

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BÖBREK KANSERİ HÜCRE HATTINDA BETÜLİNİK
ASİDİN APOPTOZ İLİŞKİLİ GENLERİN
EKSPRESYONLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

MERVE NUR ATAŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. H. ARZU ERGEN

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2019

TEZ ONAYI

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Yüksek Lisans öğrencisi **Merve Nur ATAŞ**'ın tarafından **Prof. Dr. H. Arzu ERGEN**'in danışmanlığında hazırlanan **"Böbrek Kanseri Hücre Hattında Betülinik Asidin Apoptoz İlişkili Genlerin Ekspresyonları Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi"** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 15/05/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Bediye ÇAKMAKOĞLU
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

(Danışman)
Prof. Dr. Arzu ERGEN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Elif Şenem İPLİK
İ.Ü. İST. Yeni Yüzyıl Üni. Ecz. Fak.
Farmasönik Mikrobiyoloji A.D.

Jüri

Prof. Dr. Ebru İsk EMEKLİ
ALTURFAN
Marmara Üni. Dış. Hekimliği Fak.
Temel Tıp Bil. Böl.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Merve Nur ATAŞ

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmamı her türlü desteğiyle yapmamı sağlayan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım, hocam sayın Prof. Dr. Arzu Ergen'e , Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim dalı Başkanı sayın Prof. Dr. İlhan Yaylın'a ,

Bu süreçte desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Bedia Çakmakoglu ve Dr. Öğr. Üyesi Elif Sinem İplik'e,

Moleküler tıp çatısı altına girdiğimden itibaren her aşamada her koşulda bana destek olan arkadaşım Dilara Sönmez ve Arezoo Gheybi'ye, çalışma arkadaşım Hande Karagedik' e,

Tez çalışmamın her aşamasına bana verdikleri destek için ekip arkadaşlarım Arş. Gör. Barış Ertuğrul ve Göksu Kaşarcı'ya teşekkür ederim.

Her zaman ve her koşulda yanımda olan dostlarım Merve Köksoy ve Tuğba Demicioğlu'na,

Bu tez çalışmam da dahil olmak üzere tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve bana inanan aileme; eğitim ve öğretim hayatı boyunca bana örnek olmuş olan ablam Zeynep Atas'a, abim Sinan Atas'a ve her koşulda arkamda olduklarını bildiğim annem Şencan Atas ve babam Yahya Kemal Atas'a yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31565

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ.....	8
ŞEKİLLER LİSTESİ	9
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	10
ÖZET	12
ABSTRACT	13
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	14
2. GENEL BİLGİLER	15
2.1. Böbrek Kanseri	15
2.1.1. Böbrek Kanseri Türleri	15
2.1.2. Epidemiyoloji.....	17
2.1.3. Risk Faktörleri	18
2.1.4. Böbrek Kanserinde Genetik Değişimler	19
2.2. Kanser ve Apoptoz İlişkisi.....	22
2.2.1. AKT Geni.....	29
2.2.2. mTOR Geni.....	32
2.2.3. Renal Kanserlerde Apoptoz ile İlgili Çalışmalar	35
2.3. Doğal Antikanser İlaçlar	36
2.3.1. Triterpenoidler	37
2.3.1.1. Betülinik Asit	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	41
3.2. Kullanılan Cihazlar	41
3.3. Hücre Hatları.....	42
3.4. Hücre Hatlarının Yerleştirilmesi.....	42
3.5. Hücrelerin Altkültürleme İşlemi	42

3.6. Hücrelerin Dondurularak Saklanması.....	43
3.7. Betülinik Asit Hazırlanması.....	43
3.8. WST-1 Sitotoksosite Testi.....	43
3.8.1. Hücre Canlılığının Hesaplanması	44
3.9. Annexin V	44
3.10. Betülinik Asit Uygulanması.....	45
3.11. RNA İzolasyonu.....	45
3.12. cDNA Sentezi	47
3.13. Real-Time PCR (qPCR).....	48
3.14. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. WST-1 Sitotoksosite Testi Sonuçları.....	50
4.2. Annexin V Testi Sonuçları.....	51
4.3. Real-Time PCR Gen Ekspresyonu Analizi Sonuçları	53
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	61
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	74
ÖZGEÇMİŞ	75

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1: Renal karsinoma alt tipleri [17]	16
Tablo 2-2: Kalıtsal böbrek kanseri sendromları ve ilişkili olduğu genler [36].....	20
Tablo 3-1: RNA örneklerinin konsantrasyonları	46
Tablo 3-2: cDNA reaksiyon içerikleri	47
Tablo 3-3: cDNA reaksiyon süreleri.....	47
Tablo 3-4: Real-Time PCR reaksiyon içerikleri	48
Tablo 3-5: Real-Time PCR reaksiyon süreleri	48
Tablo 4-1: CAKİ-2 hücre hattında 25 µM ve 50 µM dozlarındaki betülinik asit uygulaması sonrası mTOR ve AKT-1 gen anlatımlarına ilişkin kat değişimleri	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: (A) Berrak hücreli RCC, (B) papiller RCC ve (C) kromofob RCC [23]	17
Şekil 2-2: Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün böbrek kanseri ile ilgili her yaştan ve cinsiyetten genel dağılım haritası [25].....	18
Şekil 2-3: Apoptoz mekanizmasında intrinsik ve ekstrinsik yollar[67].....	24
Şekil 2-4: Apoptozda mitokondri bağımlı intrinsik yolak mekanizması [78]	26
Şekil 2-5: Apoptoz mekanizmasında mitokondriyal ve ölüm reseptörü yolağı [83].....	28
Şekil 2-6: AKT yolağının düzenlediği mekanizmalar [94]	31
Şekil 2-7: AKT-1 geni kromozomal lokasyonu [95]	31
Şekil 2-8: mTOR geni kromozomal lokasyonu[102]	32
Şekil 2-9: mTORC1 ve mTORC2 kompleksleri [106].....	33
Şekil 2-10: PI3K/AKT/mTOR yolağı [113]	34
Şekil 2-11: Betülinik asitin kimyasal yapısı [134]	38
Şekil 2-12: Betülinik asitin antitümör etkileri [135].....	39
Şekil 4-1: CAKİ-2 hücre hattında hücre canlılığı grafiği	50
Şekil 4-2: MRC-5 hücre hattında hücre canlılığı grafiği	51
Şekil 4-4: CAKİ-2 hücre hattında Annexin V apoptoz tayini hücre ölümü grafiği.....	52
Şekil 4-3: MRC-5 hücre hattında Annexin V apoptoz tayini hücre ölümü grafiği.....	52
Şekil 4-5: AKT-1 geni Real-Time PCR amplifikasyon grafiği	53
Şekil 4-6: mTOR geni Real-Time PCR amplifikasyon grafiği.....	53
Şekil 4-7: CAKİ-2 hücre hattında betülinik asit uygulamaları sonrası mTOR ve AKT-1 gen anlatımlarına ilişkin kat değişimlerinin grafiksel gösterimi	55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AKT: Protein Kinaz B
 mTOR : Mechanistic Target of Rapamycin
 mTORC1/2 : Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1/2
 PI3K: Fosfotidilinositol-3 Kinaz
 RCC: Renal Hücreli Karsinoma
 ccRCC: Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinoma
 chRCC: Kromofob Renal Hücreli Karsinoma
 PRCC: Papiller Renal Hücreli Karsinoma
 WHO: Dünya Sağlık Örgütü
 ASR: Yaşa Standardize Oran
 DNA: Deoksiribonükleik Asit
 RNA: Ribonükleik Asit
 BMI: Vücut Kitle İndeksi
 HIF: Hipoksi İndükleyici Faktör
 VHL: Von-Hippel Landau
 VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
 TGF- α : Transforme Edici Büyüme Faktörü
 HGF : Hepatosit Büyüme Faktörü
 FLCN: Follikülin
 FNIP1/2: Follikülin Etkileşim Proteini 1/2
 AMPK: AMP- Aktive Edici Protein Kinaz
 FH: Fumarat Hidrataz
 TSC: Tuberous Sclerosis Complex
 AIDS : Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
 CDK: Siklin Bağımlı Kinaz
 Rb: Retinoblastoma
 AIF : Apoptoz İndükleyici Faktör
 MOMP: Dış Mitokodri Membranı Permeabilizasyonu
 MPTP: Mitokondriyal Permeabilite Transisyon Porları

ATP: Adenozin Trifosfat

Apaf-1: Apoptotik Proteaz Aktive eden Protein-1

IAP: Apoptoz İnhibitör Protein

BCL-2 : B-cell Lymphoma-2

DR: Ölüm Reseptörü

TNF: Tümör Nekroz Faktörü

TRAIL: TNF-İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand

DD: Ölüm Domaini

DED: Ölüm Efektör Domaini

DISC: Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi

CAD: Kaspaz Aktive Edici DNaz

İCAD: Kaspaz Aktive Edici DNaz İnhibitörü

PDK1: 3-fosfotidilinositol bağımlı Kinaz 1

PIP₂ : Fosfotidilinositol 3,4 Bifosfat

PIP₃ : Fosfotidilinositol 3,4,5 Trifosfat

PH: Pleckstrin Homoloji

PTEN: Fosfataz ve Tensin Homoloğu

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

EGFR: Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü

PIKK: PI3K ilişkili Kinaz

Rheb: Beyinde Zenginleştirilmiş Ras Homoloğu

SGK: Serum Glikokortikoid Düzenleyici Kinaz

IGFR: İnsülin benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü

HER-2: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

siRNA : Small İnterfering RNA

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

STAT3: Signal Transducer and Activator Transcription 3

EMT: Epidermal Mezenkimal Geçiş

NF- κ B: Nuklear Faktör Kappa B

cDNA: Komplementer DNA

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

Ataş, M.N. (2019). Böbrek Kanseri Hücre Hattında Betülinik Asidin Apoptoz İlişkili Genlerin Ekspresyonları Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp AD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Böbrek kanseri, dünya genelinde en sık rastlanan on dördüncü kanser türüdür. Böbrek kanserinin en yaygın türü, son yıllarda insidansı giderek artmakta olan renal karsinomadır. Çevresel faktörlerin yanı sıra genlerin ekspresyonundaki ve/veya bağlı oldukları yolaklardaki aktivitelerinin artması hücrelerin kanserleşmesine neden olmaktadır. AKT-1 ve mTOR genleri hücre büyümesi, proliferasyonu, sağkalımını teşvik edip, hücresel homeostazide görevlidir ve çeşitli yollarla apoptozu baskılama özellikleri vardır. Kanser hücrelerinde apoptozu yeniden aktivite etmek veya proliferasyonu azaltmak için çeşitli bitkisel komponentler kullanılmaktadır.

Bu komponentlerden biri olan betülinik asit, çeşitli bitkilerden elde edilen lupan tipi bir pentasiklik triterpenoiddir. Normal hücrelere karşı toksik etkisi olmamasına karşın kanser hücrelerine uygulandığında apoptozu teşvik ettiği bilinmektedir. Bu etkisi, betülinik asite potansiyel bir antikanser ilaç olma özelliği kazandırmıştır.

Bu çalışmamızda, betülinik asitin gen ekspresyonu düzeyinde apoptotik etkisinin araştırılması için böbrek kanseri hücre hattı CAKİ-2 ve sağlıklı hücre hattı MRC-5 kullanılmıştır. Betülinik asitin toksik etkisini belirlemek için öncelikle WST-1 testi yapılmış ve apoptoz tayini için Annexin-V testi yapılmıştır. Gen düzeyinde etkinin ölçülmesi için, Real-Time PCR yöntemi ile AKT-1 ve mTOR genlerinin ekspresyon analizi yapılmıştır.

Çalışma sonucunda, Annexin-V analizi ile betülinik asitin böbrek kanseri hücre hattı üzerinde apoptotik etkinliği olduğu saptanmıştır. Gen ekspresyon analizlerinde doz artışına bağlı olarak mTOR gen anlatımı düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenirken, AKT-1 gen anlatımında az da olsa bir azalma olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür. Ayrıca betülinik asitin böbrek kanseri hücre hattında apoptotik etkinliği göstermesi ve sağlıklı hücre hattında ise toksik etki göstermemiş olması, betülinik asitin potansiyel bir antikanser ilaç olma özelliğini koruduğunu ve gelecek çalışmalar için umut verici olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Betülinik asit, böbrek kanseri, apoptoz, AKT-1, mTOR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31565

ABSTRACT

Atas, M.N. (2019). Investigation of The Effect of Betulinic Acid on Expression of Apoptosis-Associated Genes In Kidney Cancer Cell Line. İstanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute for Experimental Medicine Research, Department of Molecular Medicine. Master Thesis. İstanbul.

Kidney cancer is the fourteenth most frequent cancer in the world. With its increasing incidence in the last few years, the renal cell carcinoma is the most common kidney cancer type. Apart from the environmental factors, increasing activities of expressions of genes and/or their pathways make cells become cancerous. AKT-1 and mTOR promote cell growth, proliferation and survival, participate in cellular homeostasis and have ability to suppress apoptosis in various ways. Herbal components are being used to reactivate apoptosis or suppress proliferation in cancer cells.

One of the components is betulinic acid which is a lupane-type pentacyclic triterpenoid is derived from various plants. It is known that betulinic acid promotes apoptosis in cancer cells along with no toxic effect in normal cells. This effect makes betulinic acid a potential anti-cancer drug.

In this study, kidney cancer cell line CAKI-2 and normal cell line MRC-5 are used to research the apoptotic effect of betulinic acid in gene expression level. In order to identify the toxic effect of betulinic acid, WST-1 and to detect apoptosis Annexin-V were conducted. Expression analysis of AKT-1 and mTOR genes were conducted with Real-Time PCR to measure the effect of betulinic acid in gene level.

As a result of this study, the apoptotic activity of betulinic acid on kidney cancer cell line was detected with Annexin-V. In gene expression analysis, a significant increase in mTOR gene expression levels was observed due to dose dependent, a small amount of decrement was observed in AKT-1 expression levels however the change is not statistically meaningful. Betulinic acid is a potential anti-cancer drug with its apoptotic effect on kidney cancer cell line and non-toxic effect on normal cell line and promising for future studies.

Key Words: betulinic acid, kidney cancer, apoptosis, AKT-1, mTOR

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 31565

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Böbrek kanseri, tüm yetişkin malign tümörlerin yaklaşık %2-3'ünü oluşturur [1]. Yetişkinlerde ortaya çıkan böbrek kanseri renal parenkim ve renal pelvisten köken alan malign tümörlerden oluşur [2]. Heterojen bir tümör yapısına sahip olmakla birlikte bu kanserler genellikle böbrek kanserinin en yaygın türü olan renal hücreli karsinoma olarak ortaya çıkar [3]. Renal hücreli karsinomlar arasında en sık rastlanan alt tipi hastaların %65-70'inde ortaya çıkan berrak hücreli renal karsinomadır [4]. Spesifik olarak renal hücreli karsinoma türlerinde ortaya çıkan genetik değişimlerin ve sigara, alkol kullanımı, hipertansiyon ve obezite gibi çevresel faktörlerin birleşimi renal hücreli karsinoma risklerini arttırmaktadır [2]. Bu faktörlere bağlı olarak renal hücreli karsinoma insidansının sürekli olarak artması göz önünde bulundurulduğunda teşhis sonrası hastaların yaşam kalitesini ve daha önemlisi sağkalım oranını arttırmak için yeni tedavi seçenekleri oluşturmak son derece önemli hale gelmiştir.

Son yıllarda yeni tedavi seçenekleri arayışında doğal olarak bulunan, bitkilerden elde edilen bileşiklere olan ilgi artmıştır. Çeşitli bitkilerin kabuklarından elde edilen doğal bir birleşik olan betülinik asit, triterpenoidler grubunun bir üyesi olup birçok biyolojik aktivitesi bulunur [5]. Bu biyolojik aktivitelerden biri çeşitli kanser türlerinde ortaya çıkarılan antikanser aktivitesidir [6]. Betülinik asidin, mitokondri bağımlı yolak vasıtasıyla apoptotik etki gösterdiği [7] bilinmesine rağmen farklı moleküller ve yolaklar üzerinde çalışılması, bilinen etkilerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

AKT-1 ve mTOR, normal hücrelerde bir çok hücrel süreçleri düzenleyen ve kanser hücrelerinde sıklıkla hiperaktivasyonu görülen PI3K/AKT/mTOR yolağının birer üyesidir. Kanser hücrelerinde hücre büyümesi, proliferasyon, anjiyogenez ve metastazı düzenlediği bilinmektedir [8].

Bu çalışmasının amacı, betülinik asidin böbrek kanserinin en yaygın türü olan berrak hücreli renal karsinomu üzerindeki apoptotik etkinliğini ve AKT-1 ve mTOR genlerindeki etkisini ekspresyon düzeyinde ölçmektir. PI3K/AKT-1/mTOR yolağı renal karsinoma ve başka diğer kanser türlerinde etkinliği bilinen bir yolaktır [9]. Berrak hücreli renal karsinoma hücre hattı üzerinde betülinik asitin apoptotik etkinliğinin ölçülmesi ve bunun yanı sıra PI3K/AKT-1/mTOR yolağının hedeflenmesi kanser tedavisi için önemli bir yaklaşım olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Kanseri

Böbrek kanseri, renal kanser olarak da bilinmekle birlikte birincil olarak böbrekten köken alan tüm malign tümörleri içerir [10]. Böbrek kanseri tek başına bir hastalık değildir, bir çok farklı moleküler ve genetik değişikliklere sahip heterojen bir kanser grubundan oluşur. Bu grup aynı zamanda farklı histolojik özellik ve klinik tablo gösterebilir. Bu nedenlerle, uygulanan tedavilere farklı şekillerde cevap verebilme yeteneğine sahip olabilirler [11, 12].

Böbrek kanserinin en yaygın türü, tüm vakaların %90'ında görülen ve böbreğin renal tübül epiteliyal hücrelerinde ortaya çıkan renal hücreli karsinoma (RCC; renal cell carcinoma) dır[3, 13]. Tüm renal hücreli karsinomlar arasında ise en sık görülen alt tip berrak hücreli renal hücreli karsinoma (ccRCC; clear cell renal cell carcinoma) dır [14].

Böbrek kanseri hastalarında görülen spesifik belirtiler idrarda kan, ağrı, ve renal kitledir. Ancak hastaların yaklaşık %40'ında kilo kaybı, karın ağrısı, ateş gibi sistematik belirtiler de ortaya çıkabilir [3]. Hastalığın spesifik erken tanı belirtilerinin bulunmaması durumunda RCC'ye, ancak hasta yüksek metastaz seviyesine sahip olduğunda tanı konulabilmektedir [10]. Bu nedenle görüntüleme tekniklerinin geliştirilmesi böbrek kanseri hastalarının erken teşhisi açısından önem teşkil eder. Bir çalışmada, hiçbir belirti göstermeyen 3001 bireyde görüntüleme teknikleri kullanılarak tetkikler yapılmış ve bireylerin %14'ünde 1cm'den büyük kitle tespit edilmiştir [15,16].

2.1.1. Böbrek Kanseri Türleri

Renal tümörler, birbirinden farklı histolojik ve moleküler yapıyı bir arada bulundurabilmelerinin yanı sıra farklı morfoloji gösterebilirler. Dünya Sağlık Örgütü (WHO;World Healty Organization)'nın 2016 yılında yayınladığı üriner sistem tümörlerinin sınıflandırılmasına göre, böbrek kanserinin en yaygın görülen türü renal hücreli karsinoma (RCC)'dır. RCC'nin sitoplazmik ve yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmasına ek olarak moleküler değişimlerden kaynaklanmasına ve tümörün yerleşim bölgesine göre sınıflandırılan alt tipleri bulunur. Bu alt tipler: Berrak hücreli papiller renal hücreli karsinoma (CPRCC: Clear Cell Papillary Renal Cell Carcinoma),

Süksinat dehidrojenaz eksik renal hücreli karsinoma (Succinate Dehidrogenase-deficient RCC), Tübülökistik RCC, RCC ilişkili edinilmiş kistik hastalığı (Acquired cystic disease-associated RCC), Kalıtsal leimyomatos ve RCC sendrom ilişkili RCC (Hereditary leimyomatos and RCC-associated RCC)'dir. Tümörün yerleşim bölgesine göre; Collecting duct RCC (Toplayıcı Kanal RCC) ve Renal medullary RCC (Renal medulla RCC) olarak sınıflandırılır. Bunlar dışında en yaygın görülen alt tipleri: sitoplazmik özelliklerine göre, berrak hücreli renal karsinoma (ccRCC) ve kromofob renal hücreli karsinoma (ChRCC) ve yapısal özelliğine göre papiller renal hücreli karsinoma (PRCC), dır [17]. (Tablo 2-1)

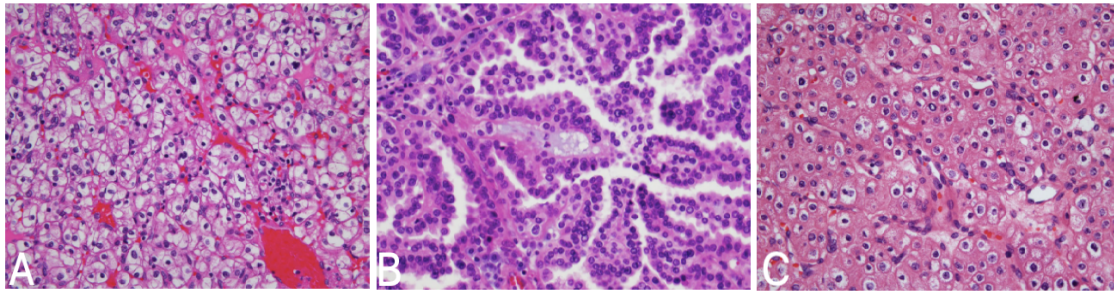
Tablo 2-1: Renal karsinoma alt tipleri [17]

Renal karsinoma yaygın alt tipleri	Berrak hücreli RCC
	Papiller RCC
	Kromofob RCC
Tümörün yerleşim bölgesine göre	Toplayıcı kanal RCC
	Renal medulla RCC
Diğer renal karsinoma alt tipleri	Berrak hücreli papiller RCC
	Süksinat dehidrojenaz eksikliği RCC
	Tübülökistik RCC
	Edinilmiş kistik hastalığı- ilişkili RCC
	Kalıtsal leimyomatos RCC

RCC teşhisi konulmuş yetişkinlerin %65-70'inin RCC'nin bir alt tipi olan berrak hücreli renal hücreli karsinomaya (ccRCC) sahip olduğu tespit edilmiştir. ccRCC belirgin bir vasküler ağ ile çevrelenmiş berrak bir sitoplazmaya sahip kümelenmiş hücrelerden oluşur [13]. Bu hücreler sitoplazmalarında yüksek oranda lipid ve glikojen biriktirdiğinden mikroskopik olarak sarı renkte görünürler. Bu nedenle morfolojik olarak "berrak hücre (clear cell)" ismini almışlardır [18]. ccRCC'ler diğer alt tiplere oranla daha agresif bir yapıya sahiptirler. ccRCC hastalarında çoğunlukla 3.kromozomda yer alan Von Hippel-Landau (VHL) geninde delesyon görülür [19].

RCC'nin ikinci en yaygın türü papiller renal hücreli karsinoma (pRCC) olup tüm RCC'lerin %10-20'sini bu alt tip oluşturur. Morfolojik olarak, fibröz bir psödokapsül ile sınırlandırılmış neoplastik hücrelerle çevrelenen, fibrovasküler merkeze sahip birbirinden ayırık papiller yapraklar şeklinde görülürler [20]. Kendi içerisinde tek katmanlı ve bazofilik sitoplazmaya sahip küçük hücrelerden oluşan tip 1 ve diğerine göre daha agresif karakterde olan, eozinofilik sitoplazmaya sahip hücrelerden oluşan tip 2 olmak üzere iki alt tipe ayrılırlar [21].

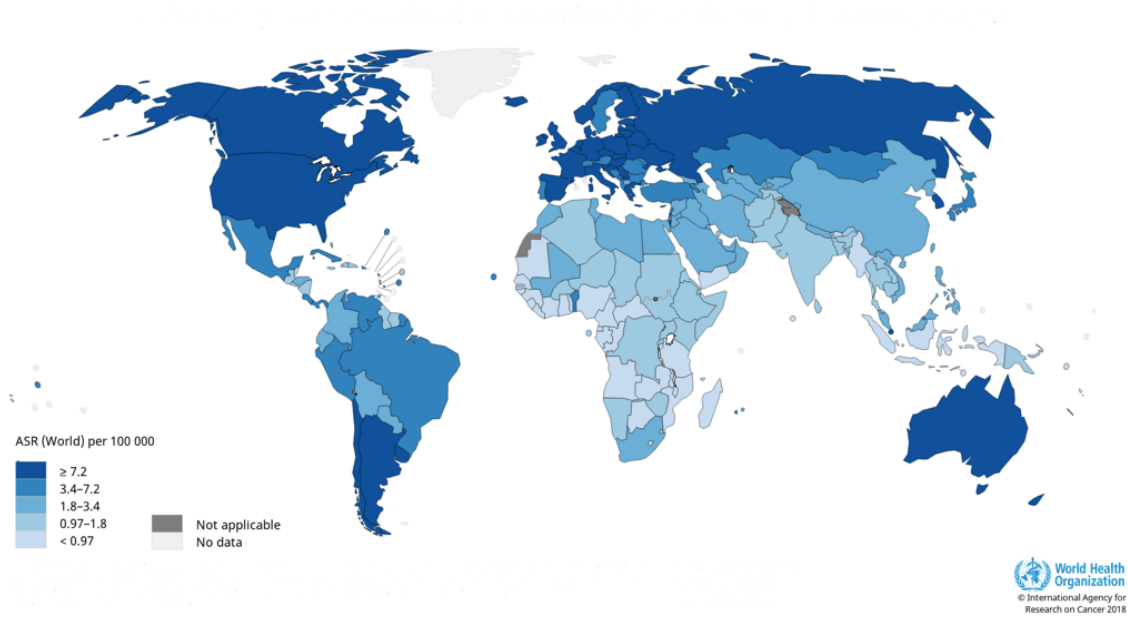
Kromofob renal hücreli karsinoma (chRCC) ise en yaygın üçüncü alt tip olup, RCC'lerin yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Histolojik olarak, belirgin bir hücre membranı, düzensiz bir nukleus ve eozinofilik granüler hücreler ile karakterize edilirler [4]. chRCC, diğer RCC alt tiplerine göre daha iyi bir prognoz gösterir ve Birt-Hogg-Dube sendromu ile ilişkili olarak ortaya çıkar [22]. (Şekil 2-1)



Şekil 2-1: (A) Berrak hücreli RCC, (B) papiller RCC ve (C) kromofob RCC [23]

2.1.2. Epidemiyoloji

Böbrek kanseri, tüm dünya genelinde görülen kanser türleri arasında ondördüncü sıradadır. Erkeklerde görülme sıklığı açısından dokuzuncu, kadınlarda ise ondördüncü kanser türüdür [24]. Böbrek kanserinin görülme sıklığının her yaştan ve her iki cinsiyet için dağılım haritası Şekil: 2-2' de gösterilmiştir.



Şekil 2-2: Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın böbrek kanseri ile ilgili her yaştan ve cinsiyetten genel dağılım haritası [25]

Belirli bir yaş grubu (0-74) için standardize edilmiş verilere (ASR: Age-standardized rate) göre; tüm dünyada her iki cinsiyet için de her 100.000 bireyden 11,7 görülme oranıyla Kuzey Amerika birinci sırada yer alırken Batı Avrupa 9,8 ve Avusturalya 9,2 ile üst sıralarda yer alır. Asya'da ise İsrail 10,0 ile birinci sırada, Kore Cumhuriyeti 8,0 ve Türkiye 5,6 ile sırasıyla ikinci ve üçüncü sıradadır [26].

2018 yılı kanser istatistiklerine göre, 403,262 yeni böbrek kanseri vakası tespit edilmiş ve bunların 175,098 'i ölümle sonuçlanmıştır [27].

2.1.3. Risk Faktörleri

Böbrek kanseri insidansı yıllar içerisinde giderek artmaktadır ve bu artışta bireylerin günlük yaşamı, beslenme alışkanlıkları, genetik yatkınlıklar gibi faktörler etkili olmaktadır. Sigara kullanımı, obezite ve fiziksel aktivite, alkol kullanımı, diyabet, hipertansiyon ve ilaç kullanımı böbrek kanserinin oluşum nedenleri arasındadır.

Sigara kullanımı, böbrek kanseri için en büyük risk faktörlerinden biridir. Hiç sigara içmeyen bireylerle kıyaslandığında, sigara içen bireylerin %52'si RCC oluşum riskine sahiptir[28]. Günlük sigara kullanım miktarına bağlı olarak bu oran artış göstermektedir. Erkeklerde böbrek kanseri hücrelerinin yaklaşık %24-32'si ve kadınlarda yaklaşık %9-16'sı sigara kullanımından kaynaklanmaktadır [29]. Yapılan bir çalışmada, kontrol grubu ile kıyaslandığında RCC hastalarının periferik kan

lenfositlerinde tütün ürünlerinde bol miktarda bulunan ve kuvvetli bir kanserojen olan N-nitrozamin maddesinin indüklediği DNA hasarı seviyesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur [2, 30].

Obezite ve fazla kilonun böbrek kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir. Bu doğrultuda, vücut kitle indeksinin (BMI: Body Mass Index) 30 kg/m^2 'den fazla olması ve BMI'nin her 5 kg/m^2 artışı böbrek kanseri riskinin %20-35 oranında artmasına neden olmaktadır [31]. Obez bir bireyde RCC gelişimini etkileyebilecek çeşitli mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. Bunlar kronik doku hipoksisi, insülin direnci, adipokin üretimi, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres olarak sıralanabilir [2].

Bir çok çalışma hipertansiyonun RCC için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir[32, 33]. Hipertansiyon ile birlikte görülen kronik renal hipoksinin, hipoksi indüklenebilir faktör (HIF: Hypoxia Inducible Factor) olarak bilinen bir transkripsiyon faktörü ile birlikte kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve anjiyogenezini indüklediğine ilişkin kanıtlar vardır. Ayrıca, yüksek kan basıncının kontrol altına alınmasıyla RCC riskinin de azaldığı görülmüştür [34].

Diyabet, obezite ve hipertansiyon ile ilişkili bir risk faktörüdür. Yapılan bir çalışmada, 95'i diyabetli 301 RCC hastasından, diyabetli olanların %51'inde ve diyabetli olmayanların ise %35'inde tümör boyutunun 7cm'den büyük olduğu görülmüştür. Bu bulgular, diyabetin RCC gelişiminde önemli bir faktör olduğunu göstermektedir [35].

2.1.4. Böbrek Kanseri Genetik Değişimler

Bir çok kanser türünün gelişiminde tümör baskılayıcı genlerin mutasyonunun, onkogenlerin aktivasyonunun ve DNA'da meydana gelen diğer bir takım yapısal ve işlevsel anormalliklerin etkili olduğu bilinmektedir.

Böbrek kanseri gelişimi ailesel, herediter (kalıtsal) ya da sporadik (çevresel veya yaşa bağlı) olabilmektedir. Aile bireylerinde böbrek kanserinin sıklıkla görülmesi ailesel yatkınlık kategorisinde sınıflandırılır. İlerleyen yaşlarda ve risk faktörlerinin etkisi altında görülen böbrek kanseri tipi sporadiktir. Kalıtsal böbrek kanseri sendromları ise genellikle spesifik bir gen mutasyonu ve spesifik bir böbrek karsinomu ile ilişkilidir ve tüm böbrek kanseri vakalarının %5-8'ini oluşturur. Kalıtsal renal

karsinomların çoğu otozomal dominanttır ve sporadik tümörlere göre daha erken yaşlarda oluşur [36].

Tablo 2-2: Kalıtsal böbrek kanseri sendromları ve ilişkili olduğu genler [36]

Kalıtsal Böbrek Kanseri Sendromları	İlişkili Olduğu Genler
Von Hippel-Landau	VHL
Hereditary papillary RCC	MET
Birt-Hogg-Dube	FLCN
Hereditary leiomyomatosis and RCC	FH
Tuberous sclerosis complex	TSC1, TSC2

Von Hippel-Lindau sendromu, merkezi sinir sistemi, retinal hemanjiyoblastoma, pankreatik nöroendokrin tümörler ve ccRCC'nin de dahil olduğu bir çok kanser türü ile ilişkili olan herediter, otozomal dominant, neoplastik bir hastalıktır [37]. Bu hastalık 3.kromozomda (3p25.3) lokalize VHL geninin tümör baskılayıcı fonksiyonunu kaybetmesiyle meydana gelir [37]. ccRCC'de kalıtsal olarak VHL sendromuna sahip hastalar VHL geninin inaktive edilmiş tek kopyalarını alırlar. Bu tip oluşumda tümöröenez için tek vuruşlu model gösterir. Sporadik ccRCC'de ise VHL inaktivasyonu, VHL'nin iki aktif kopyasının da değiştiği tümöröenez için çift vuruş modeli geçerlidir [38, 39].

VHL tümör baskılayıcı geni ürünü olan VHL proteini (pVHL), hipoksi indüklenbilir faktör (HIF)'ün α alt biriminin (HIF- α), oksijen bağımlı ubiquitin aracılı proteolitik degradasyonu için önemli olan, E3 ubiquitin ligaz kompleksinin önemli bir bileşenidir. pVHL'nin β -domaini doğrudan HIF'e bağlanır ve pVHL-E3 ubiquitin ligaz kompleksi sayesinde HIF, oksijen ve demir içeren hücrelerde hızlıca degrade olur. VHL genindeki bir fonksiyon kaybı HIF'in stabilizasyonuna ve bu yüzden yüksek HIF seviyelerinin tetiklediği, bir takım metastatik süreçlere katkı sağladığı bilinen VEGF, PDGF ve TGF- α gibi hedeflerin transkripsiyonunda artışa neden olur [38, 40].

Herediter papiller RCC, tip 1 papiller RCC olarak da bilinmekle birlikte, kromozom 7q31 de lokalize MET proto-onkogeninin mutasyonu sonucu ortaya çıkan ve

nadir görülen (10 milyonda 1) bir sendromdur [36, 41]. MET proto-onkogeni, bir reseptör tirozin kinaz olan MET proteinini kodlar. MET, hepatosit büyüme faktörü (HGF: Hepatocyte Growth Factor) tarafından aktive edilir ve MET-HGF sinyali, hücre proliferasyonu, epitelyal mezenşimal geçiş (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) ve bir çok dokuda hücre göçünün düzenlenmesi ve farklılaşmasında önemlidir. MET proto-onkogenindeki bir mutasyon, MET proteininin, HGF tarafından uyarıya gerek duymaksızın ligand bağımsız tirozin kinaz fonksiyonunu göstermesine neden olur ve bu durum hücre transformasyonuna ve tümör oluşumuna neden olur [42, 43].

Kalıtsal otozomal dominant bir hastalık olan Birt-Hogg-Dube (BHD) sendromu, kıl folikülü tümörünün (fibrofolliküloma), multipl akciğer kistlerinin ve böbrek tümörlerinin oluşumu ile karakterizedir[44]. Kromozom 17p11.2'de lokalize follikülün (FLCN) tümör baskılayıcı geninin kromozomal kaybı ve ya mutasyonu ile böbrek kanserlerinde görülen BHD ortaya çıkar. FLCN, fonksiyonel olarak FNIP1 VE FNIP2 proteinleri ile birlikte protein sentezi ve hücre büyümesinin ana kontrol merkezi olan mTOR (Mechanistic Target of Rapamycin)'un negatif düzenleyicisi olan AMPK (AMP-activated protein kinase) ile etkileşime girer. Yapılan bir çalışmada bir fare modelinde FLCN'nin böbrek hedefli inaktivasyonunun, AKT/mTOR yolagını aktivelediği görülmüştür [45, 46].

Hereditör leiomyomatosis RCC (HLRCC), kromozom 1q43'de lokalize Fumarat hidrataz (FH) genindeki germline mutasyonu sonucu ortaya çıkar. Tip 2 papiller RCC olarak da bilinir ve genellikle multiple kutanoz ve kadınlarda uterin leiomyomlar ve RCC oluşumu ile karakterizedir [47]. FH geni bir tümör baskılayıcı gen olup, Krebs siklusunda fumaratı malata dönüştüren enzim olan fumaraz enzimini kodlar. Normal şartlarda HIF, kendisinin ubiquitin aracılı tahribatına neden olan HIF prolil-hidroksilaz tarafından hidroksile edilir. Fumaraz eksikliği görülen hücrelerde biriken fumarat, HIF prolil-hidroksilazı inhibe eder ve bu durum HIF seviyelerinin yükselmesine neden olur [48].

Tuberous sclerosis complex (TSC), kromozom 9p34'te bulunan TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1) ve 16p13.3'de bulunan TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2) tümör baskılayıcı genlerinin inaktivasyonu sonucu deride, beyinde, akciğerlerde ve böbreklerde tümör benzeri lezyonlar şeklinde ortaya çıkan bir hastalıktır [49]. TSC1 ve TSC2 genleri sırasıyla hamartin ve tuberin proteinlerini kodlar. Bu iki

protein tümör baskılayıcı aktivitesi göstererek mTOR sinyal yolağının inhibisyonuna neden olur. TSC1 ve TSC2'nin inaktivasyonu mTOR sinyal yolağının iki fonksiyonel kompleksinden biri olan mTORC1 (Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1)'in aktivasyonuna yol açar. Bu durum hücrelerde protein translasyonu, hücre büyümesini arttırarak tümörigeneze yol açar [50, 51].

2.2. Kanser ve Apoptoz İlişkisi

Organizmalarda, doku ve organ homeostazının sürdürülebilmesi için hücre ölümü ve proliferasyonu arasında bir denge olması gerekir. Bu denge, hücre boyutunda hücre ölüm sinyalleri ve büyüme sinyalleri arasında sağlanan denge ile korunur. Büyüme ve ölüm arasındaki dengenin bozulması, AIDS gibi immün hücrelerin anormal erken ölümü ve nörodejeneratif hastalıklardan Alzheimer hastalığında olduğu gibi hücre ölümündeki artış ile veya anormal hücre proliferasyonu sonucu oluşan kanser gibi hastalıklar şeklinde ortaya çıkar [52, 53].

Yaşamın devamı için transforme olmamış hücrelerin doğası gereği belirli koşullar altında bölünerek yavru hücreler oluşturmaları gerekir. Bu durum hücre proliferasyonu olarak adlandırılır ve hücre döngüsü adı verilen kontrollü bir mekanizma ile gerçekleştirilir. Hücre döngüsü, hücre içeriğinin bir dizi reaksiyon sonucu iki katına çıkması ve sonunda bölünerek iki eş hücrenin oluşmasını kapsayan bir süreçtir. Bu süreç sıkı bir şekilde denetlenen dört fazdan oluşur [54]. G1 fazı hazırlık fazı olarak bilinir ve hücre metabolizma hızını artırır, gerekli proteinleri sentezler ve DNA sentezi için hazırlık yapar. S fazı sentez fazıdır ve bu fazda DNA replikasyonu gerçekleştirilir, G2 fazında hücre RNA ve protein sentezleyemeye devam eder ve bu fazın sonunda mitoz hazır hale gelir. M fazı, hücrenin mitoz bölünmeye girdiği fazdır, kromozomlar birbirinden ayrılır, sitoplazma bölünmesi gerçekleşir ve sonunda iki eş hücre oluşur[55, 56]. Bu fazlara ek olarak, hücreler herhangi bir bölünme uyarısı almadıkları sürece dinlenme fazı olarak bilinen G0 fazında beklerler.

Siklus süresinde bir fazdan diğerine geçişte hücreler belirli fazlarda bulunan kontrol noktalarında kontrol edilerek diğer faza geçiş yapıp yapamayacağına karar verilir. Hücre siklusunun kontrolü temel olarak siklin bağımlı kinazlar (CDK's: Cyclin-Dependent Kinases) tarafından gerçekleştirilir. CDK'lar birer serin-treonin protein kinazlar olup hedefledikleri substratları fosforilleyerek bir fazdan diğerine geçişi sağlarlar. CDK'lar siklinler adı verilen düzenleyici alt birimler ile kompleks

oluşturarak aktif hale geçerler. Siklin D/CDK4-6 ve siklin E/ CDK2 kompleksleri G1 fazında ilerlemeyi sağlarlar. Siklin A/CDK2 kompleksi S ve G2 fazlarında ilerlemeyi sağlarken siklin B/ CDK1 kompleksi ise mitozaya ilerlemeyi sağlar [57, 58].

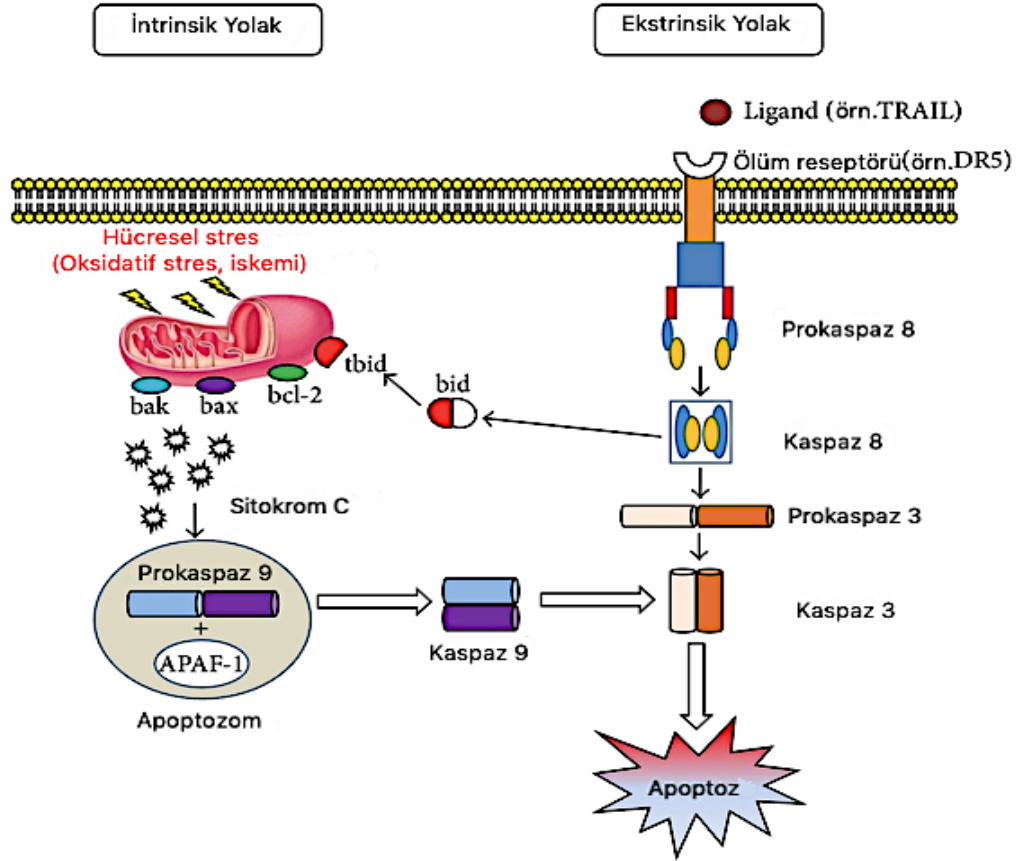
Hücreler sınırlama noktası (restriction point) veya R noktası denilen kontrol noktasında G0 fazında kalmanın veya geri dönüşümsüz olarak S fazına ilerlemenin kararını verirler. Bu noktada, DNA hasarı kontrol edilir ve DNA'nın hatasız bir şekilde replike olmasına olanak sağlanır. Dış mitojenik uyarılar, Ras GTPaz gibi sinyal iletim yollarını aktive eder. Ras aktivasyonu, transkripsiyon faktörleri ile siklin D'yi kodlayan genlerin ekspresyonlarını artırır. Siklin D, CDK4 veya CDK6 ile kompleks oluşturur ve bu durum retinoblastoma proteinini (Rb) fosforile edecek olan CDK4 veya CDK6'yı aktive eder. E2F olarak bilinen ve DNA'ya doğrudan bağlanan transkripsiyon faktörü, DNA replikasyonu ve S fazının devamlılığı için gerekli olan genlerin ekspresyonunu kontrol eder. Rb bir tümör baskılayıcı proteindir ve E2F'ye bağlandığında E2F'nin gen hedeflerinin transkripsiyonlarını baskılar. Rb'nin siklin D/CDK4 veya CDK6 kompleksi tarafından fosforillenmesi ile E2F serbest kalır. Aktifleşen E2F, daha sonra CDK2'ye bağlanıp Rb'yi fosforilleyecek olan siklin E'nin transkripsiyonunu artırır. Böylece hücre G1 fazından S fazına ilerler [59–61].

p53, DNA hasarı, onkogen aktivasyonu ve bir çok hücrel stres etkeni ile yüksek oranda aktive olan ve tümör baskılayıcı fonksiyonu bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. DNA'da herhangi bir hasar meydana geldiğinde p53, p21'in promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonunu artırır. Yüksek oranda eksprese olan p21, siklin E/CDK-2 veya CDK6 kompleksine bağlanarak hücre siklusunu G1 fazında durdurur. p21'in bu inhibisyonu Rb'nin fosforilasyonunu engelleyeceği için DNA replikasyonu ve S fazına ilerlemede etkin rol oynayan E2F'ye bağlı durumda kalmasına neden olur [62].

Doku düzeyinde hücre ölümü ve proliferasyonu arasındaki denge apoptoz denilen enerji bağımlı biyokimyasal bir mekanizma olan programlı hücre ölümü ile sağlanır. Apoptoz; büyüme, gelişme veya hücrenin yaşamı sırasında oluşan DNA hasarı ve herhangi bir zararlı ajan etkisiyle hasar görmüş hücrelerde, çeşitli mekanizma ve yollarla meydana gelen normal bir süreçtir [63]. Bu süreçte hücre boyutunda bir takım morfolojik ve biyokimyasal değişimler ortaya çıkar. Apoptoz sırasında hücrelerde morfolojik olarak; nükleusta kromatin yoğunlaşması, nüklear fragmentasyon, hücre haciminin azalması, ve hücre membranında bleb oluşumu gibi değişimler meydana gelir.

Biyokimyasal değişimler ise, protein degradasyonu veya modifikasyonu, DNA ve kromatin bozunması şeklinde gerçekleşir. Bu değişimler bir takım moleküler mekanizmalar sayesinde oluşur ve apoptotik süreç sona erene kadar devam eder [64, 65].

Apoptoz mekanizmasında, intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) adı verilen iki önemli moleküler yolak etkilidir. İntrinsik yolak, mitokondriyal yolak olarak bilinir ve hücre içerisinde meydana gelen DNA hasarı veya hücrel strese cevap olarak aktive olurken, ekstrinsik yolak ise ölüm ligandlarının hücre membranında bulunan ölüm reseptörlerine bağlanması sonucu aktive olur (Şekil2-3). Bu yollar aktive olabilmeleri için birbirlerinden farklı hücrel uyarılara ihtiyaç duysa da her iki yolak da sonunda kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır [66].



Şekil 2-3: Apoptoz mekanizmasında intrinsik ve ekstrinsik yollar[67]

Programlı hücre ölümünde, bir çok mekanizma etkin olsa da temelde kaspazlar (Caspase: Cyteinyl, aspartate-specific protease) olarak bilinen proteazlar tarafından gerçekleştirilir. Bu proteazların hedefleri, hücre için hayati önem teşkil eden proteinler, kinazlar, hücre iskeleti proteinleri ve transkripsiyon faktörleri olabilir. Kaspazlar, bu

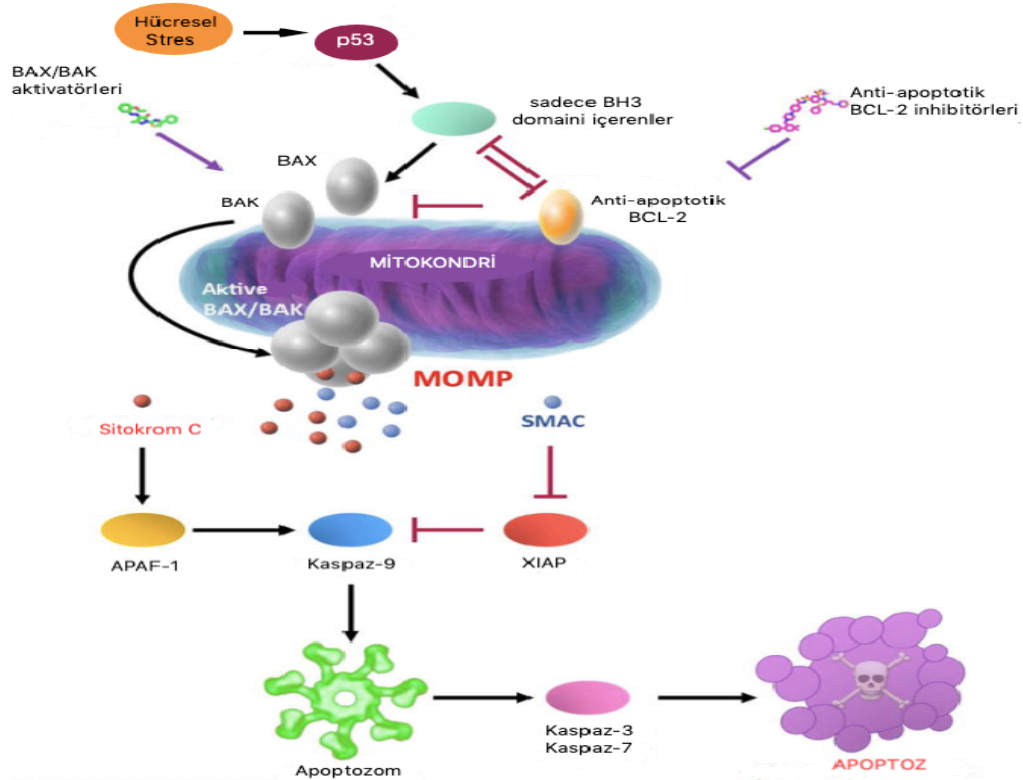
substratlarını spesifik aspartat kalıntılarında parçalayarak fonksiyon gösterirler [66], [68]. Kaspazlar fonksiyonel olarak başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2,8,9 ve 10) ve efektör kaspazlar (kaspaz 3,6 ve 7) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Başlatıcı kaspazlar, işlevsel bir rol oynayan 90 aminoasitten fazla N-terminal prodomain kısmı içerirken, efektör kaspazlar, prodomain kısımlarında 20-30 aminoasit kalıntısı bulundurur [69]. Tüm kaspazlar hücre içinde inaktif zimojenler olarak sentezlenir ve aktive olabilmeleri için proteolitik yıkıma uğramaları gerekir [70].

Kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün etkili olduğu intrinsik yolak, mitokondri aracılı bir yoldur ve DNA hasarı, oksidatif stres, hipoksi, kemoterapötik ilaçlar etkisiyle aktive olur[71]. Mitokondri membranlar arası boşlukta hücre ölümünü tetikleyen, Sitokrom C, apoptoz indükleyici faktör (AIF), Omi/HtrA2, Endonükleaz G ve Smac/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct IAP-binding Protein with Low PI), gibi proteinler bulunur [72]. Herhangi bir apoptotik uyarı, dış mitokondri membranının permeabilizasyonuna (MOMP: mitokondrial outer membrane permeabilization) ve mitokondriyal permeabilite transisyon porlarının (MPTP) açılmasına neden olur ve böylece membranlar arasındaki boşlukta bulunan pro-apoptotik proteinler ve Sitokrom C sitozole salınır. Sitozole salınan sitokrom C, Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), dATP, Sitokrom C ve pro-kaspaz 9'dan oluşan apoptozom kompleksinin oluşumunu indükler. Bu kompleksin oluşumu, pro-kaspaz 9'u aktive ederek kaspaz 9'a dönüştürür. Aktive olan kaspaz 9, efektör kaspazlar olan kaspaz 3 ve 7 yi aktive eder. Kaspazların ve Sitokrom C'nin aktivitesini düzenleyen apoptoz inhibitör protein (IAP) adı verilen protein ailesi, aktive olmuş kaspazlara bağlanarak inaktive ederler. IAP'ın aktivitesi ise mitokondriyal proteinler olan Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 tarafından düzenlenir [73].

İntrinsik apoptoz yolağı BCL-2 (B-cell lymphoma-2) adı verilen, pro-apoptotik ve anti-apoptotik fonksiyonları bulunan protein ailesi tarafından düzenlenir. Bu protein ailesi üç alt gruba ayrılır. Anti-apoptotik birinci grup BCL-2, BCL-xL, MCL-1, A1, BCL-B ve BCL-w proteinlerini içerir. Bu proteinler dört BCL-2 homoloji domaini (BH1, BH2, BH3 ve BH4) içerirler. Pro-apoptotik ikinci grup BAX, BAK ve BOK proteinlerini içerir ve BH4 domaini bulunmaz. Pro-apoptotik üçüncü grup sadece BH3 domainini içerir ve BİK, HRK, BİM, BAD, BID, PUMA, NOXA ve BMF proteinlerinden oluşur [74]. Anti-apoptotik BCL-2 proteinleri, pro-apoptotik BCL-2

proteinlerinden BAX ve BAK'ı inhibe ederek apoptozu baskılar. Anti-apoptotik proteinlerin aktivitesi ise sadece BH3 domaini içeren pro-apoptotik proteinler tarafından baskılanır. Apoptotik uyaran geldiğinde sadece BH3 domaini içeren proteinlerden BAX ve BAK'ın aktivasyonuna yol açar. BAX ve BAK aktive olduktan sonra dış mitokondri membranının permeabilizasyonuna (MOMP) yol açar. BAX, bir tümör baskılayıcı gen olan p53 tarafından düzenlenir [75].

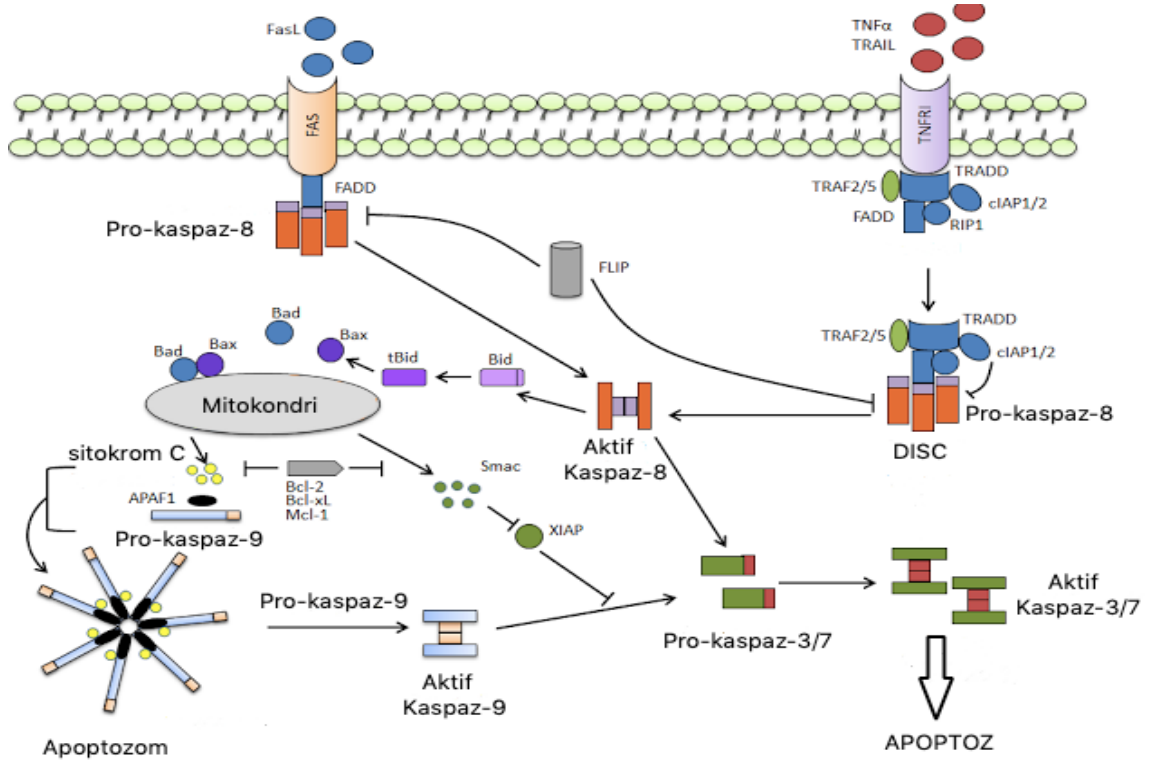
Hücrel stresin aktifleştirdiği p53, apoptozda BCL-2 ailesi proteinlerinin aktivasyonu veya inhibisyonu ile MOMP'a yol açarak işlev görür. p53, nükleusa hareket ederek pro-apoptotik proteinler olan PUMA, BAX, BAK, NOXA ve BID gibi proteinlerin transkripsiyonunu düzenler. BID ve BIM doğrudan etkileşim ile BAX ve BAK'ın oligomerizasyonunu sağlar. BAD, doğrudan BCL-xL-BID kompleksine bağlanarak BAX'ı aktive edecek olan BID'in serbest kalmasını sağlar. Buna ek olarak p53, BAX ve BAK'ın heterodimer kompleks oluşturup aktifleşmesini engelleyen BCL-2 ve BCL-xL'ı inhibe eder. Böylece BAX ve BAK, dış mitokondri membranında, apoptotik başlatıcıların sitozole salınmasını sağlayan porların oluşumunu sağlar (Şekil 2-4) [76, 77].



Şekil 2-4: Apoptozda mitokondri bağımlı intrinsik yolak mekanizması [78]

Apoptoz mekanizmasında etkin diğer bir yolak ise ekstrinsik yolaktır. Bu yolakta, hücre membranında bulunan bir ölüm reseptörü (DR: Death Receptor) ve bu reseptöre bağlanıp apoptoz mekanizmasını başlatacak olan ölüm ligandları işlev görür. Ekstrinsik yolakta görev alan ölüm reseptörleri Tümör Nekroz Faktörü (TNF: Tumor Necrosis Factor) reseptörü geni süper ailesi üyeleridir. Bu reseptörler; TNFR1(Tumor Necrosis Factor Receptor type 1), FasR (Fas Receptor) ve TRAIL-R1/2 (DR4, DR5) (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1/2) 'dir. Bu reseptörlere bağlanan spesifik ligandları ise sırasıyla : TNF α (Tumor Necrosis Factor α) , FasL (Fas Ligand) ve TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand)'dır. Ölüm reseptörleri benzer ekstrasellüler domain, ölüm domaini (DD: death domain) ve ölüm efektör domaini (DED: death effector domain) adı verilen sitoplazmik domain içerirler [79, 80].

Ölüm ligandları DR'lere bağlandıklarında doğrudan kaspaz aktivasyonunu başlatarak apoptozu indüklerler. FasL, TRAIL veya TNFR ligandları bağlandığında bunların sitozolik DD molekülleri FADD ve TRADD, pro-kaspaz 8'e bağlanarak ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC: Death Inducing Signaling Complex) adı verilen kompleksi oluşturur. Pro-kaspaz 8, bu bağlanmanın ardından proteolitik kesime uğrayarak aktif hali olan kaspaz 8' e dönüşür. Kaspaz 8' ya doğrudan kaspaz 3 ve 7'yi aktifleştirir yada BID'in proteolitik olarak ayrılmasını sağlayarak BAX ve BAK'ın aktifleşmesini sağlar. BAX ve BAK mitokondriden Sitokrom C salınmasına neden olarak kaspaz 9'u aktifleştirir ve bu da yine kaspaz 3 ve 7'nin aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktifleşmiş kaspaz 3, normal şartlarda CAD inhibitörü (İCAD: İnhibitor of Caspase Activated DNase) tarafından inaktif halde bulunan ve kaspaz aktive edici DNaz (CAD: Caspase Activated DNase) adı verilen molekülü aktive ederek DNA sarmalında fragmentasyona neden olur [81, 82] (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Apoptoz mekanizmasında mitokondriyal ve ölüm reseptörü yolağı [83]

Hücre ölümü ve proliferasyonu arasındaki dengenin, hücre siklusunu ve apoptozu kontrol eden genlerde meydana gelen bir takım mutasyonlar etkisiyle proliferasyon yönünde değişmesi kanser adı verilen kontrolsüz proliferasyon ile karakterize, dünya popülasyonunda yaygın görülen bir hastalığa neden olur. Kanser, son yıllarda görülme sıklığı giderek artan ve ölümlerle sonuçlanan bir hastalıktır. Bu doğrultuda, 2018 yılı istatistiklerine göre, tüm dünyada 18,1 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiş ve bunların 9,6 milyonu ölümlle sonuçlanmıştır [27].

Normal bir hücre için, malign hücreye transforme olurken geçirdiği genetik değişimler ile birlikte apoptozdan kaçabilme özelliği kazanması önemli değişimlerden biridir. Apoptozdan kaçış esnasında, mitokondri yolağıdaki pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin birbirleriyle olan normal dengelerinin bozulması, kaspazların aktivasyonlarındaki bozukluk veya azalma, ölüm reseptörlerinde veya devamında süregelen sinyalleşmedeki bozukluk gibi durumlar ortaya çıkabilir [64].

Kanser hücreleri, hücresel stresin indüklediği apoptozdan kaçabilmek için anti-apoptotik BCL-2 proteinlerinin ekspresyonlarını artırır. Anti-apoptotik BCL-2 proteinlerindeki ekspresyon artışı mitokondri membranında MOMP'nu engileyerek apoptozu baskılar. Yine anti-apoptotik proteinlerden olan MCL-1 normal hücrelerde

sitokin ve büyüme faktörleri ile indüklenirken hücrel stres ve DNA hasarı ile baskılanır. Kanser hücrelerinde, fosfotidilinositol 3 kinaz (PI3K) /AKT yolağının sıklıkla görülen aşırı aktivasyonu MCL-1 proteininin ekspresyonunu teşvik eder. MCL-1'in translasyonel olarak teşvik edilmesinde PI3K/AKT sinyalinin akış aşağı (downstream) hedefi olan mTORC1'in yardımı ile gerçekleştiği düşünülmektedir [84, 85].

Apoptoz ve hücre siklusunun kontrolünde önemli rolleri olan p53, insan kanserlerinde sıklıkla mutasyonu görülen bir transkripsiyon faktörüdür. Bu mutasyonlar; p53'ün tümör baskılayıcı fonksiyonunu tamamen kaybetmesi, mutant p53'ün yabancı tip p53 proteinlerine baskın gelip tümör baskılayıcı fonksiyonunu yok etmesi ve mutant p53'ün baskın bir onkogenik rol oynaması şeklinde ortaya çıkabilir [86].

Xu ve ark. akciğer adenokarsinoma hücre hattı üzerinde yaptıkları bir çalışmada, farklı hücre tiplerinde apoptozu teşvik ettiği bilinen programlı hücre ölümü proteini 5 (Pcdp5: The Programmed Cell Death Protein 5)'in ekspresyonunun artırılması, kaspaz-3 ve kaspaz-9'u aktive ettiği ve dolayısıyla BCL-2'nin ekspresyonunu baskılayıp BAX proteininin ekspresyonunu artırarak intinsik apoptoz yolağını indüklediği gözlenmiştir [87].

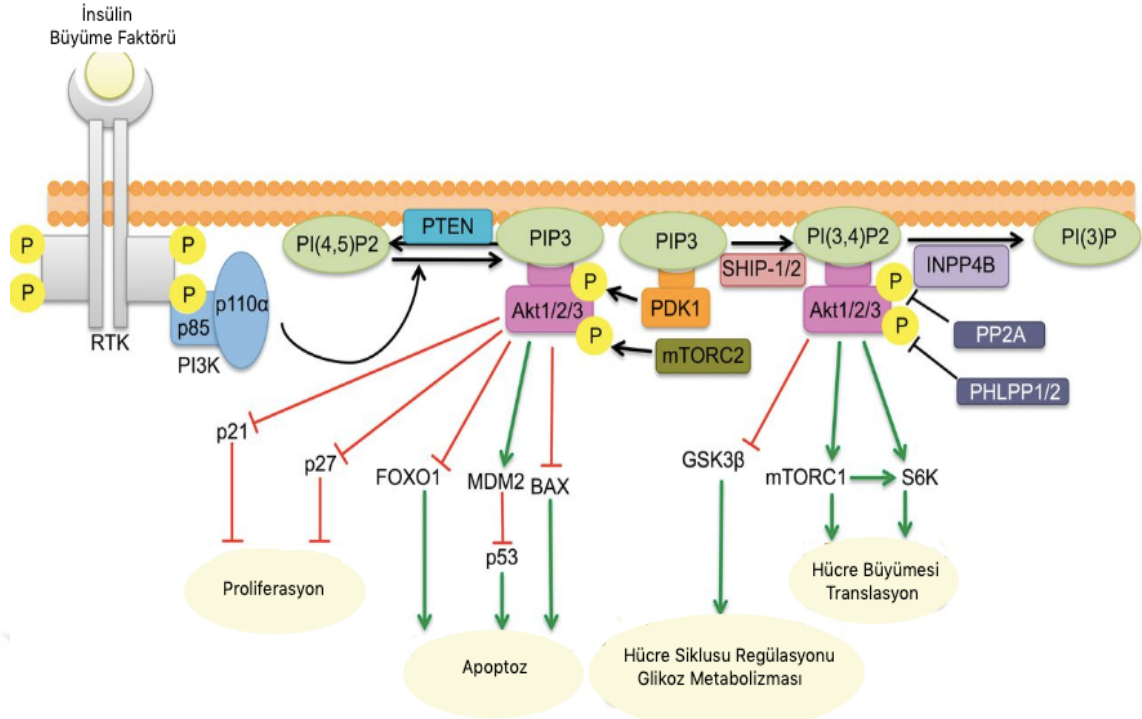
Fang ve ark. oral skuamoz hücreli karsinoma hastalarında ve hücre hattında yaptıkları Fas ve FasL ekspresyonu ile ilgili bir çalışmada, normal oral epitelyum dokularında geniş bir Fas ekspresyonu görülürken oral skuamoz hücreli karsinomada Fas ekspresyonunun büyük oranda azaldığı görülmüştür. Buna karşılık oral skuamoz hücreli karsinoma hastalarının büyük çoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla FasL ekspresyonu görülmüştür [88].

2.2.1. AKT Geni

AKT, protein kinaz B (PKB) olarak bilinir ve metabolizma, translasyon, hücre proliferasyonu, sağkalım ve anjiyogenez gibi hücrel süreçlerde rol alır. AKT-1 (PKB α), AKT-2 (PKB β) ve AKT-3(PKB γ) olmak üzere üç izorformu bulunur. Her bir izoformda, pleckstrin homoloji (PH) domaini, merkezi kinaz domaini ve karboksil terminal regülatör bölge olmak üzere benzer domain yapıları bulunur [89].

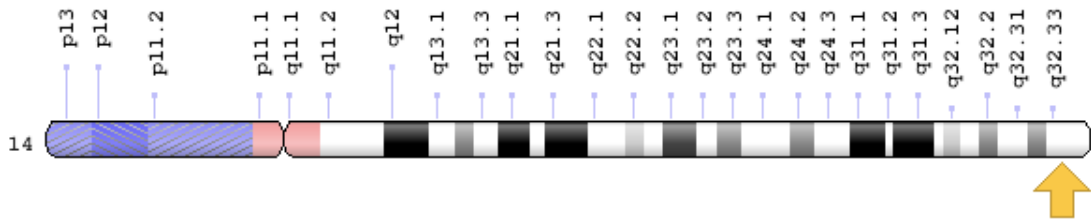
Fosfotidilinositol 3 kinaz (PI3K) sinyal yolunun akış aşağı önemli moleküllerinden biridir. Büyüme faktörleri veya sitokinler tarafından aktive edilen PI3K, hücrede lipid ikincil haberciler olan fosfotidilinositol 3,4 bifosfat (PIP₂) ve fosfotidilinositol 3,4,5 trifosfat (PIP₃) üretimini arttırır. Bu fosfotidilinositol formları, AKT ve PDK1 (3-fosfotidilinositol-dependent kinase) gibi PH domaini içeren proteinler için bağlanma bölgeleri oluştururlar [90]. AKT normalde inaktif durumda bulunurken tamamen aktive olabilmesi için Serin473 (S473) ve Treonin308 (T308) kalıntılarından fosforillenmesi gerekir. Bu aktivasyon ayrıca AKT2'de S474 ve T309 veya AKT3'te S372 ve T305 kalıntılarından da gerçekleşebilir. PIP₂ ve PIP₃'ün membran bölgesinde AKT ve PDK1'in PH domainleri arasındaki etkileşim PDK1'in, AKT-1'i T308 kalıntısından fosforilleyerek AKT'nin aktivasyonuna neden olan konformasyonel değişimine yol açar. mTOR'un fonksiyonel komplekslerinden biri olan mTORC2 ise AKT'yi S473'ten fosforilleyerek tamamen aktive olmasını sağlar [91].

AKT hücre içerisinde bir çok göreve sahiptir. Bu görevini çeşitli proteinleri fosforilleyerek veya transkripsiyonlarını negatif yönde etkileyerek gerçekleştirir. Bu doğrultuda, sadece BH3 domaini içeren proteinleri negatif yönde düzenleyerek pro-apoptotik aktivitelerini baskılar. Gen hedefleri sadece BH3 domaini içeren proteinler olan FOXO (Forkhead family of transcrption factors) proteinlerini fosforilleyerek pro-apoptotik proteinlerin aktivitesini baskılar. Buna ek olarak, MDM2 proteinini fosforilleyerek p53 aktivitesini baskılar ve böylece hücre apoptozunu bloke eder. Ayrıca AKT, mTOR yolağı ile hücre büyümesini kontrol eder. AKT, mTORC1 kompleksinin inhibitörler olan TSC2 tümör baskılayıcı proteini ve PRAS40 proteinlerini fosforilleyerek inaktive eder ve mTORC1 kompleksinin aktivasyonuna izin verir. Hücreproliferasyonunu teşvik etmek için hücre döngüsünü inhibe eden p27 ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21'i fosforilleyerek baskılar [8, 92, 93]. (Şekil 2-6)



Şekil 2-6: AKT yolağının düzenlediği mekanizmalar [94]

AKT; AKT-1, AKT-2 ve AKT-3 olmak üzere 3 izoform şeklinde eksprese edilir ve sırasıyla hücre büyümesinin kontrolü, glikoz homeostazı ve nöronal gelişimde rol alırlar. AKT-1 protein kinaz Bα (PKBα) olarak adlandırılır ve hücre büyümesi, proliferasyonu, sağkalımında görevlidir. Kromozomal lokasyonu 14q32.33 olarak belirlenmiştir ve Şekil 2-7’de gösterilmiştir [95]



Şekil 2-7: AKT-1 geni kromozomal lokasyonu [95]

PDK1 ve mTORC2’nin AKT’yi aktive etmek için fosforillelediği T308 ve S474 kalıntıları AKT-1 izoformuna aittir [96]. Diğer izoformlara kıyasla AKT-1’in kanser hücrelerindeki hiperaktivasyonu daha sık görülür. Yumurtalık ve meme kanserlerinin yaklaşık %40’ında ve prostat kanserlerinin %50’sinde AKT-1’in aşırı aktivasyonu gözlenmiştir [97].

AKT, PI3K sinyalleşmesinin akış aşağı önemli düzenleyicilerinden biridir ve aktive olduğunda hücrede bir çok süreci yönetir. Bu süreçler, hücre proliferasyonundan

metabolizmaya kadar bir çok alanı kapsar ve dolayısıyla bu yolaktaki herhangi bir aksaklık kanser hücresi proliferasyonuna neden olabilir. Bu aksaklıklar, AKT'nin fosforillenmesinin kontrolünde ortaya çıkan sorunlar sonucu aşırı aktive olan AKT'nin apoptozu baskılayıp hücre proliferasyonunu teşvik etmesi şeklinde veya PI3K sinyallemesini kontrol eden tümör baskılayıcılarda meydana gelen fonksiyon kaybı şeklinde ortaya çıkabilir [98].

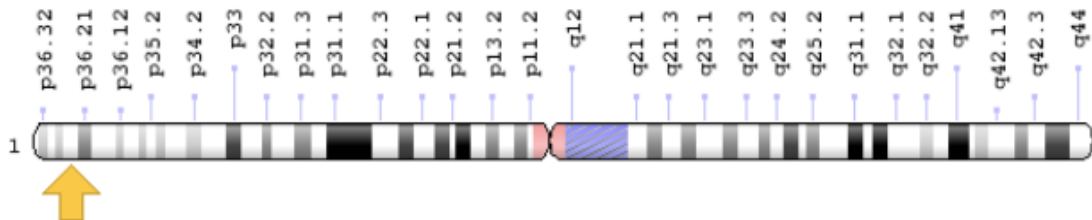
PI3K sinyalinin negatif düzenleyicisi PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) tümör baskılayıcı geni, PI3K/AKT sinyalini bloke ederek p21'in hücre döngüsü inhibisyonu fonksiyonunu artırır. Bu durumda, PTEN'de meydana gelen fonksiyon kaybı ile birlikte Erb-B2 reseptör tirozin kinaz amplifikasyonu, EGFR/PI3K mutasyonu, AKT'nin mutasyonu veya amplifikasyonu tümör hücrelerinde AKT sinyalini arttıran etkenlerdir [97].

Fang ve ark. 431 gastrik adenokarsinomlu hastalarda yaptıkları bir çalışmada PI3K/AKT yolağı mutasyonları araştırılmış ve hastaların %16'sında bu yolakla ilgili mutasyonlar görülmüştür. Mutasyon oranları %4 PTEN, %1,62 AKT-1, %0,46 AKT-2 ve %0,23 AKT-3 şeklinde belirlenmiştir [99].

Dobashi ve ark. malign kemik ve yumuşak doku tümörlerinde 65'i malign 77 tümör olgusunda AKT-1 ve AKT-2 ekspresyon analizi yapmışlardır. İmmunohistokimyasal analizler sonucunda olguların % 67,5'inde AKT-1, %72,7'si AKT-2 ve %71,4'ü fosforillenmiş AKT şeklinde aşırı ekspresyon profili göstermiştir [100].

2.2.2. mTOR Geni

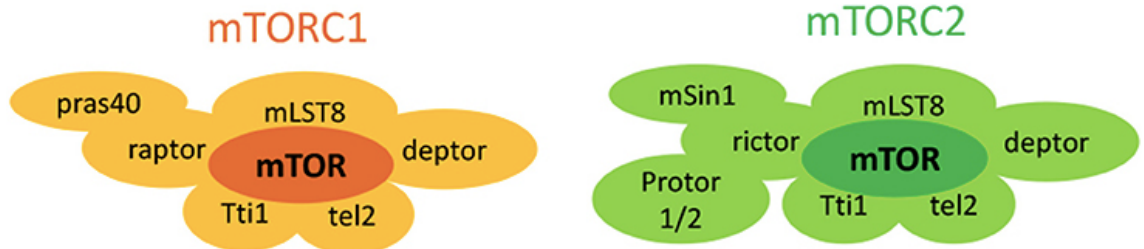
mTOR (Mechanistic Target of Rapamycin) geni, 1.kromozomun kısa kolunda 36.22 'de (1p36.22) lokalizedir [101].(Şekil 2-8)



Şekil 2-8: mTOR geni kromozomal lokasyonu[102]

mTOR, bir serin/treonin kinaz olup hücrel metabolizma, hücre büyümesi ve farklılaşması ve proliferasyonunda merkezi rol oynar. Dolayısıyla mTOR'un düzenlenmesindeki herhangi bir aksaklık kanser de dahil olmak üzere, tip 2 diyabet, obezite ve nörodejeneratif hastalıklara yol açabilir [103].

mTOR, *Streptomyces Hygroscopicus* bakterileri tarafından üretilen ve hücre proliferasyonunu baskıladığı bilinen rapamisin adı verilen bir antibiyotik hedefidir. mTOR aynı zamanda fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) ile ilişkili kinaz (PIKK) ailesine ait olup, mTORC1 ve mTORC2 adı verilen iki fonksiyonel kompleksi oluşturmak amacıyla farklı proteinler ile etkileşime girer [104]. mTORC1 ve mTORC2 komplekslerinin oluşabilmesi için sırasıyla Raptor (Regulatory associated protein of mTOR) ve Rictor (Rapamycin-insensitive companion of mTOR) proteinleri ile etkileşime giren mTOR bu iki kompleksin katalitik alt birimidir [105]. Bu proteinler dışında mTORC1 kompleksinde mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), Deptor (DEP domain mTOR interacting protein), Tti1/Tel2 kompleksi ve prolin bakımından zengin AKT substratı olan PRAS40 proteinleri bulunur. mTORC2 kompleksinde ise mLST8, Deptor ve Tti1/Tel2 komplekslerine ek olarak mSin1 (mammalian stress activated map kinase interacting protein 1), Protor1/2 (protein observed with rictor 1 and 2) proteinleri bulunur. [106]. (Şekil 2-9)

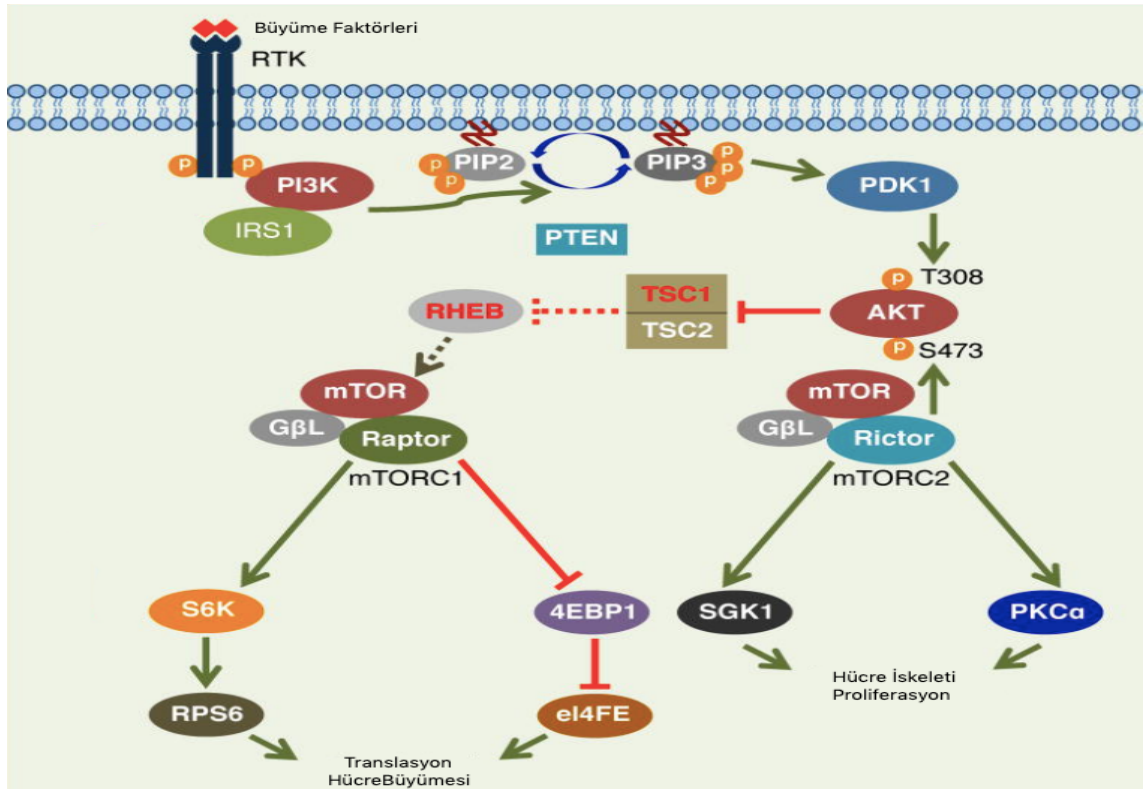


Şekil 2-9: mTORC1 ve mTORC2 kompleksleri [106]

mTORC1 ve mTORC2 komplekslerinin hücrel ve organizma düzeyinde homeostazın sağlanması için bir çok hücrel süreçlerin düzenlenmesinde görev alırlar. mTORC1'in akış yukarı (upstream) bir çok düzenleyicisi bulunur. mTORC1, fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K)/AKT yolağının aktivasyonu, reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve insülin gibi büyüme faktörlerinin etkisi ile aktive olur. mTORC1'in aktivasyonu için fosforillenerek aktive olan AKT, mTORC1'in inhibitörü olan TSC1/2 kompleksini fosforilleyerek inhibe eder. Küçük GTPaz ile beyinde zenginleştirilmiş Ras homologu (RHEB: Ras Homologue Enriched in Brain) doğrudan mTORC1'e bağlanarak aktive eder. Birer tümör baskılayıcı genler olan TSC1/2 (Tuberous Sclerosis

Complex 1/2) Rheb'in negatif düzenleyicisidir. [107, 108]. AKT ayrıca mTORC1 inhibitörü olan PRAS40'ı fosforilleyerek Raptor'dan ayrılmasını sağlayarak mTORC1'in aktivasyonunu sağlar. mTORC1 aktive edildiğinde, hücre büyümesi ve proliferasyonu için gerekli proteinlerin translasyonunu sağlayan 4EBP1 ve ribozomal protein S6K1(S kinase 1)'i fosforile eder. 4EBP1 ve S6K1 sırasıyla eIF-4E ve eIF-3' e bağlanarak translasyon başlama kompleksinin oluşumunu engeller. mTORC1, 4EBP1 ve S6K1'i fosforile etmesiyle eIF-4E ve eIF-3 bunlardan ayrılır ve serbest kalır. Böylece eIF-4E'nin protein translasyonunu başlatması sağlanır [109, 110].

mTORC1, hücre büyümesini ve metabolizmasını kontrol ederken mTORC2 ise hücre proliferasyonunu, sağkalımını ve hücre iskeletinin düzenlenmesini kontrol eder. mTORC2, protein kinaz ailesinin birkaç üyesini (PKA/PKB/PKC) ve SGK (serum glucocorticoid regulated kinase) 'yı fosforilleyerek hücre içerisindeki bu görevini yerine getirir. Temelde insülin/PI3K sinyalleme, mTORC2 aracılığıyla bu sinyallemenin kilit üyesi olan AKT'nin fosforilasyonunu sağlar. mTORC1'in inhibitörü olan TSC1 ve 2'yi fosforile ederek inhibe eden AKT'nin mTORC2 aracılığı ile fosforillenmesi mTORC2'nin aslında mTORC1'in akış yukarısında yer aldığını gösterir [111, 112]. (Şekil 2-10).



Şekil 2-10: PI3K/AKT/mTOR yolu [113]

mTOR sinyal yolağı, hücrede yaşamsal olayları düzenlediğinden bu yolaktaki herhangi bir bozukluk kanserleşmeye neden olmaktadır. PI3K/AKT sinyallesinin, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR: İnsulin-like Growth Factor Receptor) gibi büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonu, PI3K mutasyonu veya AKT amplifikasyonu etkisiyle deregülasyonu görülür. Ayrıca PI3K sinyalinin negatif yönde regülatörü olan PTEN tümör baskılayıcı geninde ortaya çıkan mutasyon PI3K/AKT/mTOR yolağının aktivasyonuna neden olur [114]. Benzer şekilde TSC tümör baskılayıcı genlerindeki mutasyon bir çok kanser türünde ortaya çıkmıştır. Bu mutasyonlar mTORC1'in aktivasyonuna ve sonunda kanser hücresinin büyüme ve proliferasyonu için gerekli metabolik süreçlerin başlamasına neden olur. mTOR'u kodlayan veya mTOR sinyal yolağını düzenleyen genlerde meydana gelen mutasyonlar RCC ve kolon kansinomu gibi kanser türlerinde tanımlanmıştır [103].

Umemura ve ark. küçük hücreli akciğer kanseri 51 hastada yaptıkları araştırmada, tümörlerin %36'sında PI3K/AKT/mTOR yolağındaki genetik değişiklerin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu değişimler PTEN %4, AKT-1 %9, AKT-2 %4, RICTOR %9 ve mTOR %4 şeklinde belirtilmiştir [115].

Xiang ve ark. yaptıkları bir çalışmaya göre, hücre büyümesini baskıladığı bilinen Bufalin ve AKT'nin allosterik inhibitörü olan MK2206 multiple myeloma hücre hatlarına birlikte uygulandığında MK2206'nın AKT inhibisyonu yoluyla AKT/mTOR sinyal yolağını inhibe ederek Bufalin'in apoptotik etkisini desteklediği gösterilmiştir [116].

2.2.3. Renal Kanserlerde Apoptoz ile İlgili Çalışmalar

RCC'nin böbrek kanserinin en yaygın türü olması ve görülme sıklığının giderek artıyor olması bu alanda apoptoz çalışmalarına hız kazandırmıştır. Bununla birlikte, kanser oluşumu etkili ve apoptoz sürecinde yer alan yolların daha iyi anlaşılması bu yolları hedef alan yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Chen ve ark. bir çalışmada, XIAP'ın aşırı ekspresyonu görülen RCC hücre hattında siRNA (small interfering RNA) ile XIAP'ın baskılanması mitokondriden apoptozu indükleyen sitokrom C ve pro-apoptotik proteinlerin salınmasına neden

olduğu gösterilmiştir. XIAP'ın inaktivasyonu aynı zamanda BCL-2 ve BCL-xL düzeylerinde azalmaya yol açmıştır [117].

Pandurangan ve ark. doğal bir antioksidan olan karnosinin, RCC hücre hattına uygulandığında doza bağımlı olarak hücre canlılığını büyük ölçüde azalttığını ve kaspaz-3 aktivitesini yine doza bağımlı olarak arttırdığını göstermişlerdir [118].

Li ve ark. yaptıkları bir çalışmada RCC hücre hatlarında anisomisin ve mapatumumapın sinerjistik etkilerini araştırmışlar ve hem ayrı ayrı uygulandığında hem de sinerjistik olarak apoptozu indüklediği görülmüştür. Ayrıca doza bağımlı olarak anisomisin ve mapatumumapın DR4 ekspresyonunu arttırdığı ve sadece anisomisin uygulanan hücrelerde kaspaz 3 ve 8 aktivitesinin arttığı görülmüştür [119].

2.3. Doğal Antikanser İlaçlar

Kanser, dünya genelinde çok yaygın görülen ve ölümlere neden olan bir hastalıktır. Bu nedenle kansere yönelik tedavi geliştirebilmek amacıyla bir çok araştırma yapılmaktadır. Kanser tedavisinde mevcut tedavi yöntemleri, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi tedavisi şeklindedir. Uygulanan mevcut kemoterapi yöntemleri yan etkilerinden ötürü hastaların yaşam kalitesini etkilediğinden kanser tedavisi için minimum yan etkili yeni ilaçlar geliştirme ihtiyacı doğmuştur [120].

Doğal olarak elde edilen ürünler geçmişten bu yana hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Doğal ürünlerden antikanser ilaçların geliştirilmesi kanserde kemoterapi tedavisine önemli katkılarda bulunmuştur. Ancak doğal ürünlerden elde edilen materyallerden antikanser ilaç geliştirebilmek için, ilacın etkinliğinin artırılması ve absorpsiyonunun araştırılması, daha sonra metabolize edilip atılması süreçlerinin iyi analiz edilmesi ve toksisite profillerinin optimizasyonu gibi araştırmaların yapılması gereklidir [121].

Kanser tedavisinde kullanılan doğal antikanser ilaçların hücreler ile biyolojik olarak uyum sağlaması ve kanser hücrelerinde intirinsik, ekstrinsik veya kaspaz bağımlı/bağımsız apoptozu veya diğer hücre ölümü mekanizmalarını tetiklerken normal hücrelerde toksisiteye neden olmaması bu ilaçlara yönelik araştırmaların hız kazanmasına neden olmuştur. Bu ilaçlar genellikle bitkilerin sekonder metabolitleri olup güçlü antikanser etkileri olduğu bilinen resveratrol, kurkumin gibi polifenolikler; berberin gibi alkaloidler ve triptolit, betülinik asit gibi triterpenlerden oluşur [122, 123].

2.3.1. Triterpenoidler

Bitkiler, ilaç üretiminde önemli kaynaklar olduğundan onlardan elde edilen doğal ekstraktlar uzun yıllardır sağlık alanında tedavi amaçlı kullanılıyor. Özellikle kanser tedavisinde kemoterapötiklerin kanser hücrelerine zarar verirken aynı zamanda sağlıklı hücreleri de tahrip etmesi araştırmacıları doğal olarak elde edilen, düşük toksisiteli, sağlıklı ve kanserli hücreleri ayırt edip sadece kanser hücrelerine zarar veren yeni ilaçlar geliştirmeye yöneltmiştir [124].

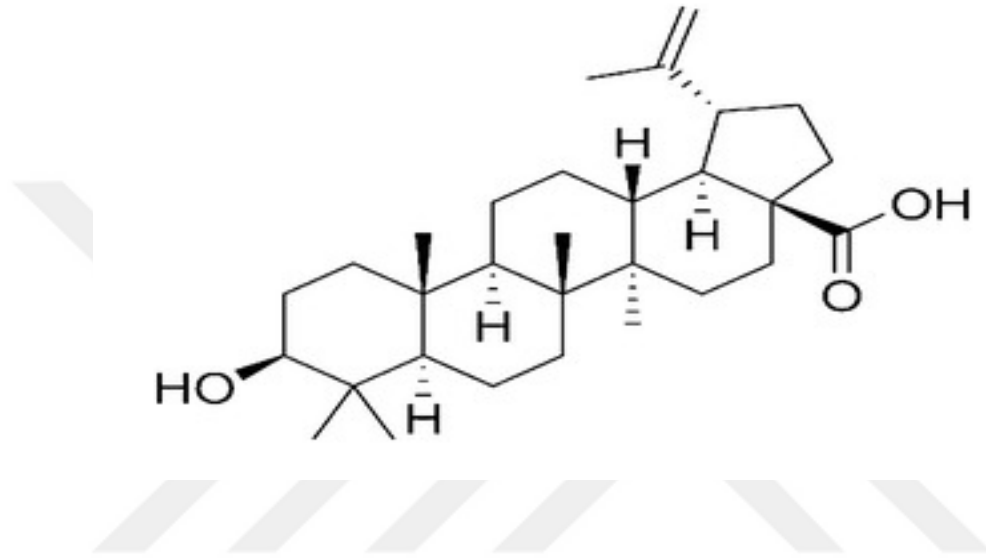
Bir çok mekanizması olduğu bilinen kanserin, tedavisi için yine benzer şekilde çok fonksiyonlu ilaçların geliştirilmesi gereklidir. Bu nedenle, çeşitli yollarla modifiye edilmiş temel bir omugaya sahip yapısal olarak çok çeşitli, 20.000'den fazla çeşidi bulunan ve triterpenoidler adı verilen bitki kökenli yapılar kanser tedavisinde ilgi odağı olmuştur [125]. Triterpenoidler ve onlardan elde edilen bileşiklerin hipoglisemik, hepatoprotektif, immunomodülatör, anti-oksidan, anti-inflamatuvar ve anti-tümör aktivite gibi bir çok biyolojik etkileri bulunur [126].

Triterpenoidler, terpenoidlerin yapısal ve çeşitlilik bakımından en büyük grubu olmakla birlikte squalen yada onunla ilişkili 30 karbonlu prekürsörlerden sentezlenir. Ayrıca, izopentetil pirofosfat oligomerlerinin metabolitleridir ve bitkiler arasında serbest triterpenoidler, saponinler ve prekürsörleri şeklinde çok yaygın olarak bulunurlar [127]. Çoğu triterpenoid 30 karbonludur ve 6 izopren ünitesinin yapısal bileşiminden oluşur ve tetrasiklik triterpenoid ve pentasiklik triterpenoid olmak üzere iki kategoriye ayrılır. Pentasiklik triterpenoidlerin anti-inflamatuvar ve anti-tümör gibi bir çok önemli farmakolojik ve biyolojik etkileri bulunur. Pentasiklik triterpenoidlerin bu aktiviteleri gösteren lupan, olean ve ursan alt grupları bulunur [128].

Çeşitli bitkilerin farklı bölgelerinden elde edilen betülin, betülinik asit ve lupeol gibi lupan tipi pentasiklik triterpenoidler apoptoz indükleyici anti-inflamatuvar ve antikanser etkinliğine sahiptir [129]. Betülin, çeşitli hücre hatlarında farklı konsantrasyonlarda yapılan çalışmalarda apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Betülinik asit, mitokondriyal membran permeabilitesini artırarak sitokrom C salınımını tetikleyip BCL-2 proteinlerinin regülasyonunu sağlayarak intrinsik yolak aracılığı ile apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Lupeol ise çeşitli sebze ve meyvelerde yaygın olarak bulunur ve aynı şekilde çeşitli hücrelerde apoptozu teşvik ettiği bilinmektedir [130–132].

2.3.1.1. Betülinik Asit

Betülinik asit, lupan tip bir pentasiklik triterpenoid olup $C_{30}H_{48}O_3$ şeklinde formülize edilir ve kimyasal yapısı Şekil 2-11’de gösterilmiştir. Doğada yaygın olarak bulunup çeşitli ağaçların (*Betula sp.*, *Betulaceae*) kabuklarından veya diğer bölgelerinden izole edilip bitkilerde serbest aglikon halinde yada glikozile edilmiş türevleri halinde bulunur [6], [133].



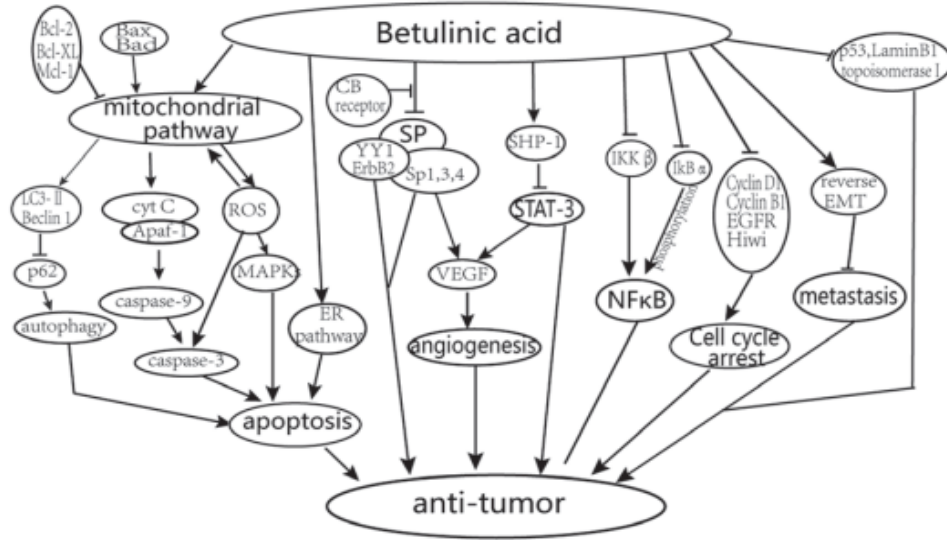
Şekil 2-11: Betülinik asitin kimyasal yapısı [134]

Betülinik asitin diğer triterpenoidler gibi antikanser, anti-inflamatuar, anti-viral ve anti-anjiyogenik etkileri bulunur. Bu antikanser etkileri, mitokondriyal yolak vasıtasıyla apoptozu teşvik ederek, anjiyogenezi ve hücre siklusunu düzenleyerek ve bir çok yolağı aktive veya inaktive ederek sağlar [135].

Betülinik asitin güçlü sitoksisite etkisinin ortaya çıkması nedeniyle son yıllarda apoptoz ile ilişkisi yönünde çalışmalar önem kazanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda betülinik asitin doğrudan mitokondriyi etkileyerek apoptozu uyardığı görülmüştür [136]. Betülinik asit, mitokondri membran potansiyelinin kaybını tetikler ve bu kayıp bir mitokondrial permeabilite transisyon por kompleksinin stabilizatörü olan bongkreik asiti inhibe ederek mitokondriden Sitokrom C, Smac veya AIF’in salınımına neden olur. Salınan bu proteinler ise kaspaz 3 ve 8’in aktivasyonu ve bunu takiben nükleer ve DNA fragmentasyonuna yol açar. Ayrıca betülinik asitin indüklediği reaktif oksijen türleri (ROS: Reactive Oxygen Species)’nin oluşumu mitokondriyal membran permeabilizasyonunu başlatan etkenlerden biridir [137]. Ek olarak betülinik asit,

mitokondriden apoptotik proteinlerin salınımını düzenleyen ve normalde denge içerisinde bulunan anti-apoptotik ve pro-apoptotik BCL-2 proteinlerinin ekspresyonlarını düzenler. Betülinik asit uygulamasının ardından melanoma, glioblastoma ve nöroblastoma hücrelerinde BAX'ın ve BCL-Xs'nin ekspresyonunu arttırdığı ancak BAK ve BAD üzerinde önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür [138–140].

Ayrıca betülinik asit, siklin D1, SP (Specifity Protein) transkripsiyon faktörü ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor) ile hücre siklusunu ve anjiyogenezi düzenler. STAT3 (Signal Transducer and Activator Transcription 3) ve NF- κ B sinyal yolağını inhibe eder. Epiteliyal mezenkimal geçiş (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) ve topoizomerez 1'in inaktivasyonu ile invazyon ve metaztası engeller [135]. Betülinik asitin anti-tümör etkileri Şekil 2-12'de gösterilmiştir.



Şekil 2-12: Betülinik asitin antitümör etkileri [135]

Betülinik asitin antikanser aktivitesinin yanı sıra, hücrelerde glikoz alımı, insülin direnci, insülin duyarlılığı ve glikojen sentezi üzerinde etkileri ile anti-diyabetik etkileri tip 2 diyabet tedavisi için ilgi çekmiştir [141] ve inflamasyon üzerindeki etkileri ile birlikte anti-inflamatuar, anti-HIV aktivitesi ile anti-viral etki olmak üzere bir çok biyolojik aktivitesi bulunmaktadır [6].

Betülinik asitin farklı kanser türlerinde çoğunlukla apoptoz üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çok çalışma mevcuttur.

Shen ve ark. oral skuamoz hücreli karsinoma hücre hatlarında betülinik antikanser etkilerini araştırmışlardır. Doza ve zamana bağlı olarak betülinik asitin hücre proliferasyonunu önemli şekilde azalttığı ve kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivitesini attırdığı görülmüştür. Siklin D1 ekspresyonunun azaltılmasıyla hücre siklusunu durdurmuştur. Ayrıca, ROS üretiminin arttığı gözlenirken, real-time PCR çalışmasında BCL-2 ekspresyonu azalırken BAX ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir [142].

Zeng ve ark. betülinik asitin kolorektal kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkilerini incelemişlerdir. Hücre proliferasyonunu baskılayıp hücre ölümünü arttırdığı gözlenmiştir. Ek olarak, BAX ve BCL-2 ekspresyonlarını düzenlemiş ve mitokondri membran potansiyeli kaybına neden olarak mitokondriyal yolak ile apoptozu tetiklemiştir [143].

Betülinik asitin, sağlıklı hücrelerde toksiteye neden olmadan kanser hücrelerini ayırt edip tahrip etme yeteneği farklı kanser türlerinde farklı yolaklar üzerindeki etkilerinin aydınlatılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle, çalışmamızda CAKİ-2 renal kanser hücre hattında apoptoz yolağı üzerine etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Malzemeler

Hücre hatlarının yerleştirilmesi için kullanılan besiyerleri CAKİ-2 hücre hattı için McCoy's 5a ve MRC-5 hücre hattı için EMEM medyumunu kullanılmıştır. Ayrıca besiyeri ortamı için FBS (Fetal Bovin Serum) (Gibco) ve Penisilin-Streptomisin kullanılmıştır.

Alt kültürleme işlemleri için Tripsin-EDTA (Gibco) ve dPBS (Gibco) kullanılmıştır.

Çalışmalarda kullanılmak üzere Betülinik asit (B8936) Sigma Aldrich Firmasından ticari olarak satın alınmıştır.

WST-1 sitotoksosite testi için kullanılmak üzere WST-1 çözeltisi (Roche) ve apoptoz tayini için Annexin V apoptoz kiti (Merck Millipore) kiti kullanılmıştır.

cDNA sentezi için Jena Bioscience cDNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

Real-Time PCR ekspresyon analizi için Jena Bioscience qPCR ProbeMaster (PCR:360) kiti kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Inverted Mikroskop (Leica)
- Laminar Flow kabin (Fast Safe Elite)
- Karbondioksit İnkübatörü (New Brunswick)
- Otomatik Hücre Sayım Cihazı (Life Technologies)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter)
- NanoDrop (Roche)
- Vortex
- PCR Cihazı (Applied Biosystems)
- Flow Sitometri (MUSE)
- Real-Time PCR Cihazı

- +4 °C Buzdolabı
- -80 °C Derin dondurucu
- -20 °C Derin Dondurucu

3.3. Hücre Hatları

Berrak hücreli renal karsinomu CAKİ-2 (ATCC® HTB-47™) hücre hattı ve sağlıklı hücre hattı MRC-5 (ATCC® CCL-171™) kültür ortamında çoğaltılarak hazırlanmıştır.

3.4. Hücre Hatlarının Yerleştirilmesi

-80 °C'den alınan kryotüplerdeki hücreler önce -20 °C 'de bir süre bekletilmiş daha sonra çözünmeleri için 37 °C'lik su banyosuna alınmıştır. Çözünen hücreler DMSO (Dimetilsülfoksit) 'nun zararlı etkisini uzaklaştırmak için 5mL besiyeri içerisine alınmıştır. 1500 rpm' de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve 1mL besiyeri ile homojenize edilmiştir. Hücre sayımı yapıldıktan sonra uygun sayıda flasklara bölünerek 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

CAKİ-2 (ATCC® HTB-47™) berrak hücreli renal karsinomu için McCoy's 5a medyum ve MRC-5 (ATCC® CCL-171™) sağlıklı hücre hattı için EMEM medyumunu kullanılarak %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren flasklara ekimleri yapılmıştır. Hücreler yeterli sayıya ulaşınca kadar 2 gün ara ile besi ortamı yenilenmiştir. Yeterli sayıya ulaşan hücreler tripsinizasyon işlemi yapılarak alt kültüre edilmiştir.

3.5. Hücrelerin Altkültürleme İşlemi

Hücre hatları yerleştirildikten sonra hücrelerin büyüme durumlarına göre 2-3 günde bir besiyeri değişimi yapılmıştır. Değişim sırasında flasklardan kültür ortamı uzaklaştırılmış ve taze besiyeri eklenmiştir.

Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladığında altkültürleme işlemi yapılması gerekir. CAKİ-2 ve MRC-5 hücre hatları flask yüzeyine tutunarak büyüme özelliğinde oldukları için tripsinizasyon işlemi gerekir. Kültür ortamı flasklardan uzaklaştırılır. Flask yüzeyleri 3mL dPBS ile yıkanır. Yıkama işleminin ardından her bir flaska 3mL tripsin eklenerek 5 dk boyunca %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde inkübasyona bırakılır. İnkübasyonun ardından flask yüzeyleri 9mL taze medyum ile yıkanarak 15 mL'lik falkonlara alınır. 1500 rpm'de 5 dk santrifüjün ardından üstte kalan medyum

uzaklaştırılır. Hücre sayımları yapıldıktan sonra uygun sayıda flasklara bölünerek altkültürleme işlemi tamamlanır.

3.6. Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Kullanılan hücre hatlarından daha sonra çalışılmak üzere farklı pasaj numaralarından dondurularak stok yapılmıştır.

Flasklardan besiyeri uzaklaştırılmış ve bulundukları ortamdan bağlantılarını kesmek amacıyla 3 mL Tripsin uygulanmıştır. 5 dk inkübasyonun ardından flasklar 9 mL besiyeri ile yıkanmış ve tüm hacim 15 mL'lik falkonlara alınmıştır. 1500 rpm'de 5dk santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. %90 besiyeri ve %10 DMSO içeren dondurma çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden uygun hacimde alınarak falkonda bulunan hücre pelleti içerisine alınıp pipetaj yapılmıştır. Hücreler 1mL hacminde olarak şekilde kryotüplere dağıtılmıştır. Tüpler kademeli olarak önce -20 °C'de 1-2 saat bekletilmiş daha sonra -80 °C'de 1-2 gün bekletildikten sonra azot tankında kalıcı olarak muhafaza edilmiştir.

3.7. Betülinik Asit Hazırlanması

Sigma Aldrich firmasından ticari olarak satın alınan 5mg betülinik asit, molarite hesabı yapılarak 100µM olacak şekilde DMSO ile sulandırılmıştır. Bu solüsyon ana stok olarak kullanılmıştır. Daha sonra ana stoktan uygun besiyerleri ile dilüe edilerek 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 25 ve 50µM konsantrasyonlarında betülinik asit çözeltileri hazırlanmıştır.

3.8. WST-1 Sitotoksosite Testi

CAKI-2 (ATCC® HTB-47™) ve MRC-5 (ATCC® CCL-171™) hücrelerinin 96'lık well platelere her bir kuyucuğa 10.000 hücre düşecek şekilde ekilmiştir. Hücrelere pozitif kontrol ortamı olarak sadece besiyeri, negatif kontrol olarak ise H₂O₂'li besi ortamı uygulanmıştır. 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 25 ve 50µM dozlarında ve 24.,48. ve 72. Saat zamanlarında betülinik asit uygulanmış ve her bir plate için 24., 48. ve 72. saatlerinin inkübasyonlarının sonunda her kuyucuğa 10 µl WST-1 çözeltisi eklenmiştir. 37°C'de 4 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığının tespiti için 96'lık plateler ELİSA plate okuyucuda 460 nm'de absorbans yoğunluk değerleri okunmuştur. Canlı hücreler sarı renk oluştururken ölü hücrelerde renk değişimi gözlenmemiştir. Hücre gruplarında kullanılacak olan uygun dozlar ve uygulanacak süre belirlenmiştir.

3.8.1. Hücre Canlılığının Hesaplanması

WST-1 sitotoksosite testinin ardından, tüm absorbans değerlerinden kör (blank) kuyulara ait absorbans değerleri çıkartılmış ve asıl absorbans değerleri bulunmuştur. Her bir örnek için elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve ortalama absorbans değerleri ($ABS_{ortalama}$) bulunmuştur. Aşağıda gösterilen formüle göre, ortalama absorbans değerleri, kontrol kuyularının ortalama absorbans değerlerine bölünmüş ve yüzde olarak canlılığın hesaplanabilmesi için çıkan sonuç 100 ile çarpılmıştır. Böylece IC_{50} değerleri belirlenmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = [\text{Örnek } ABS_{ortalama} / \text{Kontrol } ABS_{ortalama}] \times 100$$

3.9. Annexin-V

Uygun dozlar ve süreler belirlendikten sonra apoptoz ve nekrozun tespiti için Akım Sitometri Annexin-V Apoptoz-Nekroz tayini yapılmıştır. Annexin-V analizinde Fluorescein İsothiocyanate (FITC) ve Propidium İodide (PI) floresan boyaları kullanılır. Normalde hücre membranının iç yüzeyinde bulunan bir fosfolipid olan fosfatidilserin, apoptotik hücrelerde membranın dış yüzeyine yerleşir. Annexin-V -FITC kompleksi apoptotik hücrelerin dış membranlarında bulunan fosfatidilserine bağlanarak ışıma verir. Bu ışıma, akım sitometride FL1 dedektörü tarafından algılanır. Nükleik asitlere bağlanabilen PI floresan boyası ise nekrotik hücrelerin DNA'larına bağlanarak ışıma verir. Bu ışıma ise FL2 dedektörü tarafından algılanır. Dedektörler tarafından algılanan ışımların şiddetlerine göre hücreler sınıflandırılır ve bir diyagrama yerleştirilir.

Annexin-V uygulaması için 6'lık well platelere kuyu başına 1×10^5 hücre düşecek şekilde 2 mL hacminde ekimleri yapılmıştır. Hücrelerin platelere yapışması için yapılan inkübasyonun ardından 25 ve 50 μ M dozlarında betülinik asit uygulaması yapılmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tripsinizasyon ile hücreler kuyulardan kaldırılmış ve 1,5 mL'lik eppendorf tüplere alınmıştır. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 200 μ L medyum eklenerek pipetaj yapılmıştır. Bu karışımdan 100 μ L alınarak yeni eppendorf tüplerde 100 μ L Annexin-V- Cell Death Reagent eklenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakıldı. Örneklerin her birinin akım sitometri cihazında ölçümleri yapıldı. Annexin-V -FITC ve PI ışımlarının her ikisini de bulundurmeyen hücreler canlı, sadece PI ışıması bulunan hücreler nekrotik, sadece Annexin-V -FITC ışımasını

bulunduran hücreler apoptotik, hem Annexin-V -FITC hem de PI ışımalarını bulunduran hücreler ise geç apoptotik olarak değerlendirilmiştir.

3.10. Betülinik Asit Uygulanması

WST-1 sitotoksosite testi ile hücreler için uygun doz ve zaman belirlendikten sonra her bir hücre hattı için kontrol, 25 ve 50 μ M her dozları için dört tekrarlı olacak şekilde dizaynları yapılmıştır. Her bir tekrar için 25 cm²'lik flasklara her flaska 2×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler flasklara ekildikten sonra 25 ve 50 μ M dozlarda betülinik asit hazırlanıp kontrol flaskları hariç diğer flasklara her bir dozdan 300 μ l hacminde ilaç uygulaması yapılmış ve hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.11. RNA İzolasyonu

Betülinik asit uygulanan hücre hatları 24 saat inkübasyon süresinin sonunda hücreler bulundukları flasklardan tripsinizasyon ile kaldırılmış ve her bir flasktan kaldırılan hücreler, Jena Bioscience Total RNA Purification Kit içeriğinde bulunan 500 μ L Lysis Buffer ile homojenize edilmiştir. Spin kolonlara alınan lizat, santrifüj edildikten sonra Wash Buffer 1 ve Wash Buffer 2 solüsyonlarıyla yıkanmıştır. Son aşamada spin kolonlar 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve 50 μ l Elution Buffer eklenmiştir. 10.000 g'de 1 dakika santrifüj sonrasında elüsyon aşaması tamamlanmış ve RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop ile ölçüldü. 1 μ l yüklenen RNA örneklerinin konsantrasyonu 260 nm optik dansitesinden (OD), saflığı ise 260/280 nm dalga boyundaki OD oranı tespit edilmiş ve örnekler -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları Tablo3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: RNA örneklerinin konsantrasyonları

Örnek	A260/280	A260/230	Konsantrasyon(ng/μl)
Kontrol CAKI-2 (1)	2,1	1,6	185
Kontrol CAKI-2 (2)	1,7	1,5	206
Kontrol CAKI-2 (3)	2,1	1,5	258
Kontrol CAKI-2 (4)	1,8	0,5	145
25 μM BetA CAKI-2 (1)	2,1	1,6	240
25 μM BetA CAKI-2 (2)	2,1	1,6	165
25 μM BetA CAKI-2 (3)	2,1	1,7	284
25 μM BetA CAKI-2 (4)	1,9	1,6	181
50 μM BetA CAKI-2 (1)	1,8	0,8	51
50 μM BetA CAKI-2 (2)	1,6	1,3	110
50 μM BetA CAKI-2 (3)	1,7	1,0	75
50 μM BetA CAKI-2 (4)	2,1	0,9	83
Kontrol MRC-5 (1)	2,1	1,7	718
Kontrol MRC-5 (2)	2,2	1,8	479
Kontrol MRC-5 (3)	2,2	1,7	743
Kontrol MRC-5 (4)	2,3	1,6	303
25 μM BetA MRC-5 (1)	2,3	1,6	333
25 μM BetA MRC-5 (2)	2,3	1,4	242
25 μM BetA MRC-5 (3)	2,2	1,7	397
25 μM BetA MRC-5 (4)	2,2	1,4	388
50 μM BetA MRC-5 (1)	2,5	0,5	131
50 μM BetA MRC-5 (2)	2,9	1,2	78
50 μM BetA MRC-5 (3)	2,1	1,5	191
50 μM BetA MRC-5 (4)	2,4	1,6	225

3.12. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, -80 °C’de saklanan RNA örneklerinin konsantrasyonları uygun miktarda birbirine eşitlenmiştir. Jena Bioscience iSCRIPT cDNA Synthesis Kit içeriğinde bulunan ve Tablo3-2’de gösterilen bileşenler gösterilen miktarlarda kullanılmıştır. Tablo3-3’de gösterilen süre ve sıcaklıklarda PCR cihazında cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C’de saklanmıştır.

Tablo 3-2: cDNA reaksiyon içerikleri

Bileşenler	Miktar (µl)
RNase Free Water	10
SCRIPT RT Buffer	4
dNTP Mix	1
Oligo (dT) 20 Primer	0,5
DTT stok solution	1
RNase inhibitor	1
SCRIPT Reverse Trascriptase	0,5
RNA	2
Toplam	20

Tablo 3-3: cDNA reaksiyon süreleri

İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	İnkübasyon süresi (dk)
42	10
50	60
70	10
4	∞

3.13. Real-Time PCR (qPCR)

Elde edilen cDNA örneklerinden uygun primer problemleri kullanılarak gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Primer problemler olarak AKT-1, mTOR ve normalizasyon için GAPDH housekeeping geni kullanılmıştır. Tablo 3-4'te gösterilen bileşenler belirtilen miktarlarda kullanılmış ve her prob için ayrı karışım hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu Real-Time plateler her prob için ayrı ayrı olacak şekilde dizayn edilmiştir. Real-Time platelere, plate dizaynına göre uygun karışımlardan 18 µl dağıtılmıştır. Platete bulunan karışımlara cDNA örneklerinden 2 µl eklenmiştir. Negatif kontrol olarak her bir prob için birer kuyucuk ayrılmış ve içerisine sadece karışım eklenmiştir. Hazırlanan plate, Real-Time PCR cihazında Tablo 3-5'te gösterilen inkübasyon süre ve sıcaklıklarında reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-4: Real-Time PCR reaksiyon içerikleri

Bileşenler	Miktar (µl)
Master Mix	10
PCR grade dH₂O	7,2
Taqman Prob	0,8
Toplam	18

Tablo 3-5: Real-Time PCR reaksiyon süreleri

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon ve Polimeraz Aktivasyonu	95	2 dk	1x
Denatürasyon	95	15 sn	40x
Bağlanma ve Elongasyon	60	1 dk	40x

Reaksiyon tamamlandığında C_T değerleri elde edilmiştir. ΔC_T değerleri ve kat değişimi (Fold Change) değerleri hesaplanmıştır.

3.14. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 21.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Gruplar arası değerlendirmede MannWhitney-U testi kullanılmıştır.

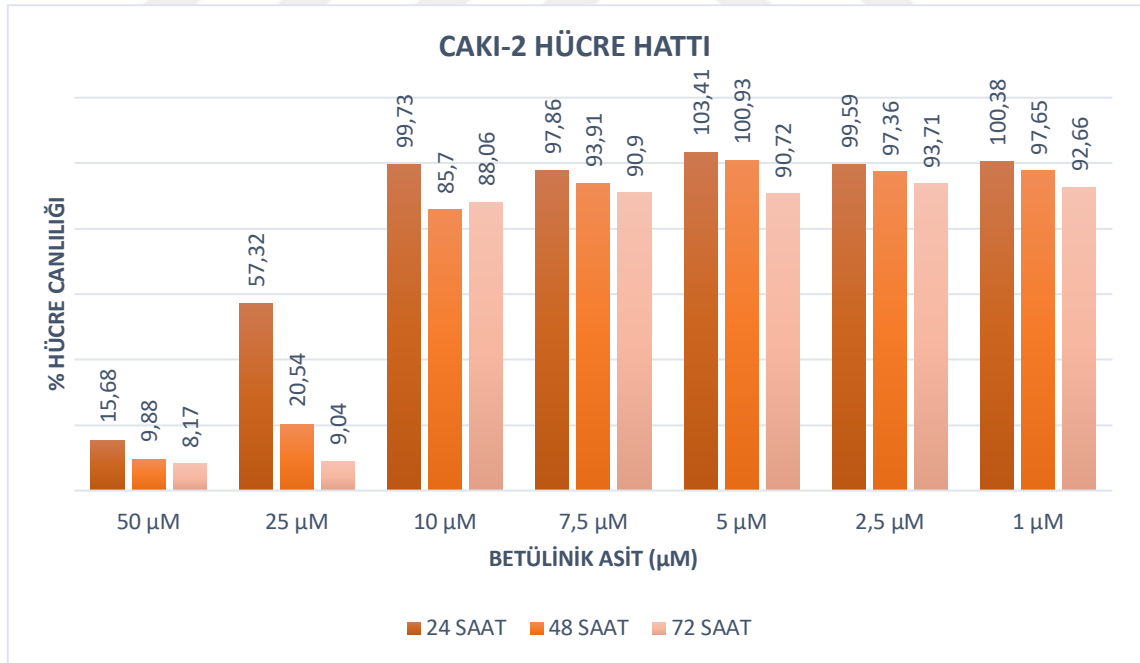


4. BULGULAR

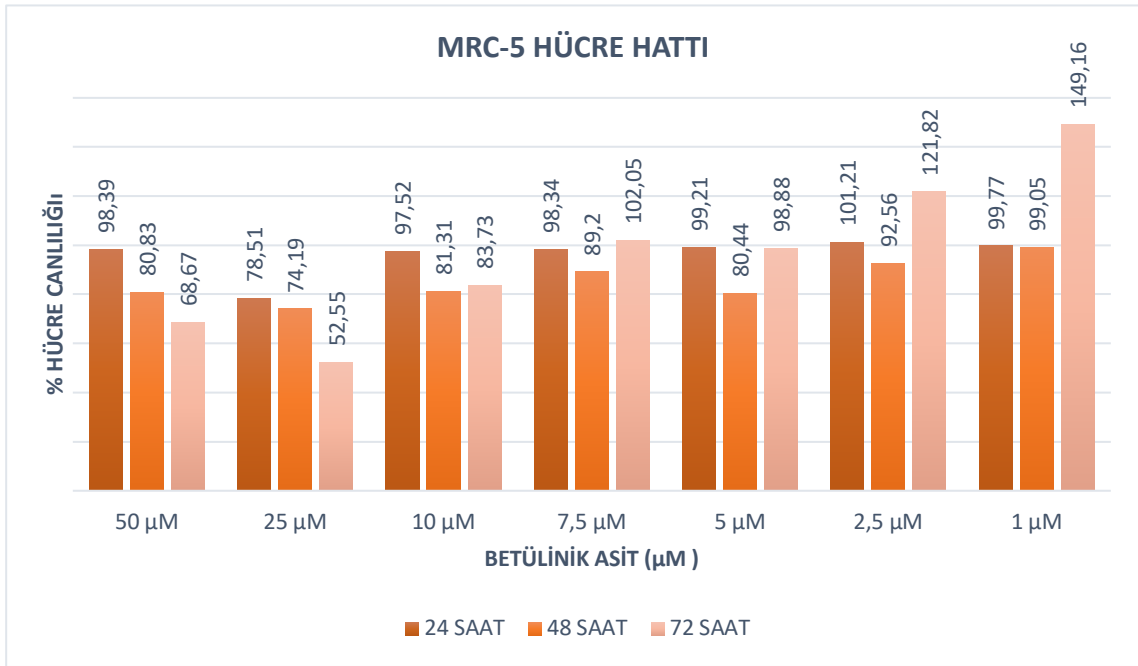
4.1. WST-1 Sitotoksosite Testi Sonuçları

WST-1 sitotoksosite testi sonucu elde edilen betülinik asit uygulanmış sağlıklı hücreler ve kanser hücrelerinin absorbans değerleri ortalamalarından % olarak hücre canlılığı hesaplanmıştır. Her hücre için betülinik asit uygulanmayan kontrol kuyularının canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir. Betülinik asit uygulanmış kuyuların canlılığı kontrol kuyularına göre belirlenmiştir. % olarak hücre canlılığı değerleri Şekil4-1 ve Şekil4-2 'de gösterilmiştir. Deney sonuçlarına göre; CAKİ-2 hücre hattında 24 saat inkübasyon süresinde 25 μ M dozunda hücre canlılığında %42,6 azalma görülürken, 50 μ M doz için ise % 84,3 azalma görülmüştür ($p<0,05$). Kontrol grubu olarak kullandığımız MRC-5 hücre hattında ise betülinik asitin hücre canlılığı üzerine anlamlı bir etkisi görülmemiştir.

Sonuçlara göre; 25 ve 50 μ M betülinik asit etkin doz ve inkübasyon süresi 24 saat olarak seçilmiştir.



Şekil 4-1: CAKİ-2 hücre hattında hücre canlılığı grafiği

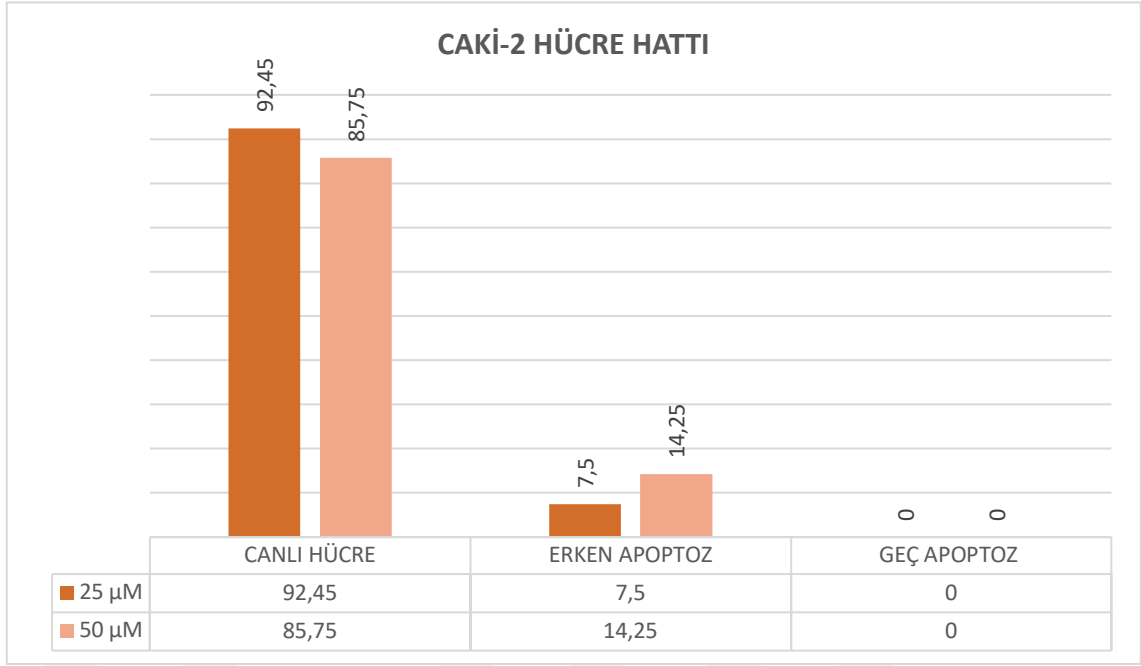


Şekil 4-2: MRC-5 hücre hattında hücre canlılığı grafiği

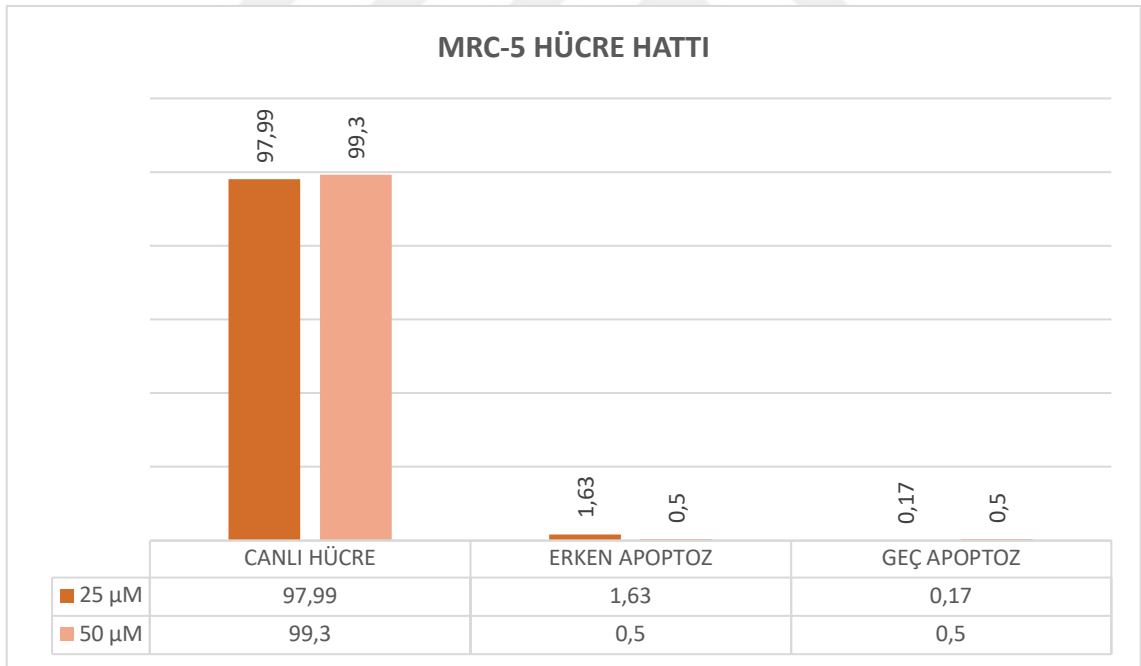
4.2. Annexin-V Testi Sonuçları

Betülinik asit uygulanmış hücre gruplarında apoptoz ve nekrozun tayini için Annexin V Testi yapılmıştır. Her örnek başına akış sitometride 1×10^4 hücre sayılmıştır. Hücrelerin analizleri yapılırken, Annexin-V (-) ve PI(-) hücreler sağlıklı, Annexin V(+) ve PI(-) hücreler erken apoptotik, Annexin-V (+) ve PI (+) hücreler geç apoptotik, Annexin-V (-) ve PI(+) hücreler ise nekrotik olarak değerlendirilmiştir. CAKİ-2 hücre hattında 25 ve 50 µM dozlarında ve 24 saat inkübasyon süresinde betülinik asit uygulamalarının ardından 25 µM dozda %7,5, 50 µM dozda betülinik asit uygulamasında ise %14,25 apoptotik hücre ölümü gözlenmiştir. (Şekil 4-3)

Kontrol grubu olarak kullandığımız MRC-5 hücre hattında doza bağımlı yapılan betülinik asit uygulamalarında betülinik asitin hücrelerin apoptozu üzerine etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. (Şekil 4-4)



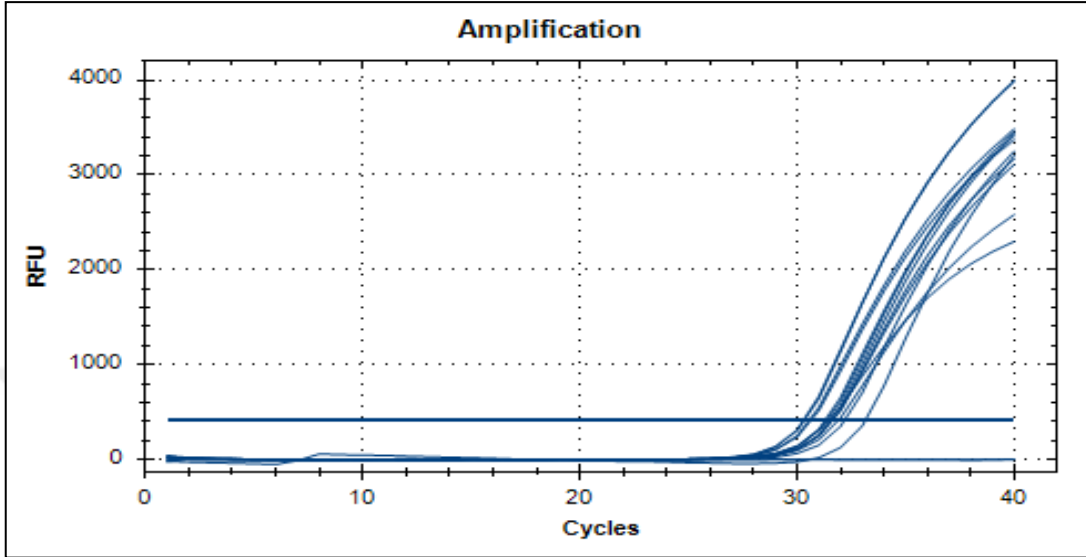
Şekil 4-3: CAKİ-2 hücre hattında Annexin V apoptoz tayini hücre ölümü grafiği



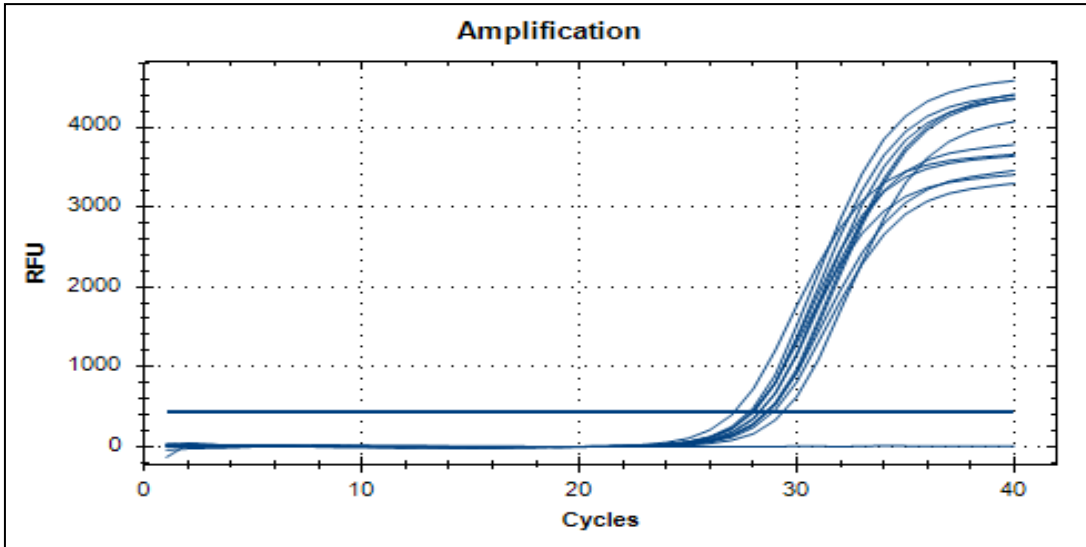
Şekil 4-4: MRC-5 hücre hattında Annexin V apoptoz tayini hücre ölümü grafiği

4.3. Real-Time PCR Gen Ekspresyonu Analizi Sonuçları

Real-Time PCR reaksiyonu sonrası AKT-1 ve mTOR genlerinin amplifikasyon grafiği Şekil 4-5 ve Şekil 4-6’da gösterilmiştir.



Şekil 4-5: AKT-1 geni Real-Time PCR amplifikasyon grafiği



Şekil 4-6: mTOR geni Real-Time PCR amplifikasyon grafiği

25 ve 50 μ M betülinik asit uygulamaları sonrası CAKİ-2 hücre hattında mTOR ve AKT-1 genine ait kat değişimleri Tablo 4.1 ve Şekil 4.7' de gösterilmiştir. Buna göre; Betülinik asit uygulaması yapılmayan CAKİ-2 hücre hattında MRC-5 sağlıklı hücre hattına göre AKT-1 gen anlatımının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir ($p=0,037$, %95 Güven Aralığı=0,16-0,97).

25 μ M betülinik asit uygulamalarında ise CAKİ-2 hücre hattında AKT-1 gen anlatımı istatistiksel olarak azalırken ($p=0,034$, %95 Güven Aralığı=0,53-0,64), mTOR gen anlatımı ise artış göstermiştir ($p=0,037$, %95 Güven Aralığı=0,16-1,05).

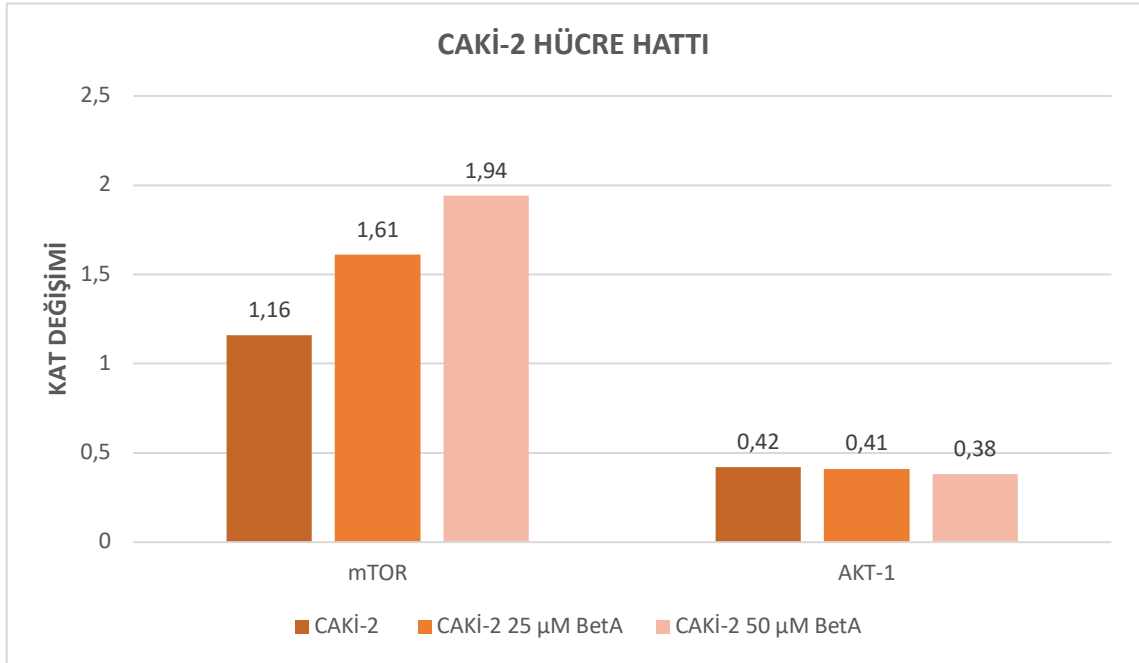
50 μ M betülinik asit uygulaması sonrasında yalnızca AKT-1 gen anlatımında istatistiksel olarak azalma gözlenmiştir ($p=0,037$, %95 Güven Aralığı=0,46-0,75).

İlaç uygulanmamış ve farklı dozlarda betülinik asit uygulanmış CAKİ-2 hücre hattında AKT-1 gen anlatımları arasında az da olsa azalma yönünde bir eğilim görülmekle birlikte anlamlı bir değişim olmadığı görülmektedir. mTOR gen anlatımında ise bir artış görülmekle beraber yine istatistiksel bir anlamlılık gözlenmemiştir.

Tablo 4-1: CAKİ-2 hücre hattında 25 μ M ve 50 μ M dozlarındaki betülinik asit uygulaması sonrası mTOR ve AKT-1 gen anlatımlarına ilişkin kat değişimleri

Hücre Hattı	mTOR (Kat Değişimi)	AKT-1 (Kat Değişimi)
CAKİ-2	1,16 $\pm$ 0,32	0,42 $\pm$ 0,16*
CAKİ-2 25 μM Betülinik Asit	1,61 $\pm$ 0,27*	0,41 $\pm$ 0,034**
CAKİ-2 50 μM Betülinik Asit	1,94 $\pm$ 1,16	0,38 $\pm$ 0,09*

* $p=0,037$, ** $p=0,034$



Şekil 4-7: CAKİ-2 hücre hattında betülinik asit uygulamaları sonrası mTOR ve AKT-1 gen anlatımlarına ilişkin kat değişimlerinin grafiksel gösterimi

5. TARTIŞMA

Böbrek kanseri, böbreğin herhangi bölgesinden köken alarak oluşan tüm tümörleri içerir [10]. Bu tümörler genellikle böbreğin renal tübül epitel bölgesinden köken alarak renal hücreli karsinoma (RCC) adını alır ve %90 oranında böbrek kanserinin en yaygın türünü oluşturur [3, 13]. RCC'nin en yaygın türü ise sitoplazmalarında lipid ve glikojen biriktirmeleriyle karakterize edilen hücrelerden oluşan berrak hücreli renal hücreli karsinoma (ccRCC)'dır [18]. RCC'nin spesifik tanı belirtilerini göstermemesi hastaların genellikle metastatik evrede teşhis edilmesine yol açmaktadır [10]. Bu nedenle teşhis sonrası tedavi seçeneklerini geliştirmek ve hastaların sağkalımını arttırmak amacıyla, hem hücresel apoptozu uyarıp hem de metastazı önleyebilen, biyolojik olarak uyumlu yeni ilaçlar geliştirmek son derece önemlidir.

Doğal kaynaklı yeni ilaç geliştirme hedefleri doğrultusunda genellikle bazı ağaç kabuklarında doğal olarak bulunan ve lupan tipi pentasiklik triterpenoid olan betülinik asit, antikanser etkinliği olduğu bilinen potansiyel bir ilaçtır [135]. Betülinik asitin kanser hücrelerini ve sağlıklı hücreleri ayırt ederek seçici toksisite özelliği göstermesi kemoterapinin ağır yan etkilerine karşı yeni kanser tedavisi araştırmaları için ilgi odağı olmuştur [124].

Kanser terapilerinde hedef molekül ve yolların blokajına veya aktivasyonuna yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Chen ve ark. antikanser aktivitesi olan ve bitki köklerinden elde edilen doğal bir bileşik olan Kriptotansinon (CPT: Cryptotanshinone) maddesinin, RCC hücre hatları A498, 786-0 ve ACHN üzerinde çeşitli moleküller vasıtasıyla antikanser aktivitesini araştırmışlardır. CCK-8 hücre proliferasyon testi ile CPT'nin hücre hatlarının canlılığını doza bağımlı olarak büyük ölçüde etkilediği görülmüştür. Ayrıca hücrelerde CPT uygulandıktan 48 saat sonra Anexin V testi ile apoptoz tayini yapılmış, erken apoptotik ve geç apoptotik hücre miktarında artış görülürken, kontrol grubuna kıyasla yaşayan hücre popülasyonunda da azalma görülmüştür. Western Blotting protein analizinde ise CPT'nin fosforillenmiş STAT3 miktarının ve dolayısıyla fosforillenmiş AKT miktarının azaldığı gözlemlenmiştir [144].

Ren ve ark. yaptıkları bir çalışmada RCC hücre hatları ACHN ve CAKİ-1' de apoptozu teşvik etmek de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktiviteleri bulunan Kantharidin maddesinin etkilerini araştırmışlardır. Buna göre; Kantharidin 20 μ M konsantrasyonda ve 48 saat inkübasyon süresinde ACHN ve CAKİ-1 hücrelerinde hücre canlılığını % 26 ve %32 oranında azalttığı gözlemlenmiştir. İmmünohistokimyasal analizlere göre ise, RCC'de yüksek oranda eksprese edilen ve hücre proliferasyonuna izin veren Notch1 ve Jagged1 ekspresyonları Kantharin uygulamasından 48 saat sonra önemli ölçüde azaldığı görülmüştür [145].

Liu ve ark. bir çalışmada, kaveol ailesine ait, farklı kanser türlerinde aşırı aktivasyonu olduğu bilinen Kaveolin 2 (CAV-2)' nin RCC dokularında ve hücre hatlarında ekspresyonu ve etkileri araştırılmıştır. RCC'de CAV-2'nin aşırı ekspresyonu görülmüş ve CAV-2 inaktive edildiğinde proliferasyon ve invazyonun azaldığı görülmüştür. Ek olarak, CAV-2'nin inaktive edilmesi EGFR, PI3K ve fosforillenmiş AKT ekspresyonlarını da azalttığı gösterilmiştir [146].

Zhang ve ark. RCC-949 hücre hattında kurkumin maddesinin hücre canlılığı, hücre siklusu ve apoptoz üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. RCC-949 hücre hattında kurkumin hücre canlılığını doza bağımlı olarak büyük ölçüde azalttığını ve Annexin V apoptoz tayininde 50 μ M konsantrasyonunda 24 saat inkübasyonda %40 oranında apoptotik hücre belirlenmiştir. Ayrıca, siklin B1'in analizi ile hücre siklusunu G₂/M fazında durdurduğunu, BCL-2 ekspresyonunu azaltırken BAX ekspresyonunu arttırdığını ve fosforillenmiş PI3K ve AKT miktarını azalttığı gözlenmiştir [147].

PI3K/AKT/mTOR yolağı ise çeşitli kanserlerde sıklıkla negatif regülasyonu olduğu bilinen bir yolaktır [148]. AKT-1 ve mTOR proteinlerinin hücre içerisinde aktive olabilmeleri için fosforillenmeleri gerekir. AKT-1'in fosforillenmesi PDK1 ve mTOR'un fonksiyonel komplekslerinden biri olan mTORC2 tarafından gerçekleşir. mTOR ise AKT'nin akış aşağısında yer alır ve düzenlenmesi yine AKT tarafından gerçekleşir [91, 149]

Xie ve ark. RCC hücre hattı ACHN'de çeşitli kanser türlerinde antikanser aktivitesi olduğu bilinen Bufalin maddesinin, PI3K/AKT/mTOR yolağına etkisini araştırmışlardır. p21, siklin B1 ve CDK1 ekspresyonlarını azaltarak hücre siklusunu G₂/M fazında durdurmuştur. Ayrıca bufalin, hücrelerdeki AKT ekspresyonlarında

önemli bir değişim meydana getirmezken, fosforillenmiş AKT ve onun aşağı akış sinyalinde bulunan fosforillenmiş mTOR seviyelerinde azalmaya neden olmuştur [150].

RCC hücre hattı ACHN'de sorafenib maddesinin AKT-1 inhibisyonuna ilişkin olarak Tei ve ark. çalışmalarında shRNA (short hairpin RNA) ile AKT-1 susturulduktan sonra sorafenib maddesi uygulamışlardır. Western Blotting analizi sonucunda ACHN/shAKT-1 hücrelerinde, kontrol vektörü içeren ACHN hücrelerine kıyasla AKT-1 miktarının kayda değer bir şekilde azaldığı belirlenmiştir [151].

Son yıllarda betülinik asitin antikanser özelliğinin farklı yollardaki etkisi üzerine bir çok kanser grubunda araştırmalar hız kazanmıştır.

Shankar ve ark. yaptıkları bir çalışmada, yapani tip p53 bulunduran LNCaP ve mutant p53 bulunduran DU145 prostat kanseri hücre hatlarında betülinik asitin p53 ve NF- κ B yolağı üzerinden antikanser etkisini araştırmışlardır. Betülinik asit temel olarak 10 ve 20 μ M konsantrasyonlarda BAX/BCL-2 oranındaki değişime bağlı olarak sitokrom C salınımına, kaspaz aktivasyonuna ve apoptoza neden olmuştur. Ayrıca betülinik asit uygulanması her iki hücre hattında da fosforillenmiş IKK α ekspresyonu azalmıştır. NF- κ B' yi Ser32/36' dan fosforilleyerek protein degradasyonuna ve NF- κ B'nin nukleusa yönelmesine neden olan I κ B α ekspresyonu da azalmıştır. LNCaP hücre hattında ise p53 ekspresyonunda değişiklik olmazken Ser15-p53 fosforilasyonu stabilizesini arttırmıştır, DU145 hücrelerinde ise Ser-p53 fosforilasyonunda değişiklik gözlenmemiştir [152].

Xu ve ark. betülinik asitin karaciğer kanserinde TRAIL fonksiyonu ile p53 ve kaspaz 3 aktivasyonu üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalarında, apoptozu indüklemeye yeteneği olan ve TRAIL olarak da bilinen APO2 ve betülinik asit birlikte uygulanıp sinerjistik etkilerine bakılmıştır. Buna göre; betülinik asit ve APO2, tek tek uygulandıklarındaki sonuçlara oranla birlikte uygulandıklarında hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı, kaspaz-3, kaspaz-8 ve p53 aktivitesini arttırdığı ve in vivoda FADD seviyelerini arttırdığı tespit edilmiştir [153].

Wang ve ark. bir çalışmalarında kolorektal kanseri hücre hatlarında betülinik asitin AKT/mTOR sinyal yolağı vasıtasıyla otofaji ve apoptozu tetiklediğini analiz etmişlerdir. Çalışmada kullanılan tüm hücre hatlarına betülinik asit uygulanması sonrası AKT (S473) ve mTOR (2448) fosforilasyonunu inhibe ettiği ve böylece betülinik asitin AKT/mTOR sinyalini inhibe ederek otofajiyi aktive ettiği ortaya çıkarılmıştır [154].

Lupan tipi pentasiklik triterpenoidlerden biri olan betülin maddesinin 786-O ve CAKİ-2 RCC hücre hatlarında mTOR inaktivasyonuna ilişkin Cheng ve ark. bir çalışmasına göre; mTOR aktivasyonun olduğu 786-O hücrelerine ve mTOR'un inaktive edildiği CAKİ-2 hücrelerine betülin uygulaması sonrası 786-O hücrelerinin betüline daha duyarlı olduğu görülmüştür. Daha sonra CAKİ-2 hücrelerinde mTOR inhibitörü TSC2'nin inaktive edilmesi 786-O hücrelerine benzer sonuçlar vermiştir. Tam tersine 786-O hücrelerinde mTOR inaktif edildiğinde betülinin inhibitör etkisinin azaldığı görülmüştür. Böylece RCC'de betülin tedavisinde mTOR'un kilit bir rolü olduğu belirlenmiştir [155].

Xu ve ark. servikal kanser hücre hattı HeLa hücrelerine betülinik asit uygulayarak yaptıkları analizlere göre; betülinik asit uygulaması HeLa hücrelerinde ROS üretimini, ve kaspaz-9 aktivitesini arttırmıştır. Bununla birlikte fosforillenmiş AKT; AKT(Ser473) ve AKT(Thr308) ve PI3K (p110 α), PI3K (p85) ekspresyonlarını önemli ölçüde azaltmıştır [156].

Bu çalışmalara ek olarak betülinik asit yine benzer şekilde kolorektal kanser hücrelerinde in vivo ve in vitro çalışmalarda mitokondri membran potansiyeli analizi yapılmış ve mitokondriyal yolak ile apoptozu indükleyip metaztazı inhibe ettiği gösterilmiştir [143].

Yang ve ark. RCC hücre hatları 786-O ve ACHN' de betülinik asitin antikanser etkileri üzerine yaptıkları çalışmada; hücreler üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğu, BCL-2 ekspresyonunu azaltıp BAX ve kaspaz 3 ekspresyonunu arttırarak mitokondriyal yolak vasıtasıyla apoptozu başlattığı tespit edilmiştir [157].

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre; CAKİ-2 berrak hücreli renal karsinoma hücre hattında uygulanan betülinik asit sonrasında apoptoz ve nekroz tayini için yaptığımız Annexin-V testinde 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarda toplamda %21,25 apoptotik hücre ölümü tespit edilmiş ve bu sonuç literatür taramasında elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Bununla birlikte, kontrol grubu olarak kullandığımız MRC-5 hücre hattına uygulanan betülinik asitin hücrelerin apoptozu üzerine etkisinin olmaması betülinik asitin sağlıklı hücrelerde sitotoksositeye neden olmadan antikanser ilaç olarak kullanılma özelliğini güçlendirmiştir.

CAKİ-2 ve MRC-5 hücre hatlarında doza bağımlı olarak yaptığımız gen ekspresyonu çalışmalarında ise AKT-1 ve mTOR genlerinin ekspresyon analizi yapılmıştır. Yapılan çalışmalara göre; hücrelerinde proliferasyona ve sağkalıma katkı sağladığı bilinen ve RCC’de daha önce çalışılan AKT-1 ve mTOR genlerinin Real-Time PCR ekspresyon analizlerine göre; doza bağımlı olarak 25 ve 50 μ M’de AKT-1 gen anlatımında istatistiksel olarak azalma görülmüştür. mTOR gen anlatımında ise AKT-1’in aksine gen anlatımında artış görülmüştür. Ancak, AKT-1 gen anlatımında meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir.

Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda, betülinik asitin RCC’de veya farklı kanser türlerindeki PI3K/AKT/mTOR yolağına etkisi, farklı analiz yöntemleri kullanılarak daha iyi aydınlatılabilir. İleriye yönelik çalışmalar için farklı yollara odaklanması betülinik asitin gen anlatımı ve protein düzeylerine spesifik etkisinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1] W. H. da Costa, G. Jabboure, I. W. da Cunha, and I. W. da Cunha, "Urological cancer related to familial syndromes.," *Int. Braz J Urol*, vol. 43, no. 2, pp. 192–201, 2017.
- [2] W.-H. Chow, L. M. Dong, and S. S. Devesa, "Epidemiology and risk factors for kidney cancer," *Nat. Rev. Urol.*, vol. 7, no. 5, pp. 245–257, May 2010.
- [3] J. N. Eble, G. Sauter, J. I. Epstein, and I. A. Sesterhenn, "Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs," 2004.
- [4] K. Inamura, "Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 10, p. 2195, Oct. 2017.
- [5] M. Ghaffari Moghaddam, F. Bin H. Ahmad, and A. Samzadeh-Kermani, "Biological Activity of Betulinic Acid: A Review," *Pharmacol. & Pharm.*, vol. 03, no. 02, pp. 119–123, Apr. 2012.
- [6] J. Ríos and S. Máñez, "New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid," *Planta Med.*, vol. 84, no. 01, pp. 8–19, Jan. 2018.
- [7] D. A. Nedopekina *et al.*, "Mitochondria-targeted betulinic and ursolic acid derivatives: synthesis and anticancer activity.," *Medchemcomm*, vol. 8, no. 10, pp. 1934–1945, Oct. 2017.
- [8] T. Ersahin, N. Tuncbag, and R. Cetin-Atalay, "The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway," *Mol. Biosyst.*, vol. 11, no. 7, pp. 1946–1954, 2015.
- [9] H. Guo *et al.*, "The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma," *J. Genet. Genomics*, vol. 42, no. 7, pp. 343–353, Jul. 2015.
- [10] R. J. Motzer, D. M. Nanus, P. Russo, and W. J. Berg, "Renal cell carcinoma," *Curr. Probl. Cancer*, vol. 21, no. 4, pp. 185–232, Jul. 1997.
- [11] W. M. Linehan and C. J. Ricketts, "The metabolic basis of kidney cancer," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 46–55, Feb. 2013.
- [12] U. Capitanio and F. Montorsi, "Renal cancer," *Lancet*, vol. 387, no. 10021, pp. 894–906, Feb. 2016.
- [13] J. J. Hsieh *et al.*, "Renal cell carcinoma," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, p. 17009, Mar. 2017.
- [14] A. Kumar, N. Kumari, V. Gupta, and R. Prasad, "Renal Cell Carcinoma:

- Molecular Aspects,” *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 33, no. 3, pp. 246–254, Jul. 2018.
- [15] S. D. O’Connor, P. J. Pickhardt, D. H. Kim, M. R. Oliva, and S. G. Silverman, “Incidental Finding of Renal Masses at Unenhanced CT: Prevalence and Analysis of Features for Guiding Management,” *Am. J. Roentgenol.*, vol. 197, no. 1, pp. 139–145, Jul. 2011.
- [16] N. R. Dunnick, “Renal cell carcinoma: staging and surveillance,” *Abdom. Radiol.*, vol. 41, no. 6, pp. 1079–1085, Jun. 2016.
- [17] H. Moch, A. L. Cubilla, P. A. Humphrey, V. E. Reuter, and T. M. Ulbright, “The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours,” *Eur. Urol.*, vol. 70, no. 1, pp. 93–105, Jul. 2016.
- [18] D. J. Sanchez and M. C. Simon, “Genetic and metabolic hallmarks of clear cell renal cell carcinoma,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1870, no. 1, pp. 23–31, Aug. 2018.
- [19] L. Ananthakrishnan, P. Kapur, and J. R. Leyendecker, “The spectrum of renal cell carcinoma in adults,” *Abdom. Radiol.*, vol. 41, no. 6, pp. 1052–1065, Jun. 2016.
- [20] H. Ross, G. Martignoni, and P. Argani, “Renal Cell Carcinoma With Clear Cell and Papillary Features,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 136, no. 4, pp. 391–399, Apr. 2012.
- [21] G. Courthod, M. Tucci, M. Di Maio, and G. V. Scagliotti, “Papillary renal cell carcinoma: A review of the current therapeutic landscape,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 96, no. 1, pp. 100–112, Oct. 2015.
- [22] B. C. Liaw, R. Mehrazin, C. Baker, J. P. Sfakianos, and C.-K. Tsao, “Management of Atypical Renal Cell Carcinomas,” *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 18, no. 10, p. 61, Oct. 2017.
- [23] J. Gordetsky and J. Zarzour, “Correlating Preoperative Imaging with Histologic Subtypes of Renal Cell Carcinoma and Common Mimickers,” *Curr. Urol. Rep.*, vol. 17, no. 7, p. 52, Jul. 2016.
- [24] “Kidney cancer statistics | World Cancer Research Fund.” [Online]. Available: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/kidney-cancer-statistics>. [Accessed: 03-Jan-2019].

- [25] “Global Cancer Observatory.” [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/>. [Accessed: 23-Mar-2019].
- [26] U. Capitanio *et al.*, “Epidemiology of Renal Cell Carcinoma,” *Eur. Urol.*, vol. 75, no. 1, pp. 74–84, Jan. 2019.
- [27] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018.
- [28] R. Tahbaz, M. Schmid, and A. S. Merseburger, “Prevention of kidney cancer incidence and recurrence,” *Curr. Opin. Urol.*, p. 1, Oct. 2017.
- [29] S. H. Mahdavi N., Mohammadian M., Ghoncheh M., “Incidence, mortality and risk factors of kidney cancer in the world - WCRJ,” *World Cancer Res. J.*, vol. 5, no. 1, p. e1013, 2018.
- [30] J. Clague *et al.*, “Sensitivity to NNKOAc is associated with renal cancer risk,” *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 4, pp. 706–710, 2009.
- [31] N. Petejova and A. Martinek, “Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors,” vol. 160, no. 2, pp. 183–194, 2016.
- [32] E. Grossman, F. H. Messerli, V. Boyko, and U. Goldbourt, “Is there an association between hypertension and cancer mortality?,” *Am. J. Med.*, vol. 112, no. 6, pp. 479–486, Apr. 2002.
- [33] N. J. Kocher, C. Rjepaj, H. Robyak, E. Lehman, and J. D. Raman, “Hypertension is the primary component of metabolic syndrome associated with pathologic features of kidney cancer,” *World J. Urol.*, vol. 35, no. 1, pp. 67–72, Jan. 2017.
- [34] M. Terris, Z. Klaassen, and R. Kabaria, “Renal cell carcinoma: links and risks,” *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.*, vol. 9, p. 45, Mar. 2016.
- [35] A. Otunctemur *et al.*, “Diabetes mellitus as a risk factor for high grade renal cell carcinoma,” *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 15, no. 9, pp. 3993–6, 2014.
- [36] A. Kawashima, S. W. Young, N. Takahashi, B. F. King, and T. D. Atwell, “Inherited renal carcinomas,” *Abdom. Radiol.*, vol. 41, no. 6, pp. 1066–1078, Jun. 2016.
- [37] L. Gossage, T. Eisen, and E. R. Maher, “VHL, the story of a tumour suppressor gene,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 55–64, Jan. 2015.
- [38] A. A. Batavia, P. Schraml, and H. Moch, “Clear cell renal cell carcinoma with

- wild-type *von Hippel-Lindau* gene: a non-existent or new tumour entity?,” *Histopathology*, vol. 74, no. 1, pp. 60–67, Jan. 2019.
- [39] E. R. Maher, J. R. Yates, and M. A. Ferguson-Smith, “Statistical analysis of the two stage mutation model in von Hippel-Lindau disease, and in sporadic cerebellar haemangioblastoma and renal cell carcinoma,” *J. Med. Genet.*, vol. 27, no. 5, pp. 311–4, May 1990.
 - [40] I. Ben-Skowronek and S. Kozaczuk, “Von Hippel-Lindau Syndrome,” *Horm. Res. Paediatr.*, vol. 84, no. 3, pp. 145–152, 2015.
 - [41] L. S. Schmidt and W. M. Linehan, “Genetic predisposition to kidney cancer,” *Semin. Oncol.*, vol. 43, no. 5, pp. 566–574, Oct. 2016.
 - [42] A. J. Adeniran, B. Shuch, and P. A. Humphrey, “Hereditary Renal Cell Carcinoma Syndromes,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 39, no. 12, pp. e1–e18, Dec. 2015.
 - [43] C. P. Pavlovich and L. S. Schmidt, “Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 5, pp. 381–393, May 2004.
 - [44] N. Gupta, B. Y. Sunwoo, and R. M. Kotloff, “Birt-Hogg-Dubé Syndrome,” *Clin. Chest Med.*, vol. 37, no. 3, pp. 475–486, Sep. 2016.
 - [45] L. S. Schmidt and W. M. Linehan, “Molecular genetics and clinical features of Birt-Hogg-Dubé syndrome,” *Nat. Rev. Urol.*, vol. 12, no. 10, pp. 558–69, Oct. 2015.
 - [46] M. Baba *et al.*, “Kidney-targeted Birt-Hogg-Dube gene inactivation in a mouse model: Erk1/2 and Akt-mTOR activation, cell hyperproliferation, and polycystic kidneys,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 100, no. 2, pp. 140–54, Jan. 2008.
 - [47] N. Kuroda *et al.*, “Review of hereditary leiomyomatosis renal cell carcinoma with focus on clinical and pathobiological aspects of renal tumors,” *Polish J. Pathol.*, vol. 68, no. 4, pp. 284–290, 2017.
 - [48] V. M. Patel, M. Z. Handler, R. A. Schwartz, and W. C. Lambert, “Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome: An update and review,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 77, no. 1, pp. 149–158, Jul. 2017.
 - [49] C. G. Przybycin, C. Magi-Galluzzi, and J. K. McKenney, “Hereditary Syndromes With Associated Renal Neoplasia,” *Adv. Anat. Pathol.*, vol. 20, no. 4, pp. 245–263, Jul. 2013.
 - [50] N. B. Haas and K. L. Nathanson, “Hereditary kidney cancer syndromes,” *Adv.*

- Chronic Kidney Dis.*, vol. 21, no. 1, pp. 81–90, Jan. 2014.
- [51] H. C. Lam, J. Nijmeh, and E. P. Henske, “New developments in the genetics and pathogenesis of tumours in tuberous sclerosis complex.,” *J. Pathol.*, vol. 241, no. 2, pp. 219–225, Jan. 2017.
 - [52] F. J. Geske and L. E. Gerschenson, “The biology of apoptosis,” *Hum. Pathol.*, vol. 32, no. 10, pp. 1029–1038, Oct. 2001.
 - [53] A. G. Renehan, C. Booth, and C. S. Potten, “What is apoptosis, and why is it important?,” *BMJ*, vol. 322, no. 7301, pp. 1536–8, Jun. 2001.
 - [54] K. J. Barnum and M. J. O’Connell, “Cell cycle regulation by checkpoints.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1170, pp. 29–40, 2014.
 - [55] P. Nurse, “A long twentieth century of the cell cycle and beyond.,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 71–8, Jan. 2000.
 - [56] G. Liccardi and L. L. Fava, “Fiat Lux: illuminating the cell cycle,” *Cell Death Discov.*, vol. 3, p. 17042, Jul. 2017.
 - [57] C. H. Golias, A. Charalabopoulos, and K. Charalabopoulos, “Cell proliferation and cell cycle control: a mini review,” *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 58, no. 12, pp. 1134–1141, Oct. 2004.
 - [58] C. Gérard and A. Goldbeter, “Dynamics of the mammalian cell cycle in physiological and pathological conditions,” *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 8, no. 2, pp. 140–156, Mar. 2016.
 - [59] C. Bertoli, J. M. Skotheim, and R. A. M. de Bruin, “Control of cell cycle transcription during G1 and S phases.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, no. 8, pp. 518–28, Aug. 2013.
 - [60] J. P. Matson and J. G. Cook, “Cell cycle proliferation decisions: the impact of single cell analyses.,” *FEBS J.*, vol. 284, no. 3, pp. 362–375, 2017.
 - [61] H. W. Yang, M. Chung, T. Kudo, and T. Meyer, “Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry,” *Nature*, vol. 549, no. 7672, pp. 404–408, Sep. 2017.
 - [62] J. Chen, “The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, no. 3, p. a026104, Mar. 2016.
 - [63] S. Elmore, “Apoptosis: a review of programmed cell death.,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, Jun. 2007.

- [64] R. S. Y. Wong, "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment.," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 30, no. 1, p. 87, Sep. 2011.
- [65] Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim, and Y. Baran, "Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis," *Tumor Biol.*, vol. 37, no. 7, pp. 8471–8486, Jul. 2016.
- [66] K. Matsuura, K. Canfield, W. Feng, and M. Kurokawa, "Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer.," *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, vol. 327, pp. 43–87, 2016.
- [67] C. Loreto *et al.*, "The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 616149, Aug. 2014.
- [68] J. Plati, O. Bucur, and R. Khosravi-Far, "Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy.," *Integr. Biol. (Camb).*, vol. 3, no. 4, pp. 279–96, Apr. 2011.
- [69] Y. Shi, "Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis," *Mol. Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 459–470, Mar. 2002.
- [70] M. G. Grütter, "Caspases: key players in programmed cell death," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 649–655, Dec. 2000.
- [71] G. Pistritto, D. Trisciuglio, C. Ceci, A. Garufi, and G. D'Orazi, "Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies.," *Aging (Albany. NY).*, vol. 8, no. 4, pp. 603–19, 2016.
- [72] K.-M. Debatin, "Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 53, no. 3, pp. 153–159, Mar. 2004.
- [73] C. Burz, I. Berindan-Neagoe, O. Balacescu, and A. Irimie, "Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets," *Acta Oncol. (Madr).*, vol. 48, no. 6, pp. 811–821, Jan. 2009.
- [74] S. Zaman, R. Wang, and V. Gandhi, "Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies.," *Leuk. Lymphoma*, vol. 55, no. 9, pp. 1980–92, Sep. 2014.
- [75] C. M. Pfeffer and A. T. K. Singh, "Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, Feb. 2018.
- [76] N. Dashzeveg and K. Yoshida, "Cell death decision by p53 via control of the mitochondrial membrane," *Cancer Lett.*, vol. 367, no. 2, pp. 108–112, Oct. 2015.
- [77] K. Yamada and K. Yoshida, "Mechanical insights into the regulation of

- programmed cell death by p53 via mitochondria,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1866, no. 5, pp. 839–848, May 2019.
- [78] T. P. Garner, A. Lopez, D. E. Reyna, A. Z. Spitz, and E. Gavathiotis, “Progress in targeting the BCL-2 family of proteins,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 39, pp. 133–142, Aug. 2017.
- [79] M. Muraki, “Heterologous Production of Death Ligands’ and Death Receptors’ Extracellular Domains: Structural Features and Efficient Systems,” *Protein Pept. Lett.*, vol. 19, no. 8, pp. 867–879, Jul. 2012.
- [80] K. Sinha, J. Das, P. B. Pal, and P. C. Sil, “Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis,” *Arch. Toxicol.*, vol. 87, no. 7, pp. 1157–1180, Jul. 2013.
- [81] G. Denecker, D. Vercammen, W. Declercq, and P. Vandenabeele, “Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 3, pp. 356–370, Mar. 2001.
- [82] D. R. Green and F. Llambi, “Cell Death Signaling,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 12, Dec. 2015.
- [83] L. Martinez-Lostao, A. Anel, M. Regner, C. J. Froelich, and J. Pardo, “Immunological Cytotoxic Factors,” in *eLS*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.
- [84] K. Fernald and M. Kurokawa, “Evading apoptosis in cancer,” *Trends Cell Biol.*, vol. 23, no. 12, pp. 620–33, Dec. 2013.
- [85] J. R. Mills *et al.*, “mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 31, pp. 10853–8, Aug. 2008.
- [86] C. Vaughan, I. Pearsall, A. Yeudall, S. P. Deb, and S. Deb, “p53: Its Mutations and Their Impact on Transcription,” 2014, pp. 71–90.
- [87] S. XU, G. SUI, L. YUAN, and Z. ZOU, “Expression of programmed cell death 5 protein inhibits progression of lung carcinoma in vitro and in vivo via the mitochondrial apoptotic pathway,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 10, no. 4, pp. 2059–2064, Oct. 2014.
- [88] L. Fang, L. Sun, F.-F. Hu, and Q.-E. Chen, “Effects of FasL expression in oral squamous cell cancer,” *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 14, no. 1, pp. 281–5, 2013.

- [89] G. Song, G. Ouyang, and S. Bao, "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 9, no. 1, pp. 59–71, Jan. 2005.
- [90] I. Hers, E. E. Vincent, and J. M. Tavaré, "Akt signalling in health and disease," *Cellular Signalling*. 2011.
- [91] B. D. Manning and A. Toker, "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network.," *Cell*, vol. 169, no. 3, pp. 381–405, 2017.
- [92] I. Hers, E. E. Vincent, and J. M. Tavaré, "Akt signalling in health and disease," *Cell. Signal.*, vol. 23, no. 10, pp. 1515–1527, Oct. 2011.
- [93] B. D. Manning and L. C. Cantley, "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream," *Cell*, vol. 129, no. 7, p. 1261, 2007.
- [94] A. R. Clark and A. Toker, "Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer.," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 42, no. 5, pp. 1349–55, Oct. 2014.
- [95] "A - Genes - Genetics Home Reference - NIH." [Online]. Available: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene>. [Accessed: 05-Apr-2019].
- [96] E. Gonzalez and T. E. McGraw, "The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 16, p. 2502, 2009.
- [97] M. Song, A. M. Bode, Z. Dong, and M.-H. Lee, "AKT as a Therapeutic Target for Cancer," *Cancer Res.*, vol. 79, no. 6, pp. 1019–1031, Mar. 2019.
- [98] J. Polivka and F. Janku, "Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway," *Pharmacol. Ther.*, vol. 142, no. 2, pp. 164–175, May 2014.
- [99] W.-L. Fang *et al.*, "Mutations in PI3K/AKT pathway genes and amplifications of PIK3CA are associated with patterns of recurrence in gastric cancers.," *Oncotarget*, vol. 7, no. 5, pp. 6201–20, Feb. 2016.
- [100] Y. Dobashi, E. Sato, Y. Oda, J. Inazawa, and A. Ooi, "Significance of Akt activation and AKT gene increases in soft tissue tumors," *Hum. Pathol.*, vol. 45, no. 1, pp. 127–136, Jan. 2014.
- [101] M. Jhanwar-Uniyal, A. G. Amin, J. B. Cooper, K. Das, M. H. Schmidt, and R. Murali, "Discrete signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2: Connected yet apart in cellular and molecular aspects," *Adv. Biol. Regul.*, vol. 64, pp. 39–48, May 2017.
- [102] "M - Genes - Genetics Home Reference - NIH." [Online]. Available: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene?initial=m>. [Accessed: 21-Mar-2019].

- [103] M. Cargnello, J. Tcherkezian, and P. P. Roux, "The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation," *Mutagenesis*, vol. 30, pp. 169–176, 2015.
- [104] M. Laplante and D. M. Sabatini, "mTOR signaling in growth control and disease.," *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 274–93, Apr. 2012.
- [105] M. Cargnello, J. Tcherkezian, and P. P. Roux, "The expanding role of mTOR in cancer cell growth and proliferation.," *Mutagenesis*, vol. 30, no. 2, pp. 169–76, Mar. 2015.
- [106] P. S. Ong, L. Z. Wang, X. Dai, S. H. Tseng, S. J. Loo, and G. Sethi, "Judicious Toggling of mTOR Activity to Combat Insulin Resistance and Cancer: Current Evidence and Perspectives," *Front. Pharmacol.*, vol. 7, p. 395, Oct. 2016.
- [107] D. Liko and M. N. Hall, "mTOR in health and in sickness," *J. Mol. Med.*, vol. 93, no. 10, pp. 1061–1073, Oct. 2015.
- [108] Y. El Hiani, E. E.-A. Egom, and X.-P. Dong, "mTOR signalling: jack-of-all-trades," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 97, no. 1, pp. 58–67, Feb. 2019.
- [109] R. J. Shaw and L. C. Cantley, "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth," *Nature*, vol. 441, no. 7092, pp. 424–430, May 2006.
- [110] L. C. Kim, R. S. Cook, and J. Chen, "mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment.," *Oncogene*, vol. 36, no. 16, pp. 2191–2201, 2017.
- [111] K. Huang and D. C. Fingar, "Growing knowledge of the mTOR signaling network.," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 36, pp. 79–90, Dec. 2014.
- [112] R. A. Saxton and D. M. Sabatini, "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease," *Cell*, vol. 168, no. 6, pp. 960–976, Mar. 2017.
- [113] Q. W. Fan, T. P. Nicolaides, and W. A. Weiss, "Inhibiting 4EBP1 in Glioblastoma.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 14–21, 2018.
- [114] H. Pópulo, J. M. Lopes, and P. Soares, "The mTOR signalling pathway in human cancer.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 2, pp. 1886–918, 2012.
- [115] S. Umemura *et al.*, "Therapeutic priority of the PI3K/AKT/mTOR pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis.," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 9, no. 9, pp. 1324–31, Sep. 2014.
- [116] R.-F. Xiang *et al.*, "MK2206 enhances the cytotoxic effects of bufalin in multiple myeloma by inhibiting the AKT/mTOR pathway.," *Cell Death Dis.*, vol. 8, no. 5, p. e2776, 2017.
- [117] C. Chen, T. S. Liu, S. C. Zhao, W. Z. Yang, Z. P. Chen, and Y. Yan, "XIAP

- impairs mitochondrial function during apoptosis by regulating the Bcl-2 family in renal cell carcinoma,” *Exp. Ther. Med.*, vol. 15, no. 5, pp. 4587–4593, May 2018.
- [118] M. Pandurangan, B. Mistry, G. Enkhataivan, and D. H. Kim, “Efficacy of carnosine on activation of caspase 3 and human renal carcinoma cell inhibition,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 92, pp. 377–382, Nov. 2016.
- [119] Y. Li *et al.*, “Enhancement of death receptor 4-mediated apoptosis and cytotoxicity in renal cell carcinoma cells by anisomycin,” *Anticancer. Drugs*, vol. 28, no. 2, pp. 180–186, Feb. 2017.
- [120] A. Rayan, J. Raiyn, and M. Falah, “Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity,” *PLoS One*, vol. 12, no. 11, p. e0187925, 2017.
- [121] Z. Xiao, S. L. Morris-Natschke, and K.-H. Lee, “Strategies for the Optimization of Natural Leads to Anticancer Drugs or Drug Candidates,” *Med. Res. Rev.*, vol. 36, no. 1, pp. 32–91, Jan. 2016.
- [122] H. Gali-Muhtasib, R. Hmadi, M. Kareh, R. Tohme, and N. Darwiche, “Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis,” *Apoptosis*, vol. 20, no. 12, pp. 1531–1562, Dec. 2015.
- [123] A. M. L. Seca and D. C. G. A. Pinto, “Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 1, Jan. 2018.
- [124] W. Setzer and M. Setzer, “Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic Agents,” *Mini-Reviews Med. Chem.*, vol. 3, no. 6, pp. 540–556, Sep. 2003.
- [125] A. Petronelli, G. Pannitteri, and U. Testa, “Triterpenoids as new promising anticancer drugs,” *Anticancer. Drugs*, vol. 20, no. 10, pp. 880–892, Nov. 2009.
- [126] M. Zhou, R.-H. Zhang, M. Wang, G.-B. Xu, and S.-G. Liao, “Prodrugs of triterpenoids and their derivatives,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 131, pp. 222–236, May 2017.
- [127] J. M.R. Patlolla and C. V. Rao, “Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects,” *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 13, no. 1, pp. 147–155, Jan. 2012.
- [128] F. Xu, X. Huang, H. Wu, and X. Wang, “Beneficial health effects of lupenone

- triterpene: A review,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 103, pp. 198–203, Jul. 2018.
- [129] M. Laszczyk, “Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy,” *Planta Med.*, vol. 75, no. 15, pp. 1549–1560, Dec. 2009.
- [130] S.-R. Wang and W.-S. Fang, “Pentacyclic Triterpenoids and Their Saponins with Apoptosis-Inducing Activity,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 9, no. 16, pp. 1581–1596, Nov. 2009.
- [131] S. Prasad, N. Nigam, N. Kalra, and Y. Shukla, “Regulation of signaling pathways involved in lupeol induced inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells,” *Mol. Carcinog.*, vol. 47, no. 12, pp. 916–924, Dec. 2008.
- [132] P. Dzubak *et al.*, “Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 23, no. 3, p. 394, Jun. 2006.
- [133] “Betulinic acid | C₃₀H₄₈O₃ - PubChem.” [Online]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/betulinic_acid. [Accessed: 02-Apr-2019].
- [134] M. Yu, J. E. Ocando, L. Trombetta, and P. Chatterjee, “Molecular Interaction Studies of Amorphous Solid Dispersions of the Antimelanoma Agent Betulinic Acid,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 16, no. 2, pp. 384–397, Apr. 2015.
- [135] X. Zhang, J. Hu, and Y. Chen, “Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 14, no. 5, pp. 4489–4495, Nov. 2016.
- [136] S. Fulda *et al.*, “Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 51, pp. 33942–8, Dec. 1998.
- [137] P. Kumar, A. S. Bhadauria, A. K. Singh, and S. Saha, “Betulinic acid as apoptosis activator: Molecular mechanisms, mathematical modeling and chemical modifications,” *Life Sci.*, vol. 209, pp. 24–33, Sep. 2018.
- [138] S. Fulda *et al.*, “Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors,” *Cancer Res.*, vol. 57, no. 21, pp. 4956–64, Nov. 1997.
- [139] W. Wick, C. Grimm, B. Wagenknecht, J. Dichgans, and M. Weller, “Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing,” *J.*

- Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 289, no. 3, pp. 1306–12, Jun. 1999.
- [140] E. Selzer *et al.*, “Effects of Betulinic Acid Alone and in Combination with Irradiation in Human Melanoma Cells,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 114, no. 5, pp. 935–940, May 2000.
- [141] F. S. G. Silva, P. J. Oliveira, and M. F. Duarte, “Oleanolic, Ursolic, and Betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion?,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 64, no. 15, pp. 2991–3008, Apr. 2016.
- [142] H. Shen, L. Liu, Y. Yang, W. Xun, K. Wei, and G. Zeng, “Betulinic Acid Inhibits Cell Proliferation in Human Oral Squamous Cell Carcinoma via Modulating ROS-Regulated p53 Signaling,” *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.*, vol. 25, no. 7, pp. 1141–1152, Aug. 2017.
- [143] A. Zeng, H. Hua, L. Liu, and J. Zhao, “Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo,” *Bioorg. Med. Chem.*, Mar. 2019.
- [144] Z. Chen *et al.*, “Cryptotanshinone inhibits proliferation yet induces apoptosis by suppressing STAT3 signals in renal cell carcinoma,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 30, pp. 50023–50033, Jul. 2017.
- [145] Y. Ren *et al.*, “Cantharidin induces G2/M arrest and triggers apoptosis in renal cell carcinoma,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 14, no. 6, pp. 5614–5618, Dec. 2016.
- [146] F. Liu, Z. Shangli, and Z. Hu, “CAV2 promotes the growth of renal cell carcinoma through the EGFR/PI3K/Akt pathway,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 11, pp. 6209–6216, 2018.
- [147] H. Zhang *et al.*, “Curcumin Promotes Cell Cycle Arrest and Inhibits Survival of Human Renal Cancer Cells by Negative Modulation of the PI3K/AKT Signaling Pathway,” *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 73, no. 3, pp. 681–686, Dec. 2015.
- [148] J. S. O’Donnell, D. Massi, M. W. L. Teng, and M. Mandala, “PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 48, pp. 91–103, Feb. 2018.
- [149] T. Tian, X. Li, J. Zhang, T. Tian, X. Li, and J. Zhang, “mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 3, p. 755, Feb. 2019.
- [150] J. Xie *et al.*, “Bufalin suppresses the proliferation and metastasis of renal cell

- carcinoma by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.,” *Oncol. Lett.*, vol. 16, no. 3, pp. 3867–3873, Sep. 2018.
- [151] H. Tei, H. Miyake, and M. Fujisawa, “Enhanced sensitivity to sorafenib by inhibition of Akt1 expression in human renal cell carcinoma ACHN cells both in vitro and in vivo,” *Hum. Cell*, vol. 28, no. 3, pp. 114–121, Jul. 2015.
- [152] E. Shankar, A. Zhang, D. Franco, and S. Gupta, “Betulinic Acid-Mediated Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells Involves p53 and Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB) Pathways.,” *Molecules*, vol. 22, no. 2, Feb. 2017.
- [153] Y. Xu, J. Li, Q.-J. Li, Y.-L. Feng, and F. Pan, “Betulinic acid promotes TRAIL function on liver cancer progression inhibition through p53/Caspase-3 signaling activation,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 88, pp. 349–358, Apr. 2017.
- [154] S. Wang *et al.*, “Overaccumulation of p53-mediated autophagy protects against betulinic acid-induced apoptotic cell death in colorectal cancer cells.,” *Cell Death Dis.*, vol. 8, no. 10, p. e3087, 2017.
- [155] W. Cheng *et al.*, “mTOR activation is critical for betulin treatment in renal cell carcinoma cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 482, no. 4, pp. 1030–1036, Jan. 2017.
- [156] T. Xu, Q. Pang, Y. Wang, and X. Yan, “Betulinic acid induces apoptosis by regulating PI3K/Akt signaling and mitochondrial pathways in human cervical cancer cells.,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 40, no. 6, pp. 1669–1678, Dec. 2017.
- [157] C. Yang, Y. Li, L. Fu, T. Jiang, and F. Meng, “Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human renal carcinoma cells in vitro and in vivo,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 10, pp. 8611–8622, Oct. 2018.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

BÖBREK KANSERİ HÜCRE HATTINDA BETÜLİNİK ASİTİN APOPTOZ İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYONLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%2	%1	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	AYDOĞAN, Tuğba Kiriş, AKBULUT, Saadet, KİRİŞ, Ayşenur, BİRELLER, Elif Sinem, ÇAKMAKOĞLU, Bedia Çakmakoğlu and TABAKOĞLU, Haşim Özgür. "Chlorine e6 tabanlı Fotodinamik Terapinin MiaPaCa-2 ve MRC-5 hücreleri üzerindeki etkisi", Mustafa Hasbahçeci, 2017. Yayın	<%1
3	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	thieme-connect.de İnternet Kaynağı	<%1
5	Zhang, Hengyuan, Peiqing Zhu, Jie Liu, Xue Yang, Shengtao Xu, Hequan Yao, Jieyun Jiang, Wencai Ye, Xiaoming Wu, and Jinyi Xu.	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Merve Nur	Soyadı	Ataş
Doğ.Yeri	Beykoz	Doğ.Tar.	18.06.1994
Uyruğu	TC	TC Kim No	11111910768
Email	atasmervenur@gmail.com	Tel	05362497509

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp AD	2019
Lisans	İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2016
Lise	Üsküdar Çengelköy Lisesi	2012

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	orta	orta		71,25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	74,15	74,29	68,10
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Ms.Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

