağının negatif yönde düzenlenmesini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir ancak GSK-3 birçok sinyal yolağı ile iletişim halindedir (Şekil 4.1). Bu nedenle tek bir yolak üzerinden sonuca gitmek tartışmalıdır. A549 hücrelerinde Palbociclib uygulamasının diğer sinyal yolakları üzerine nasıl bir etki yaptığı ve GSK-3'ün nasıl davrandığı birlikte ele alınmalıdır.



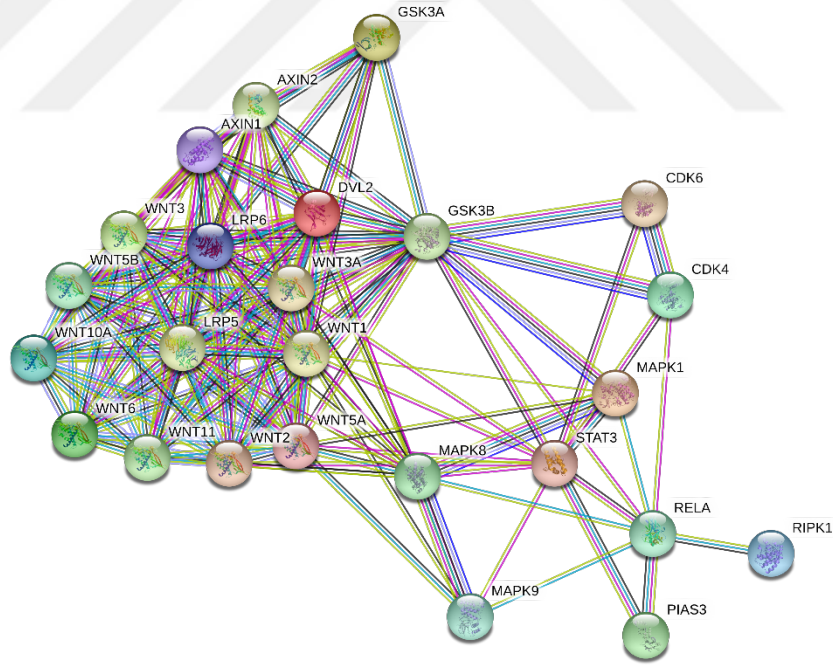
Şekil 4.1. GSK-3'ün üstünde gri renkle gösterilen GSK-3 fosforilasyonu tarafından inaktive edilen transkripsiyon faktörleri vardır. GSK-3'ün alt kısmında, sarı renkle gösterilen GSK-3 fosforilasyonu tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörleri vardır. Kırmızı ovalerde belirtilenler Wnt/beta-katenin yolundaki moleküllerdir. Kırmızı ovalerde gösterilen GSK-3 fosforilasyonu ve turuncu oval olarak belirtilen beta-katenin ile aktive edilir. Ayrıca belirtilen Bax pro-apoptotik molekülüdür. Bax'in mitokondrial lokalizasyonu, GSK-3 tarafından fosforile edildiğinde hücre apoptoza teşvik edilir. Ayrıca, GSK-3 fosforilasyonu (PTEN, siklin D1 ve p21Cip-1) ve gri sembollerle gösterilen beta-katenin tarafından inaktive edilmiş bazı hücre döngüsü ve sinyal proteinleri de ifade edilmiştir. (McCubrey ve ark., 2017)'den uyarlanarak alınmıştır.

Wnt/β-catenin yolağı embriyonik gelişimde ve yetişkin dokularda homeostatik kendi kendini yenilemedeki önemli rolünün yanı sıra, hem enflamatuvar önleyici hem de proinflamatuvar işlevler uygular. Benzer şekilde, NF-κB yolu, Wnt/β-katenin sinyalleşmesini pozitif veya negatif olarak düzenler. İki yolun farklı bileşenleri arasında çapraz konuşma yer almakta ve karmaşık bir düzenleme ağı oluşturmaktadır (Ma ve Hottiger, 2016).

NF - κB ve STAT3, pozitif veya negatif olarak etkileşime girebilir. Birçok hücre tipinde, NF κB ve STAT3, siklin D1 ve MYC gibi proliferatif proteinlerin ve BCL-XL ve apoptoz düzenleyici BCL-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu işbirliği

içinde düzenler ve p53 sentezine müdahale eder. NF- κ B ayrıca tümör mikroçevresinde immün hücrelerinde farklı enflamatuar mediatörleri kodlayan genlerin STAT3 aracılı ekspresyonunu hızlandırır ve bunun tersi de geçerlidir. Bununla birlikte, NF- κ B ve STAT3 ayrıca hepatositler dahil olmak üzere birkaç hücre tipinde NF- κ B kinaz-I (IKK β)–NF- κ B yolunun inhibitörü tarafından STAT3 aktivasyonunun bastırılması gibi antagonistik etkileşimler gösterebilir (Taniguchi ve Karin, 2018).

A549 akciğer kanseri hücrelerinde PathScan ELİSA enflamasyon kiti ile fosfo-Nf κ B p65 (Ser536), fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), fosfo-STAT3 (Tyr705) ve fosfo-1B- α (Ser32) seviyeleri belirlenmiştir. Palbociclib uygulaması sonucunda NF κ B miktarı artmakta, ve bu oran p-NF κ B ve p-IKB α ile uyumlu olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre Palbociclib'in NF κ B'nin aktivitesini pozitif yönde arttırmakta olduğunu düşündürmüştür.



Şekil 4.2. STRING veritabanında Wnt-NF- κ B-MAPK-STAT sinyal ekseninin etkileşim ağının gösterilmesi

Daha önce gerçekleştirilen meta-analizlerde meme kanseri (hsa05224), kanserindeki etkileşim yolları (hsa05225), hepatosellüler kanser (hsa05200), mide kanseri (hsa05226) vakalarında (Şekil 4.2) de yer alan protein etkileşimlerinin anlamlı düzeyde değişim gösterdiği KEGG biyolojik fonksiyon değerlendirmesine göre tanımlanmıştır. Palbociclib'in metastatik meme kanserinde endikasyonu her ne kadar CDK 4/6 inhibisyonu ile ilişkili olsa bile, değişen protein etkileşimlerine bakılarak özellikle enflamasyon ve Wnt sinyal kaskadındaki süreçlerin incelenmesi, tümör mikroçevresi ve kötü prognozlu kanserlerin tedavisinde umut vaadeden sonuçların elde edilmesine yardımcı olabilir. Birçok çalışmada artan NF- κ B aktivitesi Wnt- β -katenin pozitif düzenlenmesi ile ilişkili olarak gösterilmektedir.

Gelecek çalışmalarda Palbociclib'in tümör mikroçevresi ile ilgili olarak protein-protein etkileşimdeki rolü, diğer protein hedeflerinin ifade düzeyleri üzerindeki etkilerinin tanımlanması terapinin başarılı sonuçları için önemli veriler sağlayabilecektir.

5. KAYNAKLAR

- Badder, L. M., Hollins, A. J., Herpers, B., Yan, K., Ewan, K. B., Shone, J. R., . . . Hargest, R. (2019). "3D imaging of colorectal cancer organoids identifies responses to Tankyrase inhibitors". *BioRxiv*, 705277-705319.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., ve Jemal, A. (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Cadoo, K. A., Gucalp, A., ve Traina, T. A. (2014). "Palbociclib: an evidence-based review of its potential in the treatment of breast cancer". *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 6, 123-133.
- Cheng, T.-Y. D., Cramb, S. M., Baade, P. D., Youlden, D. R., Nwogu, C., ve Reid, M. E. (2016). "The international epidemiology of lung cancer: latest trends, disparities, and tumor characteristics". *Journal of Thoracic Oncology*, 11(10), 1653-1671.
- Clark, A. S., Karasic, T. B., DeMichele, A., Vaughn, D. J., O'hara, M., Perini, R., . . . Gallagher, M. (2016). "Palbociclib (PD0332991)—a selective and potent cyclin-dependent kinase inhibitor: a review of pharmacodynamics and clinical development". *JAMA Oncology*, 2(2), 253-260.
- Cooper, W. A., Lam, D. C., O'Toole, S. A., ve Minna, J. D. (2013). "Molecular biology of lung cancer". *Journal of Thoracic Disease*, 5(5), 479-490.
- Cully, M., You, H., Levine, A. J., ve Mak, T. W. (2006). "Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis". 6, 184-192.
- Dhillon, S. (2015). "Palbociclib: first global approval". *Drugs*, 75(5), 543-551.
- Dickson, M. A. (2014). "Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy". *Clinical Cancer Research*, 20(13), 3379-3383.
- Ehab, M., ve Elbaz, M. (2016). "Profile of palbociclib in the treatment of metastatic breast cancer". *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 8, 83-91.
- Finn, R. S., Dering, J., Conklin, D., Kalous, O., Cohen, D. J., Desai, A. J., . . . Fowst, C. (2009). "PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro". *Breast Cancer Research*, 11(5), 77-99.

- Gold, K. A., Wistuba, I. I., ve Kim, E. S. (2012). "New strategies in squamous cell carcinoma of the lung: identification of tumor drivers to personalize therapy". *"Clinical Cancer Research"*, 18(11), 3002-3007.
- Gopalan, P. K., Villegas, A. G., Cao, C., Pinder-Schenck, M., Chiappori, A., Hou, W., Kaye, F. J. (2018). "CDK4/6 inhibition stabilizes disease in patients with p16-null non-small cell lung cancer and is synergistic with mTOR inhibition". *"Oncotarget"*, 9(100), 37352-373366.
- Gurda, G. T., Zhang, L., Wang, Y., Chen, L., Geddes, S., Cho, W. C., Li, Q. K. (2015). "Utility of five commonly used immunohistochemical markers TTF-1, Napsin A, CK7, CK5/6 and P63 in primary and metastatic adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: a retrospective study of 246 fine needle aspiration cases". *"Clinical and Translational Medicine"*, 4(1), 16-28.
- Gültekin, M., ve Boztaş, G. (2018). Türkiye Kanser İstatistikleri *Türkiye Sağlık Bakanlığı* (Vol. 43, pp. 1-48). Ankara: Halk Sağlığı.
- Hamilton, E., ve Infante, J. R. (2016). "Targeting CDK4/6 in patients with cancer". *"Cancer Treatment Reviews"*, 45, 129-138.
- Herbst, R. S., Morgensztern, D., ve Boshoff, C. (2018). "The biology and management of non-small cell lung cancer". *"Nature"*, 553(7689), 446-454.
- Hirsch, F. R., Suda, K., Wiens, J., ve Bunn Jr, P. A. (2016). "New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer". *"The Lancet"*, 388(10048), 1012-1024.
- Khoo, C., Rogers, T.-M., Fellowes, A., Bell, A., ve Fox, S. (2015). "Molecular methods for somatic mutation testing in lung adenocarcinoma: EGFR and beyond". *"Translational Lung Cancer Research"*, 4(2), 126-141.
- Klimstra, D. S., Modlin, I. R., Coppola, D., Lloyd, R. V., ve Suster, S. (2010). "The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems". *"Pancreas"*, 39(6), 707-712.
- Koo, M. M., Hamilton, W., Walter, F. M., Rubin, G. P., ve Lyratzopoulos, G. (2018). "Symptom signatures and diagnostic timeliness in cancer patients: a review of current evidence". *"Neoplasia"*, 20(2), 165-174.

Latimer, K. M., ve Mott, T. F. (2015). "Lung cancer: diagnosis, treatment principles, and screening". *"American Family Physician"*, 91(4), 250-257.

Ma, B., ve Hottiger, M. O. (2016). "Crosstalk between Wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathway during inflammation". *"Frontiers in Immunology"*, 7, 378-391.

Malapelle, U., Della Gravara, L., Battiloro, C., Avellino, A., ve Rocco, D. (2019). "Personalized genomic medicine: non-small-cell lung cancer and anaplastic lymphoma kinase". *"Journal of Translational Genetics and Genomics"*, 3(3), 1-9.

Mao, Y., Yang, D., He, J., ve Krasna, M. J. (2016). "Epidemiology of lung cancer". *"Surgical Oncology Clinics"*, 25(3), 439-445.

McCubrey, J. A., Fitzgerald, T. L., Yang, L. V., Lertpiriyapong, K., Steelman, L. S., Abrams, S. L., . . . Cocco, L. (2017). "Roles of GSK-3 and microRNAs on epithelial mesenchymal transition and cancer stem cells". *"Oncotarget"*, 8(8), 14221-14257.

Mehta, A., Dobersch, S., Romero-Olmedo, A. J., ve Barreto, G. (2015). "Epigenetics in lung cancer diagnosis and therapy". *"Cancer and Metastasis Reviews"*, 34(2), 229-241.

Mogi, A., ve Kuwano, H. (2011). "TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer". *"BioMed Research International"*, 2011, 1-9.

Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., ve Adjei, A. A. (2008). "Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship". *"Mayo Clinic Proceedings"*, 83(5), 584-594.

Muinao, T., Pal, M., ve Boruah, H. P. D. (2018). "Cytosolic and Transmembrane Protein Extraction Methods of Breast and Ovarian Cancer Cells: A Comparative Study". *"Journal of biomolecular techniques: JBT"*, 29(3), 71-78.

Nie, H., Zhou, X., Shuzhang, D., Nie, C., Zhang, X., ve Huang, J. (2019). "Palbociclib overcomes afatinib resistance in non-small cell lung cancer". *"Biomedicine & Pharmacotherapy"*, 109, 1750-1757.

O'Leary, B., Finn, R. S., ve Turner, N. C. (2016). "Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors". *"Nature Reviews Clinical Oncology"*, 13(7), 417-430.

Oser, M. G., Niederst, M. J., Sequist, L. V., ve Engelman, J. A. (2015). "Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin". *"The Lancet Oncology"*, 16(4), 165-172.

Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mota, J. M., Costa, R., Leite, C. A., Barroso-Sousa, R., . . . Giles, F. J. (2017). "Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response". *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 101-112.

Paik, P. K., Arcila, M. E., Fara, M., Sima, C. S., Miller, V. A., Kris, M. G., . . . Riely, G. J. (2011). "Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations". *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 2046-2051.

Planchard, D., ve Le Péchoux, C. (2011). "Small cell lung cancer: new clinical recommendations and current status of biomarker assessment". *European Journal of Cancer*, 47, S272-S283.

Portman, N., Alexandrou, S., Carson, E., Wang, S., Lim, E., ve Caldon, C. E. (2019). "Overcoming CDK4/6 inhibitor resistance in ER-positive breast cancer". *Endocrine-related cancer*, 26(1), R15-R30.

Postmus, P., Kerr, K., Oudkerk, M., Senan, S., Waller, D., Vansteenkiste, J., . . . Peters, S. (2017). "Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". *Annals of Oncology*, 28(suppl_4), iv1-iv21.

Rafiemanesh, H., Mehtarpour, M., Khani, F., Hesami, S. M., Shamlou, R., Towhidi, F., . . . Moini, A. (2016). "Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world". *Journal of Thoracic Disease*, 8(6), 1094-1102.

Roskoski Jr, R. (2016). "Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs". *Pharmacological Research*, 107, 249-275.

Sandsmark, E., Hansen, A. F., Selnæs, K. M., Bertilsson, H., Bofin, A. M., Wright, A. J., . . . Bathen, T. F. (2017). "A novel non-canonical Wnt signature for prostate cancer aggressiveness". *Oncotarget*, 8(6), 9572-9587.

Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., . . . Hatanaka, H. (2007). "Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer". *Nature*, 448(7153), 561-566.

Stewart, D. J. (2014). "Wnt signaling pathway in non–small cell lung cancer". *Journal of the National Cancer Institute*, 106(1-11).

- Taniguchi, K., ve Karin, M. (2018). "NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age". *"Nature Reviews Immunology"*, 18(5), 309-324.
- Terry, J., Leung, S., Laskin, J., Leslie, K. O., Gown, A. M., ve Ionescu, D. N. (2010). "Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples". *"The American Journal of Surgical Pathology"*, 34(12), 1805-1811.
- Tímár, J. (2014). "The clinical relevance of KRAS gene mutation in non-small-cell lung cancer". *"Current Opinion in Oncology"*, 26(2), 138-144.
- Travis, W. D. (2012). "Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas". *"Modern Pathology"*, 25, 18-30.
- Uehling, D. E., ve Harris, P. A. (2015). "Recent progress on MAP kinase pathway inhibitors". *"Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters"*, 25(19), 4047-4056.
- Uluç, B. O., Demir, G., Çelik, İ., Çetingöz, R., Altın, S., Eser, S., . . . Coşkun, U. (2016). *Akciğer Kanseri Yol Haritası* (Vol. 1): İmmüno-Onkoloji Derneği, Türk Akciğer Kanseri Derneği, Türk Tıbbi Onkoloji Derneği ve Türk Toraks Derneği.
- van Meerbeeck, J. P., Fennell, D. A., ve De Ruyscher, D. K. (2011). "Small-cell lung cancer". *"The Lancet"*, 378(9804), 1741-1755.
- Wood, S. L., Pernemalm, M., Crosbie, P. A., ve Whetton, A. D. (2015). "Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments". *"Cancer Treatment Reviews"*, 41(4), 361-375.
- Zappa, C., ve Mousa, S. A. (2016). "Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances". *"Translational Lung Cancer Research"*, 5(3), 288-330.
- Zhan, T., Rindtorff, N., ve Boutros, M. (2017). "Wnt signaling in cancer". *"Oncogene"*, 36(11), 1461-1473.
- Zheng, M. (2016). "Classification and pathology of lung cancer". *"Surgical Oncology Clinics"*, 25(3), 447-468.
- Zhou, J., Zhang, S., Chen, X., Zheng, X., Yao, Y., Lu, G., ve Zhou, J. (2017). "Palbociclib, a selective CDK4/6 inhibitor, enhances the effect of selumetinib in RAS-driven non-small cell lung cancer". *"Cancer Letters"*, 408, 130-137.

6. EKLER

EK A: Cihazlar

Tablo 6.1. Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler kullanılan cihazlar gösterilmiştir.

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Santrifüj (Büyük)	5810R	Eppendorf
Spin minispın plus	SN0708	LabNet
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5 µl-10 µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20 µl-200 µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200 µl-1000 µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Derin Dondurucu (-80 °C)	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Nanodrop		BO-GA
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell 150	Thermo
Fluoresan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
Elektroforez Aletleri		BioRad

Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6
Santrifüj	NF 200	Nüve
DRY BATH İNKÜBATÖR	010410-1109-0157	bioSan
Kuru Blok Isıtıcı		BO-GA
Dondurucu (-20 °C)		Arçelik

EK B: HÜCRE KÜLTÜRÜ DONANIMLARI

Tablo 6.2. Tez çalışması kapsamında hücre doku kültüründe kullanılan malzemeler

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
6 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
25 santimetrekarelik hücre büyüme kapları	90026	TPP
75 santimetrekarelik hücre büyüme kapları	90076	TPP
Steril pipetler (5 ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10 ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0,22µm)	99722	TPP
Enjektör seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
RPMI 1640	PO4-18947	PAN BIOTECH
A549 hücreleri		ATCC
Hemositometre		Neubauer

EK C: KULLANILAN KİMYASALLAR

Tablo 6.3. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerde kullanılan kimyasallar

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Palbociclib		pfizer
FuGENE® 6 Transfection Reagent	E2692	Promega
PVDF Membran (0,45 µm)	10600023	Amersham
PVDF Membran (0,20 µm)	10600021	Amersham
TEMED	A1148,0100	Applichem
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue	A3480	Applichem
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptoetanol	S4805940 517	MERCK
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
DiOC6	2129966	Fluka
DAPI	D9542-5MG	SIGMA-ALDRICH
PI	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Acridine Orange		
DCFH-DA	C6827	Invitrogen
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
SDS	UN1 888	Applichem

PBS	BE17-51-5F	LONZA
Tris-HCL	648317	CALBIOCHEM
BSA	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
Akrilamid/Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Appllichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
Glisin	3570	CALBIOCHEM
Hidrojen peroksit	K39218400838	MERCK
Ponceau Red	A1405	Appllichem
HCL	K438047117 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Appllichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Çamaşır suyu		ACE
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Bakır sülfat	02791	MERCK
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Super Block T20	37536	Thermo
Tripan mavisi		

EK D: KULLANILAN ANTİKORLAR

Tablo 6.4. Tez çalışması kapsamında immunoblotlama yönteminde kullanılan antikorlar ve kitlerin listesi.

ÜRÜN ADI		FİRMA ADI
Wnt Signaling Antibody	2915	Cell Signaling Technology
Sampler Kit		

EK E: KULLANILAN KİTLER

Tablo 6.4. Tez çalışması kapsamında kullanılan enflamasyon proteinleri izolasyonu kiti

PathScan İnflammation Multi-Target Sandwich elisa kit	7276	Cell Signalling technology
---	------	----------------------------

EK F: ÇÖZELTİLER

Tablo 6.5. 10 X Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), (pH 7,4)

1 L için;	
Sodyum Klorür (NaCl)	80,0 gr
Potasyum klorür (KCl)	2,0 gr
Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	14,4 gr
Mono potasyum fosfat (KH ₂ PO ₄)	2,4 gr
Distile su (dH ₂ O)	1000 ml

Kimyasallar 800 ml distile suyun içinde belirtilen miktarlarda çözülerek Ph 7,4'e ayarlanır. Daha sonra çözelti hacmi distile su kullanılarak 1 L'ye tamamlanır ve çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1 X olarak kullanılır.

Tablo 6.6. Hücre Dondurma Medyası

10 ml için;	
Fetal Sığır Serummu (FBS)	9 ml
Dimetil sülfoksit (DMSO, (CH ₃) ₂ SO)	1 ml

Hücre kültürüne uygun DMSO kullanılarak hazırlanan medya 0,22 ml'lik filtre kullanılarak süzülür ve -20 °C'de muhafaza edilir. Dondurulan hücreler sıvı azot içerisinde uzun süreli olarak saklanır.

Tablo 6.7. Hücre Lizis Tamponu (CLB)

10 ml için;	
M-PER™ Mammalian protein extraction reagent	10 ml
Roche® PhosTOP fosfataz inhibitör kokteyli	1 tablet
Roche® proteaz inhibitör kokteyli	1 tablet

Hazırlanan CLB +4 °C'de muhafaza edilir.

% 70 Etanol: 100 ml

70 ml saf etanol ile 30 ml distile su karıştırılarak hazırlanır.

Yağsız süt tozu (% 5): 50 ml

2,5 g süt tozunun üzerine 50 ml olacak şekilde TBS-T ile tamamlanır.

0,5 M Tris-HCl (pH 6.8): 100 ml

60 ml distile suda 6 g'lık Tris bazını çözüldükten sonra pH'sı 6.8'e ayarlanır. Daha sonrasında distile su ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanır ve steril olarak saklanır.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 150 ml

80 ml distile su içerisinde 27,23 g Tris bazı çözüldükten sonra pH'sı 8,8'e ayarlanır, üzerine 150 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır. Daha sonra otoklava atılır steril olarak saklanır.

10X TBS Hazırlanışı

86,6 g NaCl, 12,11 g Tris-Baz konulur pH: 8 e ayarlandıktan sonra üzerine 1000 ml olacak şekilde distile suyla tamamlanır.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı: Şule KAYA

İletişim Bilgileri:

Adres: Bahçelievler mah. Nurettin paşa sok. No:32/4 Bahçelievler/İSTANBUL

Telefon: 05326941303

E-posta: sulesuates@hotmail.com

Doğum Tarihi: 24.10.1971

Ünvanı: Öğrenci

Öğrenim Durumu:

DERECE	ALAN	ÜNİVERSİTE	YIL
Lisans	Matematik	İstanbul üniversitesi	1991-2002
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Istanbul Kültür Üniversitesi	2011-2015
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Istanbul Kültür Üniversitesi	2016-2019

Katıldığı Kongreler/Seminerler

2012	International Polyamine Congress “Polyamines: Biological and Clinical Perspectives” 2-7 Eylül 2012, Istanbul-Türkiye
2013	Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects, Bilimsel Toplantı MOBİGEN, Harvard Üniversitesi ve Massachusetts Institute of Technology (MIT) İşbirliği

2013	Prof. Dr. Mirel Dizdaroğlu, DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi, MOBİGEN DNA OKULU, 16-18 Nisan 2013
2014	2nd Meeting on Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges and Future Prospects, 19-20 Aralık 2014, İstanbul-Türkiye
2015	Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar”, 18 Aralık 2015, İstanbul Kültür Üniversitesi, İstanbul-Türkiye
2017	Marmara Üniversitesi 6. Kök Hücre Sempozyumu

