

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**EGFR MUTANT KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ
GELİŞİMİNDE VE KEMOTERAPİ DİRENCİNDE ÇOK
POTANSİYELLİLİĞİN ROLÜ**

DOKTORA TEZİ

İrem DOĞAN

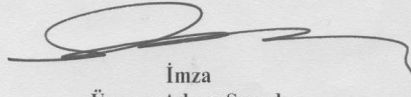
Tez Danışmanı
Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ

ANKARA
Nisan 2013

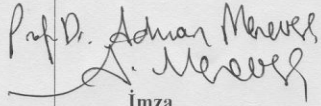
T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

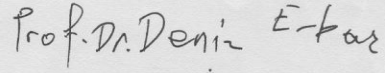
Tez Savunma Tarihi : 25.6.2013



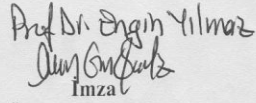
İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı
Prof. Dr. Abdullah Ekmeleci



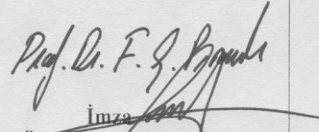
İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi



İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi



İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Hacettepe Üniversitesi



İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER, TABLOLAR	vii
SEMBOLLER, KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	4
2.1.2. Histoloji	8
2.2. Sigara	9
2.3. Sigara İçmeyenlerde Görülen Akciğer Kanseri	11
2.4. Akciğer Kanseri Genetik Yatkınlık	13
2.5. Akciğer Karsinogenezindeki Moleküler Değişimler	14
2.5.1. Akciğer Kanseri EGFR Sinyal Yolağı	15
2.5.2. Akciğer Kanseri RAS/RAF/MEK/MAPK Yolağı	17
2.5.3. MYC	18
2.5.4. Akciğer Kanseri EML4-ALK Füzyon Proteini	18
2.5.5. Akciğer Kanseri PI3K/AKT/mTOR Yolağı	19
2.6. Soy Bağımlı (Lineage Dependent) Onkogenler	22
2.7. Tümör Baskılayıcı Genler ve Büyüme Engelleyici Yolaklar	23
2.7.1. p53	23
2.7.2. CDKN2A/RB	24
2.7.3. STK11(LKB1)	24
2.8. Akciğerde Bulunan Hücre Tipleri ve Görevleri	25
2.9. Akciğer Kanseri Kök Hücreleri ve Pluripotensi	28
2.10. Akciğer Kanseri EGFR Mutasyonlarının Önemi	30
2.10.1. EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Gelişen Direnç	32
2.10.2. İlaça Dirençli EGFR Mutasyonları	33
	iii

2.10.3.	EGFR Mutasyonları ile Birlikte Gözlenen Diğer Genomik Değişimler	33
2.10.4.	Yabani Tip EGFR Tümörlerinde Direnç	34
2.10.5.	EGFR’de Oluşan İkincil Bölge Mutasyonları	35
2.11.	SOX2	35
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1.	Kullanılan Cihazlar	38
3.2.	Kullanılan Sarf Malzemeler	38
3.3.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.4.	Kullanılan Kitler	42
3.5.	Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	42
3.5.1.	%10’luk RPMI1640 Besiyerinin Hazırlanışı	42
3.5.2.	%2’lik DMEM Besiyerinin Hazırlanışı	42
3.5.3.	Kök Hücre Besiyerinin Hazırlanışı	42
3.5.4	Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	43
3.6.	Yöntemler	47
3.6.1.	Hücre Kültürü	47
3.6.2.	SRB Sitotoksosite Deneyi	50
3.6.3.	Hücrelerden Total Protein İzolasyonu	50
3.6.4.	Protein Miktar Tayini	51
3.6.5.	Western Blot Protein Tayini	52
3.6.6.	İmmunohistokimyasal Boyama	53
3.6.7.	Plazmit DNA Çoğaltılması	55
3.6.8.	Plazmit DNA İzolasyonu	56
3.6.9.	shRNA Üretimi İçin Lentivirüs Protokolü	57
3.7.	Deney Hayvanı Çalışmaları	58
3.8.	İstatistiksel Analiz Yöntemleri	60
4.	BULGULAR	61
4.1.	EGFR Mutant KHDAK Hücrelerinin Erlotinib Yanıtı	61
4.2.	CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerde EGFR sinyallesmesi ile artan SOX2 ifadesi	70

4.3.	shRNA Kullanılarak SOX2'nin Susturulması	77
4.4.	SOX2 Eksikliğinin Hücre Çoğalmasına Etkisi	78
4.5.	SOX2 Eksikliğinin Erlotinib ve Triciribine Yanıtına Etkisi	83
4.6.	PI3K/AKT Yolağının SOX2 İfadesine Etkisi	89
4.7.	Hücre Yoğunluğu ve Besinin SOX2 İfadesine Etkisi	91
4.8.	SOX2 Eksikliğinin Tümör Oluşumundaki Rolü	93
5.	TARTIŞMA	96
6.	SONUÇ	117
7.	ÖZET	119
8.	SUMMARY	121
9.	KAYNAKLAR	123
10.	TEŞEKKÜR	154
11.	ÖZGEÇMİŞ	156

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER, TABLOLAR

ŞEKİLLER

Şekil 1. Erkek ve kadınlarda tahmini yeni akciğer kanseri olguları ve akciğer kanseri nedeniyle görülen ölüm oranları	5
Şekil2. Seçili kanser tipleri için erkeklerdeki ölüm oranları– ABD (1930 – 2008)	6
Şekil 3. Seçili kanser tipleri için kadınlardaki ölüm oranları– ABD (1930 – 2008)	6
Şekil 4. Akciğer kanserinde görülen histolojik altgruplar	6
Şekil 5. Adenokarsinomda değişime uğramış genler	15
Şekil 6. Akciğer kanserinde en sık gözlenen EGFR mutasyonları	16
Şekil 7. EGFR sinyal yolağı	16
Şekil 8. PI3K/AKT sinyal yolağı	21
Şekil 9. Akciğer epitel hücre tipleri ve akciğer kanserinin köken aldığı hücreler	26
Şekil 10. Çalışmamızda kullandığımız shSOX2 plazmiti	57
Şekil 11. H1975 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra 20X mikroskop görüntüleri	61
Şekil 12. H1975 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra bazı protein ifadelerindeki değişimler	63
Şekil 13. HCC827 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra 20X mikroskop görüntüleri	64
Şekil 14. HCC827 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra bazı protein ifadelerindeki değişimler	65
Şekil 15. PC9 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra 40X mikroskop görüntüleri	66

Şekil 16. PC9 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra bazı protein ifadelerindeki değişimler	67
Şekil 17. PC9 hücreleri kök hücre besiyerinde çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra mikroskop görüntüleri (20X)	68
Şekil 18. PC9 hücreleri kök hücre besiyerinde çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra bazı protein ifadelerindeki değişimler	69
Şekil 19. CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerde mutant EGFR sinyal yolağının indüklenmesi	70
Şekil 20. Mutant EGFR sinyal yolağı 3 ve 9 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğerindeki sinyal değişimleri	73
Şekil 21. Mutant EGFR sinyal yolağı 7 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fareler 2 ve 5 gün doksosiklin almadıklarında akciğerlerindeki sinyal değişimleri	74
Şekil 22. HCC827 ve H1975 hücrelerinde SOX2 eksikliğinin	78
Şekil 23. HCC827 hücrelerinde 6, 24 ve 48 saat LY294002 ve triciribine uygulamasının SOX2, p-AKT ve p-FOXO1/3 ifadesi üzerine etkisi	90
Şekil 24. H1975 hücrelerinde 6, 24 ve 48 saat LY294002 ve triciribine uygulamasının SOX2, p-AKT ve p-FOXO1/3 ifadesi üzerine etkisi	91
Şekil 25. PC9 hücrelerinde glikoz, serum eksikliğinin ve hücre yoğunluğunun SOX2, p-AMPK, p-AKT ve p-S6 ifadesi üzerindeki etkisi	92

Şekil 26. H1975 hücrelerinde serum eksikliğinin ve hücre yoğunluğunun SOX2, p-AMPK ve OCT4 ifadesi üzerindeki etkisi	93
--	----

RESİMLER

Resim 1. H1975 hücre hattı (20X)	48
Resim 2. HCC827 hücre hattı (20X)	48
Resim 3. PC9 hücre hattı (20X)	49
Resim 4. HCC827 GR5 hücre hattı (20X)	49
Resim 5. Çalışmamızda kullanılan CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerin sakrifiye edilmesinin ardından akciğerin çıkarılması	59
Resim 6. Mutant EGFR sinyal yolağı aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğeri	71
Resim 7. Mutant EGFR sinyal yolağı 3 ve 9 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğerinin H&E boyaması	72
Resim 8. SOX2 antikoru ile boyanmış Mutant EGFR sinyal yolağı 3 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğer kesitlerinin immunohistokimyasal analizi (a) ve negatif kontrol (b)	76
Resim 9. SOX2 antikoru ile boyanmış Mutant EGFR sinyal yolağı 9 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğer kesitlerinin immunohistokimyasal analizi (a) ve negatif kontrol (b)	77

Resim 10. KHDAK hücre hattının GFP geni taşıyan lentivirüs ile enfeksiyonu	78
Resim 11. Çalışmamızda kullandığımız atimik farelerin sırt ve enselerinde oluşan tümörler	94

GRAFİKLER

Grafik 1. Tümör tipine göre ABD’de sigara içen ve içmeyen akciğer kanser olguları	12
Grafik 2. Mutasyon tipine göre ABD ve Asya’da akciğer kanser olguları	13
Grafik 3. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrerinde 24, 48 ve 72 saatte proliferasyon oranları	80
Grafik 4. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrerinde 24, 48 ve 72 saatte proliferasyon oranları	82
Grafik 5. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 48 ve 72 saatte erlotinib yanıtı	84
Grafik 6. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 48 ve 72 saatte triciribine yanıtı	85
Grafik 7. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 48 ve 72 saatte erlotinib yanıtı	87
Grafik 8. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 48 ve 72 saatte triciribine yanıtı	88

TABLÖLAR

Tablo 1. Çalışmamızda kullanılan hücre hatlarının mutasyonları	47
Tablo 2. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatte proliferasyon oranları arasındaki istatistiksel fark ($p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).	80
Tablo 3. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatte proliferasyon oranları arasındaki istatistiksel fark ($p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).	82
Tablo 4. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 48 ve 72 saatte erlotinib yanıtı arasındaki istatistiksel fark ($p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).	84
Tablo 5. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 48 ve 72 saatte triciribine yanıtı arasındaki istatistiksel fark ($p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).	86
Tablo 6. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 48 ve 72 saatte erlotinib yanıtı arasındaki istatistiksel fark ($p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).	87
Tablo 7. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 48 ve 72 saatte triciribine yanıtı arasındaki istatistiksel fark ($p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).	89
Tablo 8. Xenograft modellerde SOX2 ifadesi olan ve olmayan H1975 ve HCC827 hücrelerin tümör oluşumu	94

SEMBOLLER, KISALTMALAR

4EBP1	: Ökaryotik Başlatma Faktörü 4E Bağlayıcı Protein 1
α	: Alfa
β	: Beta
μ L	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AMPK	: AMP tarafından aktive edilmiş protein kinaz
BADJ	: Bronşiyolalveolar geçiş bölgesi
BAKH	: Bronşiyolalveolar kök hücre
BCL2	: B-hücre lenfoması 2
CCND1	: Siklin D1 (gen)
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Media
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DOX	: Doksosiklin
GFP	: Yeşil floresan protein
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	: Hücre dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
ERBB2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
FBS	: Fetal Sığır Serum
FGFR2	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 2
FOXO	: Çatalbaşı kutu proteini
g	: Gram
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
H&E	: Hematoksilen-Eozin
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü

HH	: Hedgehog
HIF-1 α	: Hipoksiyle Uyarılan Faktör 1 alfa
IGFBP3	: İnsülin büyüme faktörü bağlanma proteini 3
IGF-1R	: İnsülin büyüme faktör 1 reseptörü
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KLF4	: Kruppel benzeri faktör 4
KRAS	: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarkoma viral onkogen homologu
LY	: LY29004
M	: Molar
MAPK	: Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
MDR	: Çoklu ilaç direnç proteini
MEK	: MAPK, Mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz
MET	: Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mRNA	: Elçi RNA
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hücrelerindeki Hedefi
NF- κ B	: Nükleer Faktör-kappa B
nM	: Nanomolar
NNK	: 4-(Metilnitrozamino)-1-(3-piridil)1-butanon
OCT4	: Oktamere bağlanan transkripsiyon faktörü 4
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PARP	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI3K	: Fosfoinozitol 3 Kinaz
PKB	: AKT, Protein Kinaz B
PKC	: Protein Kinaz C
PNH	: Pulmoner nöroendokrin hücreler
PRAS40	: Prolince zengin 40 kDa'luk AKT/PKB substratı
Rpm	: Dakika başına dönme sayısı

RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
S	: Saat
shRNA	: Short hairpin ribonükleik asit
sn	: Saniye
SOX2	: SRY (sex determining region Y)-kutu 2
STAT3	: Traskripsiyonda sinyal dönüştürücü ve aktifleştirici 3
TBE	: Tris Borat EDTA
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
TRC	: Triciribine
TSC2	: Tuberoskleroz 2 proteini
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
WNT	: Wingless proteini
°C	: Santigrad derece

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri akciğer dokusunda normal hücrelerin genetik ve epigenetik değişimler sonucu kontrolsüz çoğalması nedeniyle oluşan ve halen dünyada kansere bağlı ölümler arasında ilk sırada yer alan bir hastalıktır. Uygulanan tedaviler akciğer kanserinin histolojik alt tiplerine, hatta bu histolojik alt tiplerin sahip olduğu mutasyonlara göre değişmektedir.

EGFR mutant küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) aşırı aktif EGFR sinyal yolağını inhibe etmek için erlotinib ve gefitinib gibi çeşitli tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tedaviyi alan EGFR mutant KHDAK hastaları yaklaşık 6 ay sonra ilaca direnç geliştirmekte ve hastalık tekrar ilerlemeye başlamaktadır. Bu direnç mekanizmasının nedenleri, EGFR'de gelişen ikincil T790M mutasyonu, MET amplifikasyonu, PIK3CA mutasyonu gibi hücrede alternatif onkolojik yolların aktivasyonu olabilmektedir. Ayrıca epidermal hücre fenotipinden mezenşimale geçiş (EMT) gibi durumlara da rastlanmaktadır.

Pekçok kanserde tümörün heterojen hücre populasyonu olduğu ve bu populasyonda bazı hücrelerin ilaca yanıt vermediği gösterilmiştir. Akciğer kanserinde kanser başlatıcı öncül hücrelerin nerede bulunduğu ve belirteçlerinin neler olduğu halen çalışılmaktadır. Bu hücrelerin kök hücre özelliklerinden biri olan “çok potansiyelliliğe” sahip olabileceği belirlenmiştir. Kanser hücreleri NOTCH, WNT, HEDGEHOG gibi çeşitli hücresel yollarla geriye farklılaşma sürecini ya da kök hücre varlığını koruyarak pluripotensi özelliklerini sürdürebilmektedir.

SOX2, normal pluripotent hücrelerde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. Çeşitli kanser tiplerinde de varlığı gösterilmiş ve onkogenik aktivitesi belirlenmiştir. SOX2, normal akciğer dokusunda geniş hava yollarında bazal, silli ve Clara hücrelerinde ifade edilmektedir. Akciğer kanserinin bir alt tipi olan skuamöz karsinomda ve küçük hücreli akciğer kanserinde (KHAK) SOX2'nin bir onkoprotein olduğu belirlenmiştir. Ancak EGFR mutant KHAK için yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmamızda, SOX2'nin EGFR mutant küçük hücreli akciğer kanseri gelişiminde, hücre çoğalmasında, ilaç direncinde ve tümör oluşumundaki rolünü araştırmayı hedefledik. Ayrıca SOX2'nin hangi hücresel yollardan etkilendiği ve bazı çevresel faktörlerin SOX2 ifadesi üzerindeki etkilerini de belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, normal akciğer epitel hücrelerini kansere dönüştüren DNA hasarıyla oluşan genetik ve epigenetik değişiklikleri içeren çok aşamalı bir süreç sonunda oluşur ^{1, 2}. Akciğerde bulunan epitel kök hücreleri, hücre öncülleri ya da farklılaşmış epitel hücrelerinden hangisinin malign transformasyondan sorumlu olduğu henüz bilinmemektedir ³. Premalign lezyonlarda moleküler değişikliklerin birikmesi kanserin genel özellikleri olarak bilinen büyüme sinyallerine gereksinim duymama, büyüme engelleyicilerine ve apoptoza dirençliliğin oluşması, replikasyon potansiyelinin sınırsız olması, artmış anjiyogenez, dokuya invazyon ve metastaz gibi durumların gelişmesine neden olur ^{4, 5}.

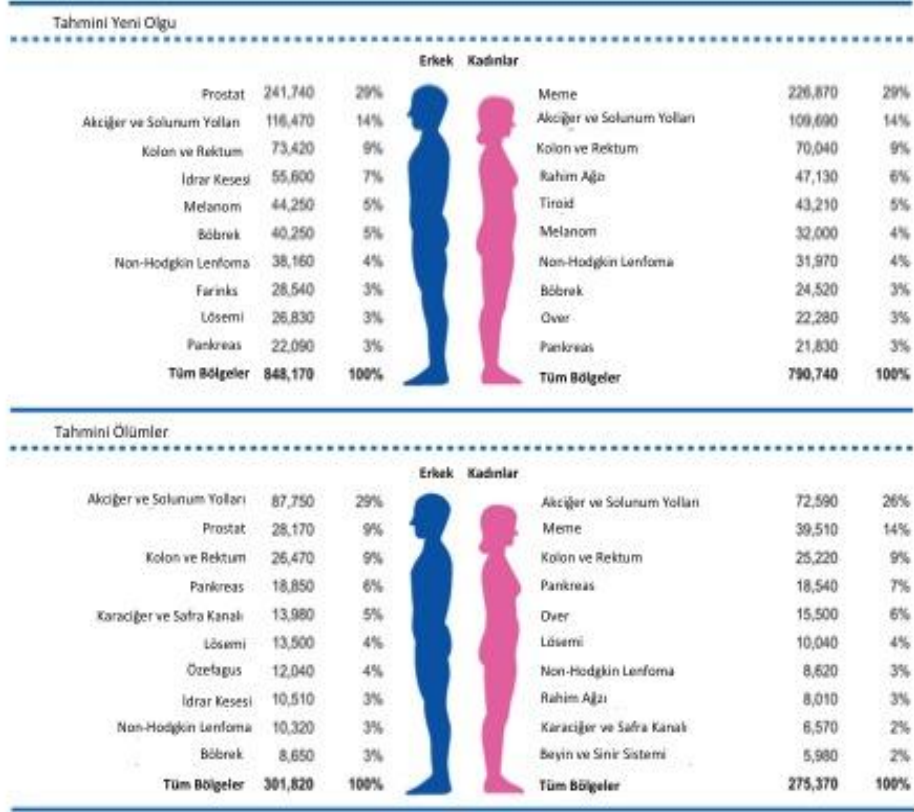
Normal hücre çoğalmasını ve homeostazını düzenleyen yollardaki hatalar Hanahan ve Weinberg'in hipotezindeki gibi akciğer kanser hücresinin malign hale gelmesini sağlar. Normal hücre fenotipinden malign hücreye transformasyon, bir seri genetik ve epigenetik değişimle olmakta ve bu durum kanserin klonal genişlemesinde rol oynamaktadır ⁵. Bronş epitelindeki bu patolojik değişimler preneoplastik ya da premalign lezyonlar olarak bilinmekte ve skuamöz displazi, atipik adenomatöz hiperplazi ve diffüz idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi olarak görülmektedir ¹. Bu preneoplastik lezyonlar çeşitli akciğer kanser tiplerinin gelişmesine neden olurlar. Mutasyonların ve epigenetik değişimlerin birikmesiyle tümörlerin zamanla daha fazla malign olduğu ve tümörigenezi ilerlettiği bilinmektedir. Bu moleküler değişimlerin tanımlanıp sınıflandırılması akciğer kanserinin önlenmesi, erken belirlenmesi ve tedavisi için gereklidir. Bu bilgilerin kliniğe çeşitli şekillerde yansması erken tanı için belirteçlerin belirlenmesi,

herbir hasta için prognozun ve tedavinin şekillendirilmesi, hedefteki kanser hücrelerini özgün şekilde öldürecek terapilerin geliştirilmesi şeklinde olabilir.

Akciğer kanseri klinik, biyolojik, histolojik ve moleküler olarak heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenitenin altında yatan nedenler bilinmemekle beraber farklılaşma potansiyeli farklı olan hücrelerden farklı kanserlerin gelişmesinden ya da kanser hücresindeki farklı aktifleşmiş yollardan kaynaklanıyor olabilir. Bu heterojenite ve moleküler karışıklık akciğer kanser patogenezinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır.

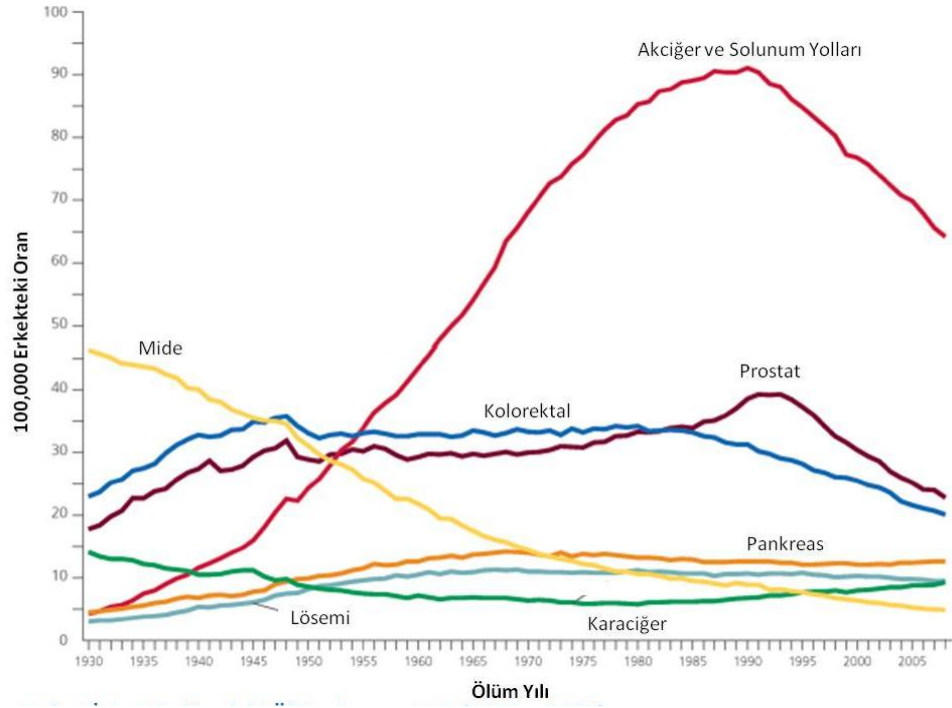
2.1.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Akciğer kanseri tüm dünyada kanser olgularının %12.8'inden ve kanser ölümlerinin %17.8'inden sorumludur ⁶. Akciğer kanseri, kansere bağlı ölümler arasında en fazla ölüme neden olan kanser türüdür. Ülkemizde akciğer kanseri, 1970'li yıllarda nedeni bilinen ölümler arasında 4. sırada yer alırken, günümüzde dünyanın bir çok ülkesinde olduğu gibi kalp-damar hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselerek ölümlerin %28'inden sorumlu tutulmaktadır ⁷. Ülkemizde Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı verilerine göre 2002 yılında akciğer kanseri insidansı 100000'de 11.26 ile ilk sırada yer almaktadır. Ayrıca 8 ili (Ankara, Antalya, Edirne, Erzurum, Eskişehir, İzmir, Samsun ve Trabzon) kapsayan bir çalışmaya göre 2003 yılında görülen kanser insidansında, akciğer kanseri 100000'de 24.8 ile ilk sırada yer almaktadır. Bu sekiz ilde erkeklerde insidans 100000'de 43.5, kadınlarda ise 5.89'dur ⁸. Akciğer kanseri erkeklerde tüm dünyada en çok görülen kanser türlerinden biridir. Kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır ⁹. Bununla birlikte, yıllara bağlı ölüm oranlarına göre akciğer kanserinden erkeklerde ölüm oranı azalırken, kadınlarda artmaktadır (Şekil 1).

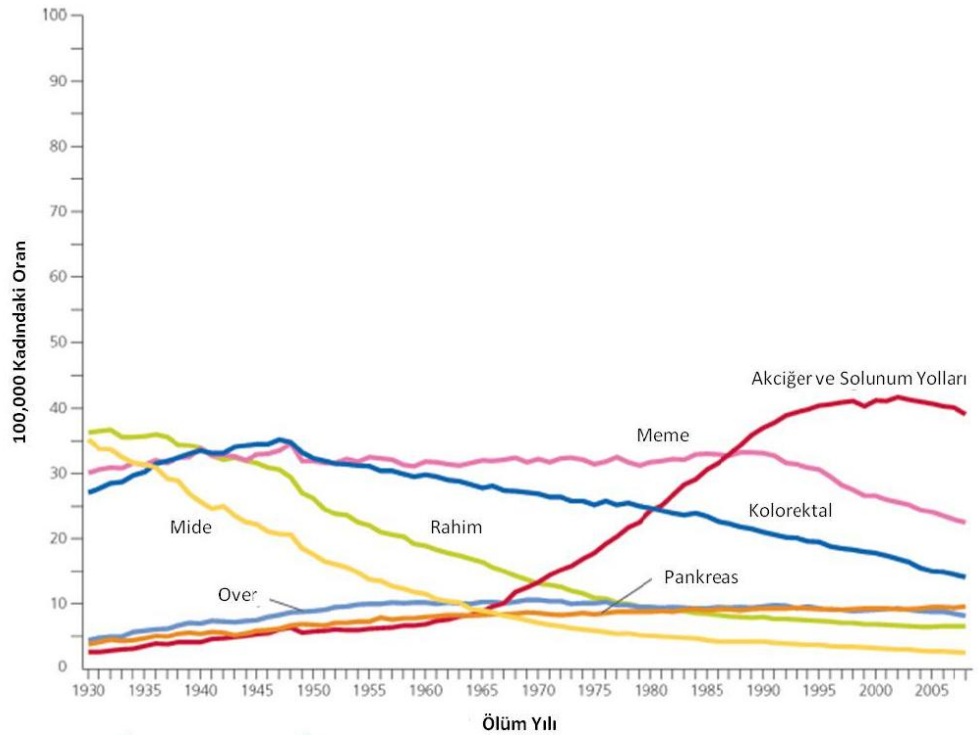


Şekil 1. Erkek ve kadınlarda tahmini yeni akciğer kanseri olguları ve akciğer kanseri nedeniyle görülen ölüm oranları ⁹.

2012 yılı istatistiklerine göre ABD’de 116.470 erkek, 109.690 kadın yeni akciğer kanser olgusu ve 2012 yılında yaklaşık 87.750 erkek ve 72.590 kadın hastanın akciğer kanseri nedeniyle kaybedileceği tahmin edilmektedir (Şekil 1) ⁹. ABD’de 2006-2008 yılları arasında gözlenen akciğer kanser hastalarının oranı yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir (Şekil 2 ve 3) ⁹.



Şekil 2. Seçili kanser tipleri için erkeklerdeki ölüm oranları– ABD (1930 – 2008) ⁹



Şekil 3. Seçili kanser tipleri için kadınlardaki ölüm oranları– ABD (1930 – 2008) ⁹

Akciğer kanserli olgularda tanı sonrası 5 yıllık yaşam, yıllara göre değişse de günümüzde %15'e kadar ulaşmıştır. Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa toplumlarında sigara karşıtı kampanyalar sonucu akciğer kanseri görülme sıklığı 1980'den sonra erkeklerde azalma eğilimine girmiştir. Kadınlarda sigara kullanımı alışkanlığındaki artış nedeniyle ülkemizde ve Doğu Avrupa ülkelerinde akciğer kanseri sıklığı giderek artmaktadır ¹⁰.

Akciğer kanseri gelişiminden büyük oranda sigara sorumludur, sigara içenlerde akciğer kanseri riski içmeyenlerden 24-36 kat daha fazladır. Pasif sigara içiminde risk %3,5'tur. Sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi, içilen sigara sayısı ile tütün ve sigara tipi (filtreli, filtresiz, puro, düşük tar ve nikotin içeriği vb.) akciğer kanseri gelişme riskini etkileyebilmektedir ¹¹.

Toraks Derneği Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu (TAPMG) tarafından yapılan ulusal, hastane bazlı retrospektif çalışmada, ülkemizdeki 11849 akciğer kanserli olgunun % 90,4'u erkek, % 9,6'sı kadın olup, olguların büyük oranda (%56,7) 46-65 yaşları arasında olduğu belirlenmiştir. Olguların yaklaşık %90'ında sigara kullanma öyküsüne rastlanmıştır (% 77,9 aktif içici, %10,8 sigarayı bırakmış) ¹².

Akciğer kanserinin %85'i sigara dumanında bulunan karsinojenler nedeniyle oluşurken, %15'i hiç sigara içmeyen bireylerde gözlenir. Bununla birlikte yeni akciğer kanser vakalarının da yaklaşık %50'si eski içicilerdir. Şu an sigara içmeseler de geçmişte oluşan hasar akciğer kanseri gelişimine neden olabilmektedir ¹³.

Tüberküloz, kronik bronşit, anfizem, pnömoni ya da kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi akciğerde hasar bırakan hastalıklarda akciğer kanseri gelişme riskinin daha fazla olduğu belirtilmektedir ¹⁴.

Kapalı alanlarda sigara içiminden başka kanser riskini arttıran etmenler de vardır. Bunlar; radon, asbest, kromat, kromyum, klorometil eterler, nikel, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, radyasyon ve hava kirliliğidir ^{15, 16, 17}.

Akciğer kanseri gelişiminde rolü olduğu belirtilen yaş, ırk, cinsiyet, meslek, hava kirliliği, radyasyon, geçirilmiş akciğer hastalığı sekeli, diyet, viral enfeksiyonlar, genetik ve immunolojik faktörlerin tümü % 6 oranında etkilidir ¹¹.

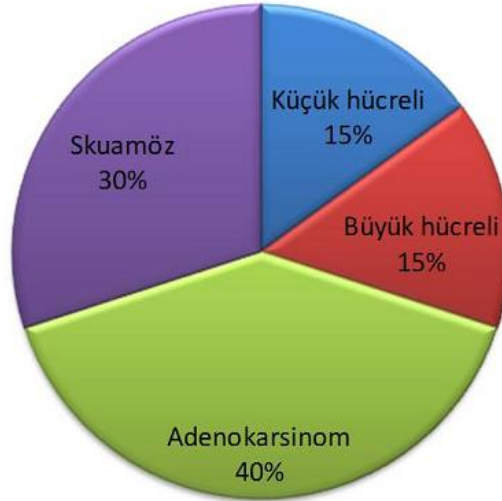
2.1.2. Histoloji

1970'lerin ortalarında araştırmacılar akciğer kanserlerinin farklı alt türlerinin kemoterapötik ilaçlara farklı hassaslıkta olduklarını göstermişlerdir. Akciğer kanseri klinik, histolojik ve nöroendokrin özelliklerine göre küçük hücreli dışı (%85) ve küçük hücreli olmak üzere (%15) iki tipe ayrılır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri histolojik olarak adenokarsinom, skuamoz karsinom ve büyük hücreli karsinom olarak alt gruplara ayrılır (Şekil 4). Akciğer tümör tipleri ve aralarındaki fark prognostik ve tedavi seçenekleri açısından önemlidir ¹⁸.

Ülkemizde, Asya ülkelerinde olduğu gibi, en sık skuamoz hücreli kanser (yaklaşık % 45) görülmekte, bunu benzer oranla (yaklaşık % 20) küçük hücreli kanser ve adenokanser izlemektedir. ABD ve

Japonya’da ise en sık rastlanan akciğer kanser tipi adenokarsinomdur ¹⁹. Büyük hücreli kanser % 2 oranıyla en az görülen kanser tipidir ¹².

Günümüzde tümörler moleküler kriterlere göre sınıflandırılmaktadır. En iyi tedavi stratejilerinden biri kanser alt türünün sahip olduğu genetik mutasyonu ve proliferasyonda ve sağkalımda etkili olan aktif sinyal yolağını bulmaktır. Bu mutant proteinlerin aktivitesinin hedeflenmesi hücre ölümü ve tedavi açısından yararlı olabilmektedir ²⁰.



Şekil 4. Akciğer kanserinde görülen histolojik altgruplar

2.2. Sigara

Akciğer kanseri riskinden tütün kullanımı %75-90 oranında sorumludur. Sigara dumanında bulunan PAH (polisiklik aromatik hidrokarbonlar) ve karsinojenler hücre döngüsünün kontrolünde çok önemli olan p53 geninde mutasyon yapabilmektedir. Ayrıca, N-nitröz bileşikler sigara dumanında bulunan diğer zararlı bileşiklerden biridir ²¹. Sigara içimi adenokarsinoma göre skuamöz ve küçük hücreli karsinomla daha çok bağlantılıdır. Son yıllarda adenokarsinom, skuamöz

karsinomdan daha sık görülmeye başlamıştır. Bunun nedeninin filtreli sigaralarda tar oranının azaltılması ve nitrozaminlerdeki artış olduğu düşünülmektedir ²². Sigara dumanının daha sık ve derin çekilmesi karsinojenlerin akciğer periferine daha çok yayılmasını ve adenokarsinom görülme sıklığını arttırabilmektedir.

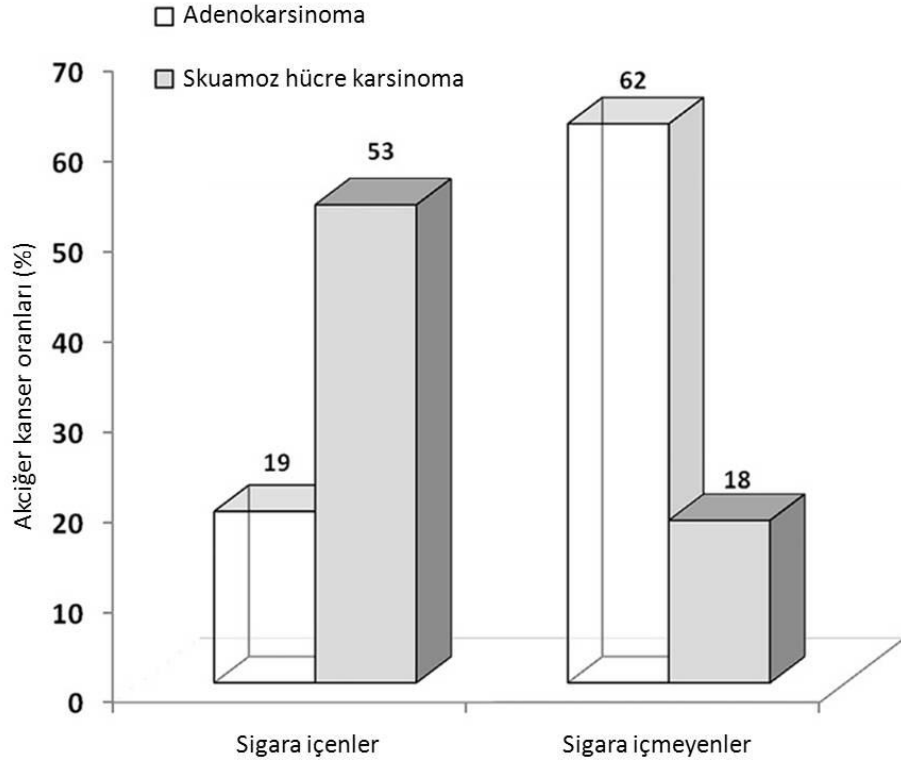
Sigarada bulunan NNK (4-(Metilnitrozamino)-1-(3-piridil)1-butanon), PAH gibi karsinojenler, DNA'ya kovalent olarak bağlanabilir. DNA onarım sistemi bunları uzaklaştırabilir ve normal DNA'yı koruyabilir ya da hasarlı DNA'ya sahip hücre apoptozise uğrayabilir. DNA onarım sistemlerinin çalışmaması kalıcı mutasyonlara neden olabilir. NNK'ler çeşitli sinyalleşme yollarını etkileyerek kritik onkogenlerin ve tumor baskılayıcı genlerin ifade değişimini sağlayarak kontrolsüz hücre bölünmesi ve tümör oluşumuna neden olabilir ²³. NNK, K-ras onkogeninin aktifleşmesini sağlayan DNA mutasyonları yapabilir ²⁴. Akciğer adenokarsinomlarının %24'ünde K-ras onkogen aktivasyonu gözlenmiştir ²⁵. Sigara dumanında bulunan diğer bir bileşen benzopiren metaboliti akciğer kanserinde yaklaşık %60 oranında mutasyonu görülen p53 genine zarar verebilir ²⁶. Akciğer kanser riski tüketilen sigara miktarıyla paralel olarak artabilmektedir. Bu nedenle bir günde içilen sigara sayısı, sigaraya başlama yaşı, inhalasyonun gücü, filtresiz sigara kullanımı, sigaradaki tar ve nikotin içeriği önemli olabilmektedir ²⁷.

Sigara içilmediğinde, dünyada kanser ölümlerinin %20 azalacağı tahmin edilmektedir ²⁸. Akciğer kanserinin %75-80'den fazlası sigara içen kişilerde görülse de, sigara içmeyen %20-25'inde akciğer kanseri gelişebilmektedir. Bu durum akciğer kanserinden bireysel yatkınlığın da sorumlu olduğunu göstermektedir. Böylece genetik yatkınlık ya da çevresel faktörler de akciğer kanser gelişiminde önemli olabilmektedir ²⁸.

2.3. Sigara İçmeyenlerde Görülen Akciğer Kanseri

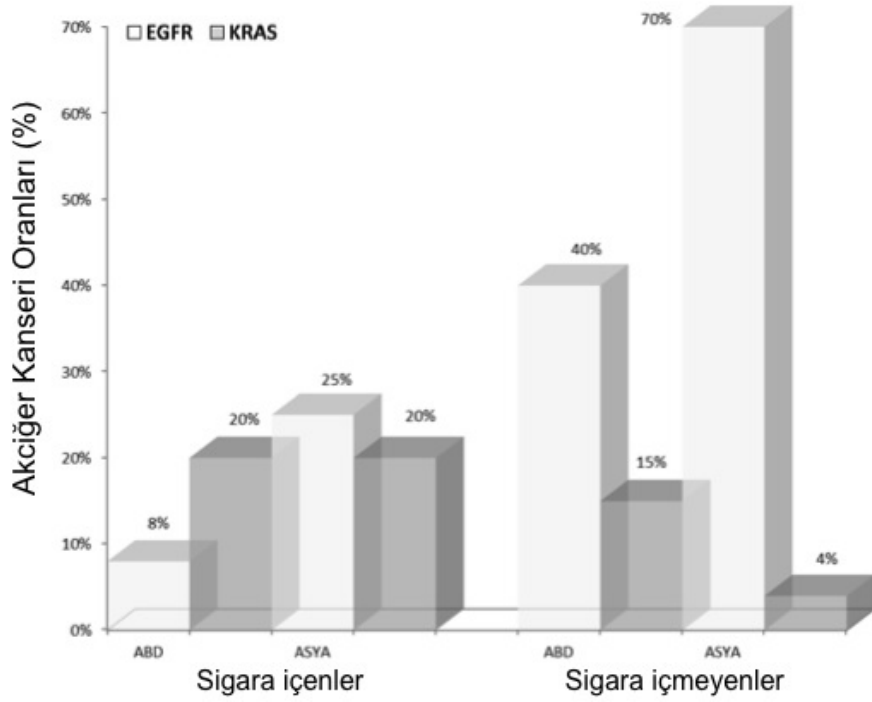
Sigara içmeyenler terimi hayatı boyunca 100 adetten daha az sigara içenler için kullanılır. Dünyadaki akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %25'i sigara içmemiştir ⁶. Sigara içmeyenlerde görülen akciğer kanseri, kansere bağlı ölümler arasında yedinci sırada yer almaktadır ²⁹.

Güney Asya'da akciğer kanserli kadınların %80'inin hiç sigara içmediği bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise akciğer kanserli kadınların %19'unun ve erkeklerin %9'unun sigara içmediği belirtilmiştir. ^{30, 31}. Her ne kadar akciğer kanserinin tüm tipleri sigara içimi ile ilişkilendirilse de küçük hücreli akciğer kanseri olanlarda ve skuamöz hücre karsinomlarında ilişki daha güçlüdür. Öte yandan, adenokarsinomlar sigara içmeyenlerde daha sık gözlenebilen akciğer kanser tipidir (Grafik 1) ¹⁷. Ancak son yıllarda adenokarsinomun sigara içenlerde de yaygınlaştığını göstermektedir ³². Sigara içmeyenlerde gelişen akciğer kanserinin nedenleri tam olarak açıklanamasa da, pasif sigara içimi, radona gazına maruziyet, hava kirliliği, asbest, arsenik, geçirilmiş akciğer hastalığı ve genetik faktörler önemli risk faktörleri olabilmektedir ³³. Bunun yanı sıra sigara içmeyen akciğer kanserli hastalarda aile öyküsünün olması genetik faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir ³⁴.



Grafik 1. Tümör tipine göre ABD’de sigara içen ve içmeyen akciğer kanser olguları¹⁷

EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü), hMSH2 (insan mutS homolog 2), sitokrom p450 ve glutatyon-S-transferaz gibi proteinleri kodlayan genlerde görülen mutasyonlar akciğer kanser gelişiminde etkili olmuştur. Ancak sigara kullanan ve kullanmayan akciğer kanserli hastaların ayırımında kesin etkili bir gen hala bulunamamıştır ³⁵. Asyalı sigara içmeyen hastalarda gözlenen akciğer adenokarsinomlarında artmış EGFR mutasyon sıklığı dikkat çekmektedir (Grafik 2) ^{36, 17}.



Grafik 2 : Mutasyon tipine göre ABD ve Asya'da akciğer kanser olguları ¹⁷

Asyalı (Hong Kong, Singapur, Japon) sigara içmeyen akciğer kanseri olgularına, sigara içenlere göre daha erken yaşta tanı konabilmiştir ³⁷. Akciğer adenokarsinomlarında sigara içmeme öyküsü sağkalımda önemli bir belirteçtir (5 yıllık sağkalım sigara içmeyenlerde %23 iken, sigara içenlerde %16'dır) ³⁸. Bu bulgular sigara içmeyenlerde görülen kanserin farklı bir biyolojisinin ve gelişiminin olduğunu göstermektedir. Ayrıca, epidemiyolojik, patolojik ve moleküler biyolojik farklılıkların da gözlenmesi sigara içmeyenlerde gözlenen akciğer kanserinin diğer akciğer kanserlerinden farklı değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

2.4. Akciğer Kanseri Genetik Yatkınlık

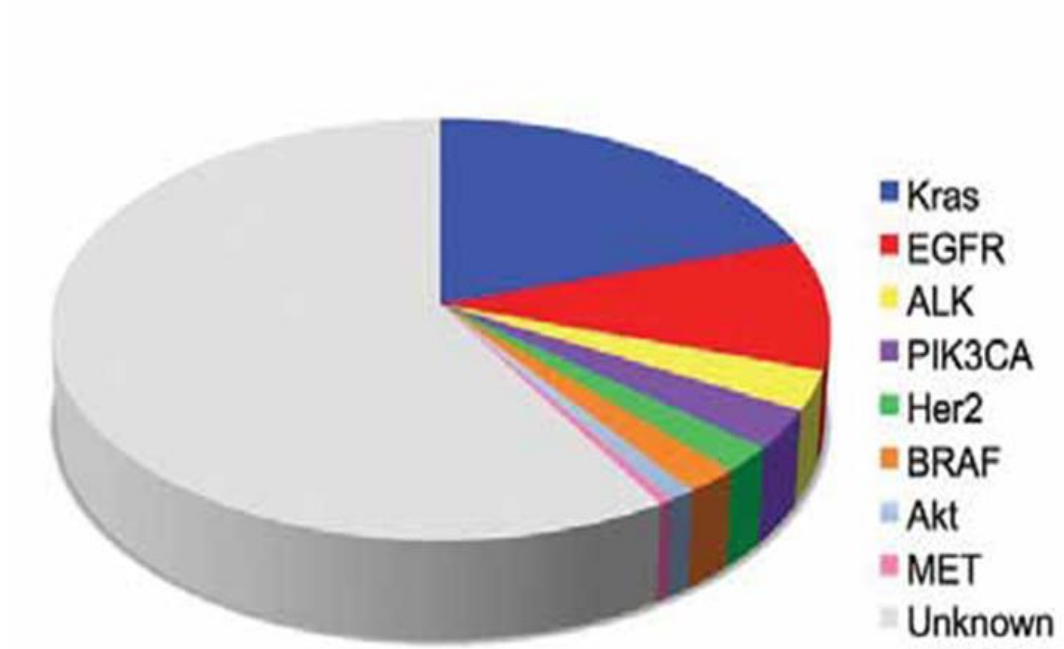
Birbirinden bağımsız çalışmalarda 15q24-q25.1 bölgesinde bulunan tek nükleotid polimorfizmleri hem akciğer kanser gelişimi hem de

nikotin bağımlılığı ile ilişkilendirilmiştir ^{39, 40, 41}. Bu lokusda bulunan genler nikotinik asetilkolin reseptörü nAChR'nin alt ünitelerini (CHRNA5, CHRNA3, CHRNB4) kodlar. Daha sonraki çalışmalarda ise 15q25.1, 5p15.33 ve 6p21.33'deki değişimlerin akciğer kanser riskini etkilediği gösterilmiştir ^{42, 43}.

2.5. Akciğer Karsinogenezindeki Moleküler Değişimler

Anöploidi, 3p, 4q, 9p ve 17p'deki alelik kayıp ya da 1q, 3q, 5p ve 17q'daki alelik kazanımlar gibi pekçok genetik değişim akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiştir ⁴⁴. Ayrıca MYC, RAS, EGFR, NKX2-1, ErBB2, SOX2, BCL2, FGFR2, CRKL aktivasyonu; RB1, CDKN2A, STK11 inaktivasyonu gibi çeşitli genetik değişimler gözlenmiştir ⁴⁵.

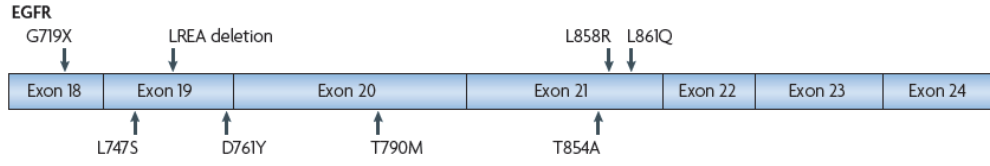
Diğer kanser türlerinde olduğu gibi akciğer kanserinde de gen amplifikasyonu, gen ifadesinde artış, nokta mutasyonu ya da DNA düzenlenmeleri ile onkogen aktivasyonu görülmektedir. Onkogen aktivasyonu ile onkogen bağımlılığı gelişir ve hücreler sağ kalmak için bu sıradışı onkogenik sinyallere gereksinim duyarlar. Adenokarsinomda proliferasyon ve sağkalımdan sorumlu pek çok gen değişime uğramıştır (Şekil 5). Akciğer kanserinde sıklıkla aktive olan onkogenler; EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, MET, EML-ALK füzyonu ve BCL2'dir. Bu onkogenler ve onkogen bağımlılığı akciğer kanser hücrelerine özgün tedavilerle diğer normal hücrelerden ayrılarak hedef haline gelmesinin sağlanabileceği düşünülmektedir ^{46, 47}.



Şekil 5. Adenokarsinomda değişime uğramış genler

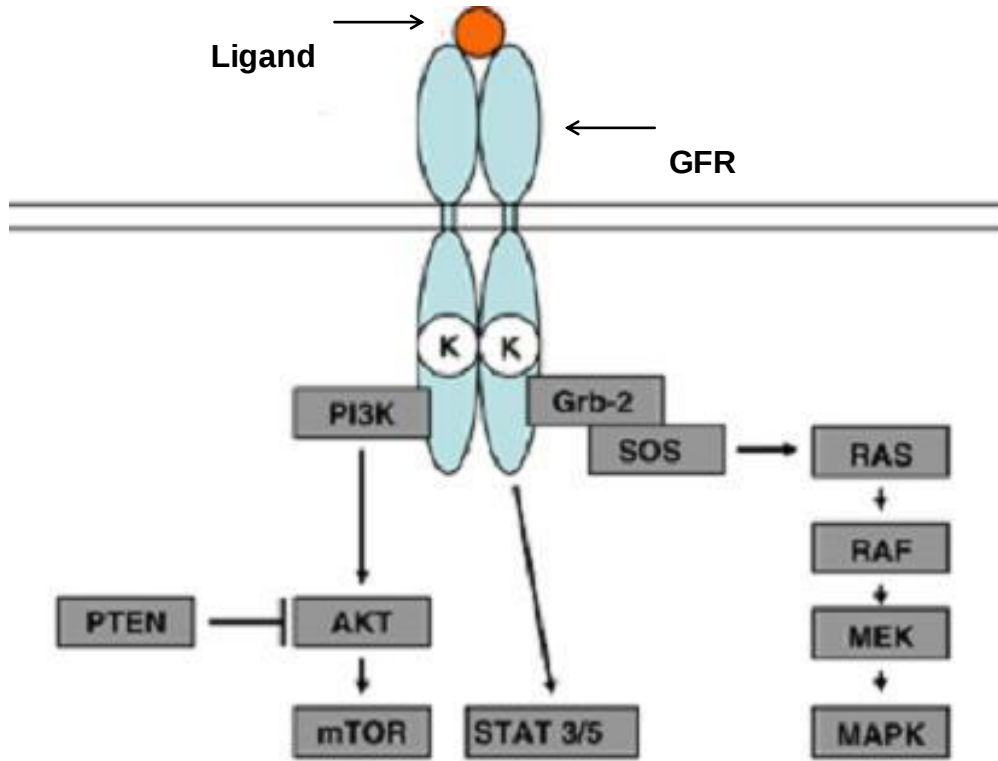
2.5.1. Akciğer Kanserinde EGFR Sinyal Yolağı

ErbB ailesi tirozin kinaz reseptörleri EGFR, ErbB-2 (HER2), ErbB-3, ErbB-4 olmak üzere dört üye içerirler. Bu üyeler homodimer/heterodimer oluşturarak ya da farklı ligandların bağlanmasıyla aktifleşirler ⁴⁸. EGFR'nin fazla ifadesi ya da aktivasyonu KHDAK'nin %50-90'ında gözlenmesi nedeniyle EGFR'yi inhibe etmek için birçok yaklaşım denenmektedir ⁴⁹. İlk olarak EGFR'nin hücre dışı bölgesine bağlanan monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. Daha sonra hücre içi tirozin kinaz aktivitesini engelleyen küçük molekül inhibitörleri geliştirilmiştir. 2004 yılında EGFR kinaz bölgesinde olan mutasyonlar tirozin kinaz inhibitörlerine duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir ^{50, 51}. Ekzon 19 delesyonu ya da ekzon 21 L858R mutasyonu ile oluşan mutant EGFR, yabancıl tip reseptöre göre daha fazla ve uzun süreli aktivasyona sahiptir ⁵⁰ (Şekil 6).



Şekil 6. Akciğer kanserinde en sık gözlenen EGFR mutasyonları ⁵²

Mutant EGFR genellikle RAS/RAF/MEK/MAPK yolağı yerine daha çok PI3K/Akt ve STAT3/STAT5 yolaklarını kullanarak sinyal iletir (Şekil 7) ⁵³. EGFR mutasyonları Doğu Asyalı sigara içmeyen adenokarsinomlu kadın akciğer kanseri hastalarında daha sıklıkla gözlenmektedir ³⁶.



Şekil 7. EGFR sinyal yolağı

EGFR mutant tümörler tirozin kinaz inhibitörlerine daha duyarlıdır. Tümörün EGFR mutasyonu ile gelişmeye başlaması ve

devamlılığı için bu sinyalleşmeye gereksinim duyması onkogen bağımlılığının güzel bir örneğidir. EGFR inhibisyonuna cevap veren akciğer kanser tümörü genellikle kısa bir süre sonra bu baskılamaya duyarsızlaşır. Tirozin kinaz inhibitörlerine dirençte EGFR'de ekzon 20 insersiyonları, T790M ikincil mutasyonu (hastaların %50'sinde gözlenmiştir), KRAS mutasyon ya da amplifikasyonu ve MET protoonkogeninin amplifikasyonu (hastaların %20'sinde) gözlenmiştir ^{54, 55, 56, 57}. MET, PI3K yolağını EGFR ve ERBB2'den bağımsız olarak ERBB3'ü fosforilleyerek aktiveştirir. MET'in inhibisyonu TKI'ne olan duyarlılığı yeniden oluşturabilir ⁵⁷. Akciğer adenokarsinomlarında aktiveleşmiş mutant EGFR interlökin 6 seviyelerini arttırmış, bu da STAT3'ü aktiveştirmiştir. IL-6 ayrıca JAK ailesi tirozin kinazları aktiveştirerek. STAT3, MAPK ve PI3K sinyal yollarını uyarmaktadır ⁵⁸.

2.5.2. Akciğer Kanserinde RAS/RAF/MEK/MAPK Yolağı

RAS protoonkogen ailesi KRAS, HRAS, NRAS ve RRAS olmak üzere, dört adet, homolog, 21 kDa'luk membrana bağlanan proteinden oluşur. RAS genleri tarafından kodlanan proteinler aktif ve inaktif formda bulunurlar. Aktif formda RAS proteinine GTP bağlıdır. İnaktif formda ise GTP, GDP'ye dönüşmüştür ⁵⁹. Aktiveleştirici nokta mutasyonları GTPaz aktivitesinin kaybolmasına neden olarak GTP'nin GDP'ye dönüşmesi engellenir ve proteinin onkolojik potansiyeli artar. Bu durum kontrolsüz hücre bölünmesiyle sonuçlanabilir. RAS/RAF/MEK/MAPK yolağının KRAS mutasyonları nedeniyle oluşan aktivasyonuna akciğer kanserinde çok sık rastlanır. KRAS mutasyonları akciğer kanserinin %20'sinde, adenokarsinomların %30-50'sinde görülür ⁶⁰. KRAS'da gözlenen mutasyonların %80'i 12. kodonda, kalanlar da 13. ve 61. kodonlardadır. Mutasyon sonucu PI3K ve MAPK sinyal yolları aktiveleştigiinden, KRAS mutant tümörler EGFR sinyalleşmesini

kullanmazlar, dolayısıyla EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine dirençlidirler ⁶¹. KRAS mutasyonları çoğunlukla sigara içen akciğer adenokarsinomlu hastalarda görülür ⁶². RAS proteinlerinin hücre zarına yerleşimini ve post translasyonel modifikasyonlarını inhibe etmek için farnesiltransferaz inhibitörleri ve RAS'a karşı antisens oligonükleotidler kullanılmış, ancak başarısızlıkla sonuçlanmıştır ⁶⁰. Daha sonra RAS yolağının efektörleri olan RAF kinaz ve mitojen aktivasyonlu protein kinaz (MAPK) kinaz (MEK) molekülleri üzerine yoğunlaşmıştır ⁶³. BRAF; RAS'ın doğrudan etkilediği bir moleküldür. BRAF melanomada genellikle mutasyona uğrasa da (%70), akciğer kanserinde mutasyonları oldukça azdır (%3) ⁶⁴.

2.5.3. MYC

RAS/RAF/MEK/MAPK yolağının en önemli efektörlerinden biri myc protoonkogenidir. Normalde bu transkripsiyon faktörü hücre sel proliferasyonu kontrol eder, ancak amplifikasyon ya da fazla ifadesi akciğer kanserinde sıklıkla gözlenir ⁶⁵. Myc protoonkogen ailesi üyeleri (myc, mycn, myc1) RAS sinyalleşmesinin hedefleridir ve hücre çoğalması gibi pek çok işlevin anahtar düzenleyicileridir ⁶⁶.

2.5.4. Akciğer Kanserinde EML4-ALK Füzyon Proteini

Akciğer kanseri gibi solid tümörlerde kromozom translokasyonları ile oluşan onkogenik füzyon proteinlerine çok sık rastlanmamaktadır. 2007 yılında küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarında transformasyon yeteneği olan yeni bir füzyon proteini keşfedilmiştir. İkinci kromozomun kısa kolunda birbirine yakın yerleşmiş iki genin inversiyonuyla sonuçlanan EML4-ALK füzyon proteini, mitojenik sinyali süreklileştirir ve malign transformasyona neden olur ⁶⁷. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde %4 sıklıkla gözlenen EML4-ALK füzyon

proteini EGFR ve KRAS mutasyonlarından bağımsız olarak bulunur, genellikle sigara içmeyen adenokarsinomlularda gözlenir. EML4-ALK füzyonu olan hastalar ALK hedefli tedavilere ve Crizotinib'e cevap vermektedir ⁶⁸.

2.5.5. Akciğer Kanserinde PI3K/AKT/mTOR Yolağı

Fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K); hücre çoğalması, sağ kalım, adhezyon gibi hücresel olayları düzenleyen bir lipid kinazdır ⁶⁹. Akt ise protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen, tümör oluşumu ve ilerlemesinde etkili bir serin treonin kinazdır. Akt'nin aktivasyonu PI3K'a bağlıdır. PI3K ise aktif hale gelmiş büyüme reseptörlerinden, integrin gibi hücre adhezyon moleküllerinden, G-protein bağlı reseptörlerden ve Ras gibi onkogenlerden aldığı sinyallerle aktive olur. PI3K, fosfatidilinozitol-4 fosfatı, fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat (PIP2), fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfatı, fosfatidilinozitol-3,4,5-trisfosfat (PIP3) dönüştürür. PI3K enzimi, 85kDa'luk düzenleyici altbirim (p85) ve 110kDa'luk katalitik altbirimden (p110) oluşur. PI3K aktivasyonu, p85'deki SH2 (Src-homoloji 2) bölgesinin aktif büyüme faktörü reseptöründeki fosfotirozin birimleriyle etkileşmesi sonucu ya da p110'un doğrudan aktif Ras ile etkileşmesiyle olur ⁷⁰.

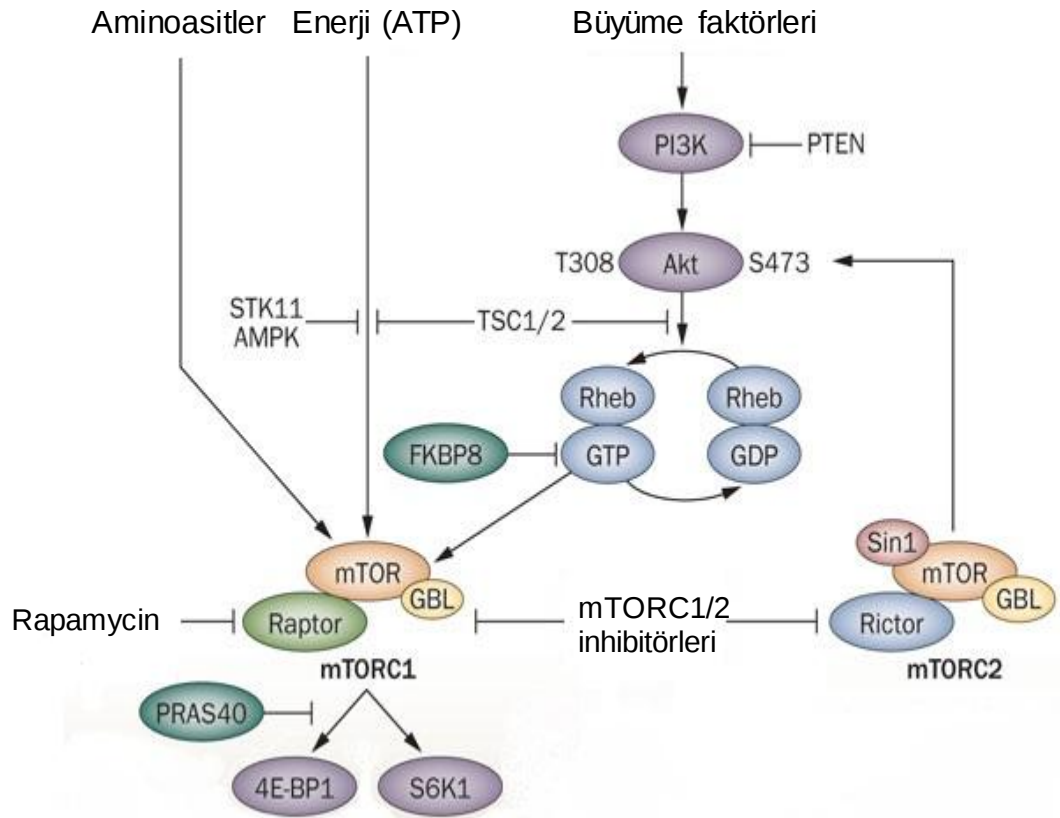
PI3K'ın oluşturduğu 3'fosfoinozitidler, fosfoinozitid bağımlı kinaz-1 (PDK-1)'in ve Akt'nin plekstrin homoloji (PH) bölgesine bağlanır ve her bir kinazın hücre zarına translokasyonuna neden olur. PDK-1, Akt'yi aktivasyon bölgesinde bulunan treonin 308 (T308) amino asitinden fosforile eder ⁷¹. Akt'nin tam aktivasyon için düzenleyici bölgede bulunan serin 473 (S473) amino asitinden de fosforile olması gerekmektedir. mTOR/Rictor kompleksi (TORC2), PDK-1, integrin bağımlı kinaz (ILK), AKT'nin kendisi, DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK) Akt'yi S473'den fosforile edebilmektedir ^{72, 73}. Akciğer tümörigenezinde PI3K/AKT/mTOR

aktivasyonu erken patogeneze görölür. Aktivasyon genellikle PI3K, PTEN, EGFR, KRAS mutasyonları ile olur ⁷⁴ ve apoptozisi baskılayarak hücre sağkalımına neden olur.

PI3K'in katalitik alt ünitesini kodlayan PIK3CA mutasyonları ya da amplifikasyonları skuamöz hücre karsinomunda sıklıkla görölür ⁷⁵. Aynı zamanda bu yolak bir serin/treonin kinaz olan AKT'de de mutasyonlar nedeniyle aktifleşebilmektedir. Bu yolağın iki negatif düzenleyicisi vardır. Bunlar PTEN ve TSC1/TSC2 kompleksleridir.

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), PIP3'deki 3' fosfatı kopararak PI3K aktivitesinin tersi bir görev yapar. ⁷⁶. Bir tümör süpresör protein olan PTEN; PI3K'in bir ürünü olan fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat (PIP3) üzerinde fosfataz aktivitesi göstererek, PI3K/AKT yolağını negatif olarak düzenler ⁷⁷. AKT'nin etkilediği bir serin/treonin kinaz olan mTOR, hücre büyümesi, hücre hareketi ve sağ kalımında önemli bir sinyalleşme enzimidir ⁷⁸. mTOR, 289 kDa'luk iki farklı multiprotein komplekslerinde (mTORC1 ve mTORC2) bulunan bir kinazdır (Şekil 8).

mTORC1 kompleksinde mTOR'a ek olarak, mLST8(GBL) ve Raptor da bulunur. mTORC1, protein sentezinin, ribozom biyogenezinin ve otofajinin kontrolünde görev alan hücre büyümesinin en önemli düzenleyicilerinden biridir. mTORC1 aktivitesi, rapamycin ya da analogları ile inhibe edilebilmektedir.



Şekil 8. PI3K/AKT sinyal yolağı⁷⁹

mTORC2 ise mTOR ile birlikte mLST8 (GBL), Sin1 ve Rictor'dan oluşur. mTORC2, aktin hücre iskeletini kontrol eder⁸⁰. Akt, mTOR'u S2448'den fosforlayarak kinaz aktivitesini artırır⁸¹. Ayrıca Akt, TSC2 (tuberus sclerosis complex 2)'i fosforlayarak inaktive eder⁸². TSC2, Rheb-GTP'yi, Rheb-GDP'ye dönüştüren bir GTPazdır. Rheb-GTP, mTOR'un pozitif düzenleyicisidir. TSC2'nin Akt tarafından inaktivasyonu, Rheb-GTP düzeyinin artmasına neden olur ve mTOR'un aktivasyonuna yardımcı olur⁸³. Bununla birlikte Akt, PRAS40'i fosforlayarak inaktive eder. PRAS40, mTORC1 kompleksinde yer alan bir negatif düzenleyicidir. PRAS40'ın Akt tarafından fosforlanıp inaktive edilmesiyle mTORC1 aktifleşir⁸⁴. GSK3'ün Akt tarafından fosforlanıp inaktive edilmesi, TSC2'nin GSK3 tarafından aktifleşmesini engeller⁸⁵. Aktif mTOR protein

sentezini, S6-kinaz (S6K1) ve 4E-BP1'i fosforlayarak başlatır⁸⁶. S6K1'in fosforilasyonu, küçük ribozomal protein S6'nın ve ökaryotik translasyon faktörü eIF-4B'nin aktivasyonunu sağlar. 4E-BP1'in mTOR tarafından fosforilasyonu 4E-BP1'in eIF-4E'den ayrılmasını sağlar ve böylece cap-dependent translasyondaki eIF-4F kompleksi oluşur⁸⁷. PI3K/AKT/mTOR yolağını hedefleyen terapiler (LY294002 ve rapamycin gibi) aktif AKT sinyalleşmesi görülen küçük hücreli dışı ve küçük hücreli akciğer kanserinde etkilidir⁸⁸.

2.6. Soy Bağımlı (Lineage Dependent) Onkogenler

Kanser biyolojisinde yapılan çalışmalar tümör hücrelerinin farklılaşma durumlarının kanser gelişiminde önemli olduğunu göstermiş ve bu durum soy bağımlılığı olarak adlandırılmıştır. Örneğin, hematolojik malignansilerden akut promiyelositik lösemide neoplastik hücreler farklılaşmadan kalmıştır ve tedavisinde bu hücreleri farklılaştıracak bir ajan olan ATRA (all-trans retinoik asit) kullanılmaktadır⁸⁹. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde yapılan genom taramalarında DNA kopya sayısındaki değişimler adenokarsinomda 14q13.3'de, skuamöz karsinomda ise 3q26.33'de amplifikasyonlar olabileceğini ortaya çıkarmıştır^{90, 91, 92}. Fonksiyonel analizler bu bölgelerin sırasıyla NKX2-1 ve SOX2 olduğunu göstermiştir. NKX2-1 soya özgün bir transkripsiyon faktörüdür ve normal akciğer gelişiminde dallanma morfogenezinden ve alveolar tip 2 hücrelerin oluşumundan sorumludur^{93, 94}. Bu tür öncül hücre bağımlı transkripsiyon faktörleri hem normal organogenezden hem de tümör oluşumundan sorumlu olabilen proteinlerdir. Daha önce yapılan çalışmalar NKX2-1'in akciğer adenokarsinomunda onkogenik rollerinden bahsederken^{92, 95}, diğer bir in vivo çalışmada tümör baskılayıcı özelliği olduğu ortaya konmuştur⁹⁶. SOX2 gen amplifikasyonu özellikle skuamöz

hücre karsinomunda görülmüş ve onkogenik aktivitesi olduğu vurgulanmıştır ^{90, 97}.

2.7. Tümör Baskılayıcı Genler ve Büyüme Engelleyici Yolaklar

Tümör baskılayıcı genlerin kaybı akciğer karsinogenezinde önemli bir adımdır, genellikle tüm alellerin heterozigosite kaybı ile ortadan kalkması sonucu oluşur ⁹⁸. TP53, RB1, STK11, CDKN2A, FHIT, RASSF1A, PTEN gibi genler akciğer kanserinde genellikle inaktive olmuş tümör baskılayıcı genlerdir.

2.7.1. P53

17p53'de bulunan TP53, hücre bölünmesinde genetik hasarın yeni oluşan hücrelere geçmesini engelleyen bir proteindir. Hücresel strese cevapta, p53 siklin bağımlı kinaz inhibitörleri gibi çeşitli genlerin ifadesini indükler. Bu genler, hücre döngüsü kontrol noktası sinyallerini düzenler ve hücrenin G1'de takılmasına neden olarak DNA tamiri ve apoptozu sağlar ⁹⁸. p53 inaktive edici mutasyonlar, akciğer kanserinde en sık görülen değişimlerdir ⁹⁹. Kanserlerin pek çoğunda görülen p53 inaktive edici mutasyonlar nedeniyle, terapötik stratejiler üzerine pek çok çalışma yapılmaktadır. Örneğin yabanıl tip p53'ü gen terapisi ile ya da mutant p53'e yönelik terapilerle, p53-MDM2 etkileşimini hedefleyen küçük molekül inhibitörleriyle çalışmalar yapılmaktadır ¹⁰⁰. P53'ün yıkımını sağlayan MDM2 onkogeninin de p53'ün düzenlenmesinde rolü vardır. Bununla birlikte p14^{ARF} izoformu olan CDKN2A'nın MDM2'yi baskılayıcı bir görevi vardır. MDM2 amplifikasyonu küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin %6'sında görülürken, p14^{ARF} kaybı küçük hücreli olmayan

akciğer kanserinin %40'ında, küçük hücreli akciğer kanserinin ise %60'ında görülmektedir^{101, 102}.

2.7.2. CDKN2A/RB

CDKN2A/RB1 yolağı G1/S geçişini kontrol eder. RB1 geni tarafından kodlanan hipofosforile retinoblastoma (RB) proteini, G1/S geçişini E2F1 transkripsiyon faktörüne bağlanarak düzenler. RB proteininin CDK-CCND1 tarafından hiperfosforilasyonu onun tümör baskılama aktivitesini etkiler. CDK-CCND1 kompleksinin oluşumu ise CDKN2A tarafından engellenir¹⁰³. RB akciğer kanserinde tanımlanan ilk tümör baskılayıcı gendir¹⁰⁴. RB, mutasyonları ya da fonksiyon kaybı küçük hücreli akciğer kanserinin %90'ında görülür, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde ise %10-15 kadardır¹⁰⁵

2.7.3. STK11 (LKB1)

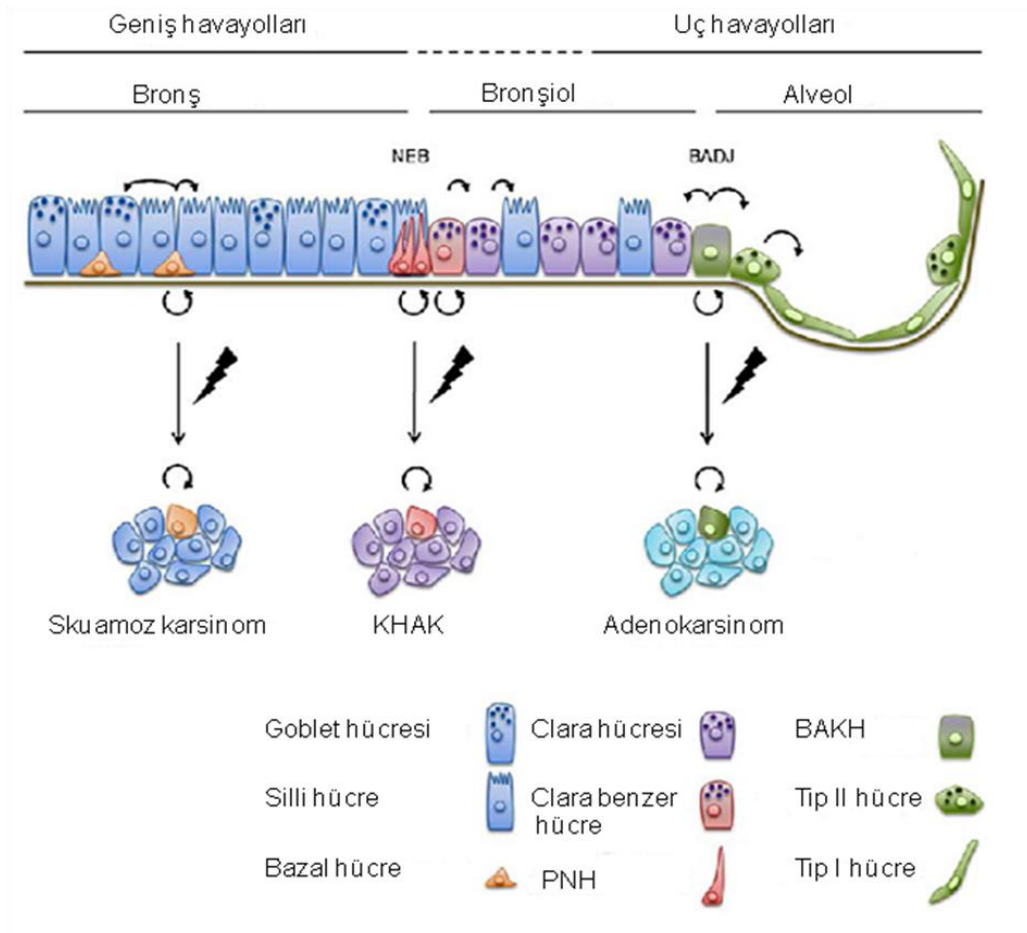
STK11; hücre polaritesini, hareketini, farklılaşmasını, metastazı ve metabolizmasını düzenleyen tümör baskılayıcı bir gen görevi görür. STK11'in germline inaktive edici mutasyonları Peutz-Jeghers sendromuna neden olur¹⁰⁶, ancak somatik inaktivasyonuna nokta mutasyonları ya da 19p13'ün delesyonu neden olur. Akciğer kanserinde %30 sıklıkla, p53 ve KRAS'dan sonra adenokarsinomlarda en fazla mutasyonu gözlenen gendir^{107, 108}. STK11 mutasyonları genellikle KRAS aktivasyonu ile bağlantılıdır ve hücre büyümesini uyarırlar¹⁰⁹. STK11, tümör baskılayıcı etkisini Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK) ile mTOR yolağını inhibe ederek yapar¹¹⁰. STK11 inaktivasyonu küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sık görülürken, küçük hücreli akciğer kanserinde daha az görülür. Erkek sigara içen hastalarda ve daha az farklılaşmış adenokarsinomlarda daha sık gözlenir^{107, 108, 109}.

2.8. Akciğerde Bulunan Hücre Tipleri ve Görevleri

Akciğer epiteli gaz değişimi, detoksifikasyon, immun yanıt oluşturma gibi görevleri olan morfolojik ve fonksiyonel olarak birçok farklı hücre tipinden oluşmuştur ¹¹¹. Bu akciğer epitel hücreleri pulmoner ağaç boyunca özelleşmiş görevleri yerine getirmek için organize olmuştur. Solunum yollarının proksimal kısmı farinks, larinks, trake ve bronşdan oluşur. Trakeal havayolu epiteli yüzeyi kayganlaştırıp, yabancı maddelerin dışarı atılmasını sağlayan silli ve mucus salgılayan goblet hücrelerden oluşmuştur. Pulmoner alan daha küçük bronşiyollere ve distal havayollarının alveollerine dallandıkça silindirik epitel hücreleri kübik morfolojiye dönüşür. Burada akciğer epiteli koruma ve detoksifikasyon görevi yapan Clara hücrelerinden oluşmuştur. Akciğerin en uç kısımları gaz değişiminin yapıldığı terminal bronşiyollerden ve alveolden oluşur. Alveol, tip 1 ve tip 2 pnemositlerden oluşur. Tip 1 pnemositler gaz değişimi yaparken, tip 2 pnemositler daha kübik yapıdadır ve sürfaktan proteinler salgılayarak akciğer epiteline elastikiyet sağlarlar ¹¹¹.

Akciğer epitelinin yenilenmesi kan, gastrointestinal sistem ve deride olduğu gibi hızlı değildir. Ancak hasar durumunda, kök hücrelerin olduğu özel yerlerde hücre dönüşümü olduğu düşünülmektedir ¹¹². Trakea ve bronşlarda bulunan epitelde hücre değişiminin bazal hücreler adı verilen bir grup akciğer epitel hücresinden gerçekleştiği düşünülmektedir ¹¹³. Bazal hücrelerin en belirgin özelliği sitokeratin 5 ve 14 ve p63 proteinlerini ifade etmeleridir ¹¹⁴. Naftalin uygulamasının ardından silli, bazal ve Clara hücrelerinin aktive olduğu, yayıldığı, salgı ve silli hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir ¹¹⁵. Bazal hücrelerin multipotent başlatıcı hücre popülasyonu içerdiği ve akciğer epitelini yenileyebildiği düşünülmektedir ¹¹⁶.

Buna ek olarak insan akciğerinde p63 ifade eden hücrelerin de kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesinin olması bazal hücrelerin kök hücre özelliği gösterdiğinin bir diğer kanıtıdır. Keratin 14 ekspres eden hücrelerden skuamöz hücre karsinomlarının gelişmesi, kanser kök hücre hipotezine göre bazal hücrelerin tümörü başlatan hücreler olabileceğini göstermektedir (Şekil 9) ¹¹⁷.



Şekil 9. Akciğer epitel hücre tipleri ve akciğer kanserinin köken aldığı hücreler¹¹⁸

Clara hücreleri, CCSP (Sekretogloblin, scgb1a1, CC10) ifade eden, bronşiyollerde bulunan kubbe şeklinde, salgı yapan hücrelerdir ¹¹⁹. Clara hücrelerinin de farklılaşma yeteneğine sahip olduğu ancak kendini yenileme kapasitesinin olmadığı bilinmektedir. Ancak Clara benzeri

hücreler olarak da adlandırılan naftaline dirençli Clara hücrelerinin sitokrom P450 2F2 (CYP2F2) enzimleri yoktur. Bu nedenle naftalin uygulamasından etkilenmemektedirler ¹²⁰. Bronşiyollerde bulunan variant Clara hücrelerinin ve pulmoner nöroendokrin hücrelerinin (PNH) naftalin uygulamasından sonra çoğaldığı ve havayolu epitel onarımına katıldığı gösterilmiştir ^{121, 122}. Ancak fare akciğerinde yapılan çalışmalarda variant Clara hücrelerinin hem kendini yenileme hem de farklılaşma özelliği varken, pulmoner nöroendokrin hücrelerin farklılaşma özelliğinin olmadığı gösterilmiştir. KHAK, akciğer kanserinin en agresif ve metastatik tipidir ve genellikle ilk kemoterapiden sonra yeniden oluşur ¹²³. PNH'lere benzer olarak KHAK, nöroendokrin özellikler gösterir, kalsitonin benzeri bir peptid ifade eder ve bronşiyollerin ortasında gelişir. Bu nedenle küçük hücreli akciğer kanseri kökeninin kendini yenileyebilen PNH'ler olabileceği düşünülmektedir ¹²⁴ (Şekil 9). Akciğer ağının en ucunda ise terminal bronşiyoller alveole dönüşür. Alveolar epitel yassı tip 1 pnemositlerden ve kübik tip 2 pnemositlerden oluşmuştur. Tip 1 pnemositler alveol ve kapiller arasında gaz değişimi yapan, terminal farklılaşmaya uğramış hücrelerdir. Tip 2 hücreler ise yüzey gerilimini kontrol etmek için surfaktan protein salgırlar. Yapılan bir çalışmada tip 2 pnemositlerin tip 1'e farklılaşabildiği gösterilmiştir ¹²⁵.

Farelerde bronşioalveolar geçiş bölgesinde (bronchioalveolar duct junction, BADJ) kök hücre nişinin olduğu bulunmuştur. Naftalin ile alveolar yıkım sonrası BADJ'de bulunan hücreler Clara hücre belirteci olan CCSP'i ifade etmiş ve alveoliyi yeniden oluşturmuşlardır ¹²⁶. BADJ'de bulunan ve naftalin hasarından sonra kendini yenileyebilen bu kök hücrelere "bronşioalveolar kök hücre" ismi verilmiştir (bronchioalveolar stem cells (BASCs)) ¹²⁷. Bu hücreleri izole etmek için Hoechst 33342 boyası, CD133 ve ALDH gibi belirteçler kullanılmıştır.

2.9. Akciğer Kanseri Kök Hücreleri ve Pluripotensi

Kanser gelişimsel bir süreç izler ve normal gelişim yolları da kanser patogeneğinde etkilidir. Bu durumda tümörün gelişimi anormal organ gelişimi ile analogdur. Normal bir organogeneğinde kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması ile heterojen hücre fenotipine sahip fonksiyonel bir organ oluşur. Tümörigeneğinde ise kendini yenileme ve farklılaşma süreci, çok hızlı bölünen ve değişik bir şekilde farklılaşmış kanser dokusunun oluşumuyla sonuçlanır. Normal gelişim sürecinde ve kanserin başlama aşamasında kendini yenileme ve farklılaşma süreci normal organ ve tümör oluşumunda belirgin bir şekilde rol oynamaktadır. Ancak tümörlerin bu kapasiteye nasıl ve nerede sahip oldukları halen tartışılmaktadır. Kanser kök hücre hipotezi tümörün kendini yenileme ve heterojenite özelliklerine açıklama getirmektedir ¹²⁸. Kanser kök hücre hipotezini destekleyen görüşlerden biri, transformasyon için gerekli olan onkogenik mutasyonların kök hücrelerde birikmesiyle kanserin oluşumudur. Dolayısıyla, tümör hücresinin kökeni bir kök hücre ya da progenitor hücre olabilir. Bu görüşün kanıtı kronik miyeloid lösemi gibi miyeloproliferatif hastalıklarda gösterilmiştir. Örneğin, Jun mutasyonları öncül hematopoietik kök hücrelerde kronik miyeloid lösemiye (KML) neden olurken, aynı mutasyon olgun hematopoietik hücrelerde hastalık oluşumunda etkili değildir ¹²⁹. Bununla birlikte tümör hücreleri ve kök hücrelerde telomer revers transkriptaz (hTERT), öncül hücre belirteçleri gibi benzer genlerin ifadesi gözlenmektedir.

Kanser kök hücresi hipotezine göre, tümör içinde kendini yenileme ve asimetric bölünme yeteneğinde olan kök hücre benzeri hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler farklılaşmış hücrelere dönüşebilme özelliğindedir ^{130, 131}. Kanser kök hücrelerinin varlığına ilişkin ilk kanıt akut-miyeloid lösemide bulunmuştur ¹³², akciğer kanseri dahil solid tümörlerde

varlıkları henüz bilinmemektedir. Kanseri kök hücresi için pekçok farklı yüzey belirteci tanımlansa da, her tümör ve dokuda bu belirteçler farklı olabilmektedir. Akciğer kanseri için ortak bir yüzey belirteci tanımlanamamıştır, bu da tümör heterojenitesini göstermektedir ^{133, 134, 135, 136, 137}. Akciğer kanserinde kanser kök hücrelerinin düzenlenmesi, normal akciğer gelişiminde de aktif olan Hedgehog, Wnt ve Notch kök hücre sinyal yolları ile olmaktadır ¹²⁸.

Kanser kök hücreleri, diğer tümör hücrelerine göre sitotoksik terapilere ve radyoterapiye daha dirençlidir. Geleneksel tedaviler başlangıçta farklılaşmış tümör hücrelerini öldürüp, tümörü küçültse de, bu tedaviler kanser kök hücre popülasyonunu etkilemediği için tümör yeniden oluşmaktadır. Eğer tedavi kendini yenileyebilen kanser kök hücrelerini hedeflemezse, tedavinin ardından kalan kanser kök hücreleri tümörü tekrar oluşturabilmektedir. Örneğin CD34+CD38- lösemi kanser kök hücreleri ABCG2, MDR1 gibi pompalar nedeniyle geleneksel terapilere oldukça dirençlidirler ¹³⁸. Akciğer kanserinde bu artmış direnç, primer tümörlerde ¹³⁷ ve fare ksenograflarında gösterilmiştir ¹³³. Kanser kök hücre popülasyonunu hedefleyen tedaviler öncelikle kanser kök hücresinde aktif olan yolları inhibe ederek geleneksel tedavilere duyarlılaştırmaya çalışmaktadır ¹³⁹.

Kanser hücrelerinin embriyonik kök hücreye ya da indüklenmiş pluripotent kök hücreye benzer karakteristik özellikleri vardır. Ayrıca, embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler bağışıklık sistemi zayıflatılmış fareye enjekte edildiğinde teratom oluştururlar ¹⁴⁰.

Hedgehog (HH), Wnt ve Notch sinyal yolları normal akciğer gelişiminde ve tümör gelişiminde önemlidir. Bu yolların kök hücre

yenilenmesinde ve korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Kansere hücrelerinde bazen bu genlerin mutasyonlarına rastlanmaktadır ¹⁴¹. HH yolağında sinyal artışı, gen transkripsiyonunu düzenleyen GLI (GLI1, GLI2, GLI3) onkogenlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır ¹⁴². Aktif HH sinyal yolu başta küçük hücreli olmak üzere küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde de gösterilmiştir ^{143, 144}. Notch sinyal yolağı hücre kaderinin belirlenmesi, sağkalımın uyarılması için gereklidir ¹⁴⁵. Meme kök hücreleriyle yapılan bir çalışmada IL-6'nın normal ve tümör meme kanser kök hücrelerinde Notch-3 reseptörünü düzenleyerek Notch sinyal yolağını uyardığı gösterilmiştir ¹⁴⁶. Wnt sinyal yolağının ise organogenez, kanserin başlaması ve ilerlemesi ve kök hücre pluripotensisinin korunması gibi olaylarda rolleri vardır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde Wnt1, Wnt2 ve Wnt7a düzensizliği ve Wnt yolak agonistlerinin (Dvl proteini, LEF1, Ruvb11) ifade artışı, antagonistlerinin (WIF-1, sFRP1, CTNNBIP1 ve WISP2) ise azalışı gözlenmiştir ^{147, 148}.

2.10. Akciğer Kanserinde EGFR Mutasyonlarının Önemi

EGFR büyüme faktörüyle başlatılmış reseptör dimerizasyonu, anahtar tirozin birimlerinin katalitik tirozin kinaz bölgelerinin aktivasyon bölgelerine ATP'den γ -fosfatların transferi ile olur. Sonrasında, SRC homoloji 2 ve protein bağlanma bölgelerine sahip olan uygun adaptör ya da sinyalleşme molekülleri, karboksiterminal fosfotirozinlerine bağlanır ve sinyalleşme yolağını aktifleştirir ¹⁴⁹. EGFR ve ERBB2'nin seçici engellenmesi birçok epitelyal kanserde etkili bir terapötik yaklaşımdır.

Akciğer kanserinde, EGFR'deki aktifleştirici mutasyonlar kinaz bölgesini kodlayan ekzonlar (18-21) içinde yer alır (Şekil 6). Multigenomik çalışmalar EGFR mutant akciğer kanserinin genomda çeşitli genlerde ifade, mutasyon ve amplifikasyon açısından eşsiz bir hastalık fenotipi

sergilediğini göstermiştir. Örneğin, EGFR mutant küçük hücreli dışı akciğer kanserinde serin-treonin kinaz 11 (STK11) (LKB1) mutasyonları çok nadir olarak gözlenirken, dual spesifik fosfataz 4 (DUSP4) ve siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A (p16) kaybı görülmektedir ^{150, 151}. L858R ve G719S mutasyonlarına sahip EGFR'nin kristal yapısı bu mutasyonların kinazı otoinhibitör etkileşimlerini bozarak aktifleştirdiğini, bu durumun da reseptörün aktivitesinde 50 kat artışla sonuçlandığını göstermektedir ¹⁵². Biyokimyasal analizler ekzon 19 delesyonu ya da L858R'nin EGFR'nin kinaz aktivitesini ve transformasyon kabiliyetini arttırdığını göstermiştir. Gefitinib ve erlotinib doğal tip EGFR'ye kıyasla, tirozin kinaz inhibitörlerine duyarlı mutant EGFR'ye daha iyi bağlanırlar ¹⁵³.

EGFR mutant küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde tümörün sağkalımı, bu anormal kinaz sinyalleşmesine bağlıdır. Bu yolağın gefitinib ya da erlotinib ile inhibisyonu intrinsik apoptotik yolağın uyarımı ve hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır. Bu süreç ERK sinyalleşmesi ile regüle olabilen ve bir pro-apoptotik protein olan BIM aracılığıyla olur ¹⁵⁴.

Bir diğer merak uyandıran konu ise EGFR mutant tümörlerin Doğu Asyalılarda ve beyaz ırkta aynı biyolojik özellikleri gösterip göstermediğidir. Yapılan çalışmalarda bu iki hasta grubunu ayıran önemli bir farklılık bulunmamıştır. Klinik olarak bu iki hasta grubunda EGFR mutasyonlarının prognostik farkı, sağ kalım süreleri ve gelişen direnç mekanizmaları aynı bulunmuştur ¹⁵⁵.

2.10.1. EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Gelişen Direnç

Akciğer kanserinde onkogen bağımlılığının en iyi örneği olan EGFR mutant tümörler, ilk kez 2004'de keşfedilmiştir. Bu tümörler

adenokarsinom histolojisi gösterir ve doğal tip EGFR tümörlerine göre daha iyi prognozları vardır ¹⁵⁶. Metastatik akciğer kanserli hastaların ortalama sağkalım süresi 1 yılken, metastatik EGFR mutant tümörlü hastalar ilk jenerasyon EGFR tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilirse sağkalım süreleri 2 yıla uzamıştır. Ancak ne yazık ki tirozin kinaz inhibitörlerine birincil direnç gelişir ve bu durum etkinliği oldukça azaltır ¹⁵⁶.

İlk EGFR inhibitörlerinden olan gefitinibin keşfiyle, araştırmacılar her 100 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastasının 10'undan iyi sonuçlar elde etmiştir. Faz II çalışmalarında ise ilaca yanıt veren hastaların adenokarsinom histolojisine sahip, Doğu Asyalı, sigara içmeyen kadın hasta oldukları gözlenmiştir ¹⁵⁷. 2004 yılında, EGFR'nin kinaz bölgesinde bulunan mutasyonların keşfiyle, akciğer tümörlerinde gefitinib ve erlotinibe hassas olan hastaların klinik özellikleri daha iyi anlaşılmıştır ^{36, 50, 51}.

EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin çalışmasına uygun bir mutasyon olmasına rağmen, akciğer tümörleri TKI (tirozin kinaz inhibitörü) terapilere de novo direnç gösterir. EGFR mutant tümörlü hastalar arasında TKI'lara %75 cevap alınırken, %25'i etkisiz kalmaktadır. Hastalarda TKI tedavisi ile tümör küçülmesi olmasına rağmen boyut değişikliğindeki bu azalma solid tümörlerde ilaca yanıt kriterlerini karşılamaya yetmeyebilir. Bu kriterlere göre tümör tek boyutta %30 ya da daha fazla küçülmelidir. %20-25 oranındaki tümör küçülmesi hastalar için faydalı olsa da, bu tümüyle durağan bir hastalık olarak tanımlanmamaktadır ¹⁵⁸.

2.10.2. İlaça Dirençli EGFR Mutasyonları

EGFR geninde ekzon 18-21 arasındaki bazı mutasyonlar TKI direnci ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin ekzon 20'deki küçük insersiyon ya da delesyonlar KHDAK'nin %5'inde gözlenmiştir. In vitro çalışmalar bazı mutasyonların ekzon 19 delesyonu ya da L858R mutantlara göre TKI'ne daha hassas olduğunu göstermektedir ¹⁵⁹.

2.10.3. EGFR Mutasyonları ile Birlikte Gözlenen Diğer Genomik Değişimler

EGFR mutasyonlu tümörlerin EGFR inhibitörlerine cevap vermemesinin diğer bir nedeni EGFR sinyal yolağında bulunan sinyal moleküllerindeki değişimlerdir. Örneğin, PI3K'ın p110a alt-ünitesi olan PIK3CA mutasyonları, EGFR mutasyonları ile birlikte KHDAK'nde %2 oranında gözlenmektedir ¹⁶⁰. PTEN ifade eksikliği de TKI'ne azalmış duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir ¹⁶¹. EGFR ve IGF-1R arasındaki etkileşim EGFR mutant hücre hattı modellerinde potansiyel bir direnç mekanizması olarak gösterilmiştir ¹⁶². Bazı EGFR mutant hücrelerin erlotinib varlığında sadece G1 arreste girerken, IGF-1R'ı inhibe eden antikorlarla birlikte tedavi edildiğinde apoptozise uğradıkları belirlenmiştir ¹⁶³. Başka bir çalışmada erlotinib tedavisinde sağ-kalan hücrelerde farklı bir kromatin yapısı gözlenmiş ve bu yeni düzenin IGF-1R ve bir histon lizin spesifik demetilaz enzimi olan KDM5A aracılığı ile olduğu gösterilmiştir ¹⁶².

2.10.4. Yabancıl Tip EGFR Tümörlerinde Direnç

Eğer EGFR geninde ilaca duyarlılık sağlayan bir mutasyon yoksa ve tümör başka bir mutasyon yoluyla gelişmişse, tümör TKI'ne karşı dirençlidir. Örneğin, KRAS geninin GTPaz bölgesinde 12 ve 13. kodonda

gözlenen aktifleştirici mutasyonlar KHD AK'nin %15-25'inde ve sadece EGFR yabanıl tiplerde gözlenmektedir. KRAS mutasyonları sigara içmeyenlere kıyasla eski ya da mevcut sigara içenlerde ve Doğu Asyalılara göre beyaz ırkta daha sık gözlenir. Dolayısıyla KRAS mutant akciğer tümörleri EGFR TKI'ne dirençlidir ⁵⁵.

KHD AK'nin yaklaşık %2'sinde BRAF mutasyonları gözlenir ¹⁶⁴. KRAS mutasyonları gibi BRAF mutasyonları da EGFR'den bağımsızdır. BRAF V600E mutasyonu taşıyan KHD AK hücre hatları MEK inhibitörü PD0325901'e duyarlıken EGFR inhibisyonuna dirençlidir ¹⁶⁵.

Diğer %5'lik kısmın ise anaplastik lenfoma kinaz (ALK) geninde translokasyonu vardır. Echinoderm microtubule-associated protein like 4 (EML4) ALK'nın 5' ucuna bağlanarak oluşan onkolojik yeniden düzenlenimler tanımlanmıştır. Bunlarda ALK'nın tirozin kinaz bölgesi ile çeşitli uzunluklarda EML4 vardır. KRAS ve BRAF mutant tümörlere benzer olarak, ALK füzyon proteinlerinin olduğu tümörlerde genellikle mutasyon yoktur. Klinik olarak ALK pozitif olan tümörler TKI'ne duyarlı değildir ¹⁶⁶.

Bazı direnç mekanizmaları mutasyon nedeniyle oluşmamaktadır. Örneğin hepatosit büyüme faktörü (HGF), MET reseptör kinazın ligandıdır ve bu proteinin artmış ifadesi direnç ile ilişkilendirilmektedir ¹⁶⁷.

2.10.5. EGFR'de Oluşan İkincil Bölge Mutasyonları

EGFR TKI'ne direnç gösteren hastalarda genellikle 790. pozisyonda treonin amino asitinde T790M mutasyonu gözlenir. T790M

mutasyonu ile erlotinib ve gefitinibe rezistans kazanmış EGFR mutant tümörler, hastaların %50'sinde gözlenir ¹⁶⁸. T790M mutasyonun nasıl ilaç direnci geliştirdiğine dair iki mekanizma öne sürülmüştür. Birincisi 790. pozisyonda metiyoninin treonine dönüşmesiyle EGFR'nin ATP bağlanma bölgesinde konformasyonel bir değişim olur ve ilaç bağlanamaz. İkincisi ise T790M mutasyonunun L858R mutasyonuna göre daha fazla ATP afinitesi vardır ¹⁶⁸.

2.11. SOX2

SOX2, bu tez çalışmamızda hedef olarak odaklandığımız, akciğer kanseri gelişiminde ve kemoterapi direncinde rolünü araştırdığımız gendir. SRY ailesinin bir üyesi olan SOX2; farinks, özefagus, trake, bronş ve bronşiyollerin epitel hücrelerinde ifadelenen bir transkripsiyon faktörüdür. Akciğerde periferik ve alveolar bölgelerde bulunmazken, geniş hava yollarında ifade edildiği gözlenmiştir ¹⁶⁹. SOX2, embriyonik ve nöral retinal kök hücrelerin kendini yenilemesinde, dil tat alma tomurcuklarının ve kulak sensör hücrelerinin farklılaşmasında görev alan bir moleküldür. Toksik madde uygulamasının ardından gelişen onarım mekanizmasında bronşiyol epitelde SOX2'nin indüklendiği görülmüştür ¹⁷⁰. SOX2'nin germline delesyonu blastomerin ölümüyle sonuçlanmıştır ¹⁷¹. Erken gelişim sürecinde akciğer epitelinde SOX2 fazla ifadesi ise bronşlarda dallanma morfogenezini bozarak kistik akciğer ve neonatal ölüme yol açmıştır ¹⁷². Bu bilgiler SOX2'nin birçok farklı dokunun embriyonik farklılaşmasını düzenlediğini göstermektedir. SOX2, OCT3/4 ve NANOG ile birlikte embriyonik kök hücre çoklu potansiyelliliğinin sürdürülmesinde önemlidir ¹⁷³.

SOX2 proteini, HMG ve serin aminoasitlerince zengin olan iki bölge içerir. HMG bölgesi hedef DNA'da küçük oluğa bağlanır ¹⁷⁴. Serin

amino asitçe zengin olan bölge ise hedef gen ifadesini sağlar ¹⁷⁵. Nöral progenitör hücrelerde hem HMG bölgesinin hem de serin amino asitince zengin bölgenin EGFR ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadığı yapılan gen aktarım çalışmalarında gösterilmiştir ¹⁷⁶.

SOX2, önbağırsaktan (foregut) oluşan organlarda ifade edilmektedir. SOX2 ifadesinin zamanlaması ve lokalizasyonu çok iyi bir şekilde kontrol edilmektedir. İn vivo bulgulara göre akciğer öncülü oluşunca ekspresyonu kapanmaktadır. Akciğer öncülünün oluşumunun ardından, bu öncül dallanmaya başlayana kadar SOX2 ekspresyonu yeniden başlamaktadır. Dolayısıyla bu dallanma bölgelerinde SOX2'nin az ifadelenmesi akciğerin gelişimi için önemlidir ¹⁷⁷. Bronş ağacında dallanma sırasında SOX2 fazla ifade olursa dallanmada bozukluklar oluşabilmektedir. SOX2'nin belirli zamanlarda downregülasyonu, dallanma indükleyici sinyallere yanıt verebilmek için gereklidir. Ayrıca, hava yollarındaki epitel hücrelerinin farklılaşabilmesi için SOX2 ekspresyonu gereklidir ¹⁷². İmmunohistokimyasal analizler SOX2 protein ifadesinin, p63 pozitif bazal hücrelerde olduğunu göstermiştir ¹¹⁶. Sülfür dioksit uygulamasının ardından SOX2 delesyonunun erişkin trakea epitelinde bazal hücre sayısını ve kendilerini yenileme kapasitesini azalttığı bilinmektedir ¹⁶⁹. Distal hava yollarında Clara, silli ve goblet hücrelerinin varlığının sürdürülmesinde SOX2 gereklidir ¹⁷⁸. Özefagus ve trakea dokularında ve gelişimdeki rollerine ek olarak SOX2, olgun hücrelerin pluripotent hücreye dönüşmesinde görev yapan bir faktördür ¹⁷⁹. SOX2'nin skuamöz akciğer kanserinde adenokarsinoma göre daha fazla ifade edildiği gözlenmiştir ⁹⁷. Ayrıca SOX2 fazla ekspresyonu meme ¹⁸⁰, glioblastoma ¹⁸¹, prostat ¹⁸² ve hepatosellüler karsinom ¹⁸³ gibi çeşitli kanserlerde gözlenmiştir.

SOX2, NANOG ve OCT3/4, embriyonik kök hücrelerde kendini yenileme ağının transkripsiyon faktörleridir. Fiziksel olarak birbirleriyle etkileşerek protein kompleksleri oluştururlar ¹⁸⁴ ve çeşitli genlerin promotorlarına bağlanarak ifadelerini sağlarlar ¹⁸⁵. Fonksiyonel olarak bunlardan herhangi birinin downregülasyonu embriyonik kök hücre farklılaşmasını uyarır ve pluripotent kök hücre evresinin bozulmasını sağlar. OCT4, SOX2 ve NANOG genlerinin birlikte ekspresyonunun yetişkin somatik hücreleri pluripotent kök hücre düzeyine tekrar programlanmasını sağlamıştır ^{186, 187}.

Akciğer kanserinin kökeni ve ilaç direncini çözmek için yapılan moleküler ve klinik çalışmalar halen devam etmektedir. Bu çalışmada in vitro ve in vivo EGFR mutant akciğer kanserinde bir pluripotensi transkripsiyon faktörü olan SOX2'nin önemini, proliferasyonda ve tümörigenezde etkisini araştırdık. Aynı zamanda bazı hücre içi yolların ve çevresel uyarıların SOX2 ifadesi üzerinde etkisini inceledik.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Karbondioksitli etüv (Sanyo, Japonya)
- Biyogüvenlik kabini (NuAire, ABD)
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Leica, Japonya)
- Invert mikroskop (Leica, Almanya)
- Işık mikroskobu (Leica, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific, ABD)
- Elektroforez tankı (BioRad, ABD)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (BioTek, ABD)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)
- Mikropipetler, 10µL, 100µL, 1000µL (Eppendorf, ABD)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Sanyo, Japonya)
- Sıvı azot tankı

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre üreme flaskları, 25cm² ve 75cm² (Corning, ABD)
- Petriler, 35mm, 60mm ve 100mm (Corning, ABD)
- 6 ve 96 kuyucuklu plateler (Corning, ABD)
- 10ul, 100ul ve 1000ul steril pipet uçları (Neptune, ABD)
- Hücre kryo (dondurma) ampülü (Greiner, Almanya)

- Kùltür tũpleri (Corning, ABD)
- Mikrosantrifũj tũpleri (CLP, Almanya)

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Erlotinib (Sigmaaldrich, ABD)
- Triciribine (Sigmaaldrich, ABD)
- LY294002 (Sigmaaldrich, ABD)
- Dimetil sũlfoksit (DMSO) (Ambresco, ABD)
- DMEM besiyeri (Gibco, ABD)
- DMEM/F12 besiyeri (Gibco, ABD)
- RPMI 1640 besiyeri (Gibco, ABD)
- Fetal sığır serumu (FCS) (inaktif) (Gibco, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (Gibco, ABD)
- Glutamin (Gibco, ABD)
- Tripsin-EDTA (Gibco, ABD)
- Fosfat tamponu (PBS) (Gibco, ABD)
- %96 lık Etanol (Merck, ABD)
- DMSO (Sigma, ABD)
- Tris (Sigma, ABD)
- EDTA (Sigma, ABD)
- Asetik Asit (Merck, ABD)
- Sodyum Klorũr (Sigma, ABD)
- Metanol (Merck, ABD)
- Gliserol (Gibco, ABD)
- İnsulin (Sigma, ABD)
- Hepes (Sigma, ABD)
- Ponceau S (Gibco, ABD)
- Tris HCl (Gibco, ABD)

- Temed (Biorad, ABD)
- 29:1 Akrilamid/Bisakrilamid (Biorad, ABD)
- Amonyum Persülfat (Biorad, ABD)
- Bromofenol mavisi (Sigma, ABD)
- β -merkaptoetanol (Sigma, ABD)
- Glisin (Merck, ABD)
- Tween 20 (Gibco, ABD)
- Sodyum dodesilsülfat (SDS) (Amresco, ABD)
- Nitroselüloz membran (Bio-Rad, ABD)
- ECL (Amersham, ABD)
- Sodyum Azid (Sigma, ABD)
- TBST (BioRad, ABD)
- TBS (BioRad, ABD)
- BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma, ABD)
- Yağsız süt tozu
- Doxocyclin içeren hayvan yemi
- Antikor Akt (Cell signaling, ABD)
- Antikor p-Akt (Cell signaling, ABD)
- Antikor SOX2 (Cell signaling, ABD)
- Antikor OCT4 (Cell signaling, ABD)
- Antikor EGFR (Cell signaling, ABD)
- Antikor p-EGFR (Cell signaling, ABD)
- Antikor mt-EGFR (Cell signaling, ABD)
- Antikor p-STAT3 (Cell signaling, ABD)
- Antikor IGFR (Cell signaling, ABD)
- Antikor p-IGFR (Cell signaling, ABD)
- Antikor NANOG (Cell signaling, ABD)
- Antikor p-S6 (Cell signaling, ABD)
- Antikor c-NOTCH (Cell signaling, ABD)
- Antikor HES1 (Santa Cruz, ABD)

- Antikor IGFBP3 (Santa Cruz, ABD)
- Antikor p-FOXO1/3 (Cell signaling, ABD)
- Antikor TUBULIN (Cell signaling, ABD)
- Antikor GAPDH (Cell signaling, ABD)
- Anti Rabbit Sekonder antikor (Cell signaling, ABD)
- Running Buffer (10X) (BioRad, ABD)
- Transfer Buffer (10X) (BioRad, ABD)
- Proteaz inhibitör Kokteyl (Cell signaling, ABD)
- Fosfataz inhibitor Kokteyl (Cell signaling, ABD)
- Mounting media (Dako, ABD)
- Hematiksilen (Sigma, ABD)
- Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma, ABD)
- Sulforhodamine (SRB) (Sigma, ABD)
- GFP plazmit (Sigma, ABD)
- shSOX2 plazmit (Sigma, ABD)
- scr shRNA plazmit (Sigma, ABD)
- LB agar (Sigma, ABD)
- LB Broth (Sigma, ABD)
- Ampicillin (Sigma, ABD)
- Puromycin (Sigma, ABD)
- Optimem (Invitrogen, ABD)
- Lipofektamin (Invitrogen, ABD)
- Formalin (Merck, ABD)
- Matrijel (Invitrogen, ABD)

3.4. Kullanılan Kitler

- BCA protein miktar tayin kiti (Thermo Scientific)
- Plazmit izolasyon kiti (Qiagen, ABD)
- Vectastain Avidin-Biotin Conjugate kit (Vector, ABD)

3.5. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

3.5.1. % 10'luk RPMI1640 Besiyerinin Hazırlanışı

450ml RPMI besiyeri içerisine, 50ml FCS, 200mM L-glutaminden 10ml, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin eklenerek %10' luk RPMI 1640 besiyeri hazırlandı.

3.5.2. % 2'lik DMEM Besiyerinin Hazırlanışı

490ml DMEM besiyeri içerisine, 10ml FCS, 200mM L-glutaminden 10ml, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin eklenerek %1' lik DMEM besiyeri hazırlandı.

3.5.3. Kök Hücre Besiyerinin Hazırlanışı

500 ml DMEM/F12 besiyeri içerisine 25 ml BSA, 2.5 ml insulin (10mg/ml), 5 ml 100IU/ml penisilin, 6.7 ml %45 glikoz, 7.5 ml sodyum bikarbonat, 2.5 ml 1M hepes, 5 ml glutamin, 1ml 2mg/ml heparin eklenerek kök hücre besiyeri hazırlandı.

3.5.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

%10'luk SDS

		<u>200 ml için son konsantrasyon</u>
Sodyum dodesil sülfat	20 g	%10

SDS, 180 ml distile su ile karıştırılır. pH 7.2'ye ayarlanır ve solüsyon distile su ile 1L'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanır.

Amonyum persülfat Solüsyonu (APS)

Amonyum persülfat solüsyonu distile su ile yapılır. 2 g APS, 20 ml dH₂O ile karıştırılır. APS solüsyonu hergün için taze hazırlanır. Karanlık ortamda saklanır.

Yükleme Tamponu

Bromophenol Blue 0,02 g tartılarak 2 ml β -mercaptoethanol ilave edilir. 1 damla HCl damlatılınca turuncu bir renk alması gerekir.

1M Tris Tamponu (pH 6.8)

		<u>200 ml için son konsantrasyon</u>
Tris Base	24.228 g	1 M

Tris base 150 ml distile su ile karıştırılır. pH 6.8'e ayarlanır ve solüsyon distile su ile 200 ml'ye tamamlanır.

1,5 M Tris Tamponu (pH 8.8)

		<u>200 ml için son konsantrasyon</u>
Tris Base	24.228 g	1,5 M

Tris base 170 ml distile su ile karıştırılır. pH 8.8'e ayarlanır ve solüsyon distile su ile 200 ml'ye tamamlanır.

Tris Tampon Tuzu

		<u>1L için Molarite</u>
Tris Base	30 g	50 mM
NaCl	80 g	137 mM

Kimyasallar distile su ile karıştırılır. pH 7.4'e ayarlanır.

Yıkama Solüsyonu (TBS-T)

Tween-20 solüsyonu için 1L TBS'e 1ml Tween-20 eklenir.

		<u>1L için son konsantrasyon</u>
Tris Base	30 g	50 mM
NaCl (FW 58.44)	80 g	137 mM
Tween-20 solüsyonu	1 ml	%0.2

Kimyasallar distile su ile karıştırılır. pH 7.4'e ayarlanır.

1X Yürütme Tamponu (Elektroforez çözeltisi)

		<u>1L için son konsantrasyon</u>
Distile su	900 ml	
10X BioRad running buffer	100 ml	1X

1X Transfer Tamponu (Elektroblot çözeltisi)

		<u>1L için son konsantrasyon</u>
10X Transfer Buffer	100 ml	
Metanol	200 ml	
Distile Su	700 ml	1X

Yürütme tamponu ve Transfer tamponu oda sıcaklığında saklanır.

Bloklama Solüsyonu

	<u>10 ml için son konsantrasyon</u>	
Yağsız süt tozu	0.5 g	%5
TBS-T	10 ml	1X

Süt tozu az miktarda TBS-T ile karıştırılır. Daha sonra TBS-T ile 100 ml'ye tamamlanır.

Coomassie Brilliant Blue Jel Çözeltisi (Jel Boyama Çözeltisi)

5 g Coomasie blue tartılarak 450 ml distile su içinde çözündürüldü. 450 ml metanol ve 100 ml glasiyal asetik asit ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

Sodyum azid (NaAz) çözeltisi

0.2 g sodyum azid 10 ml dH₂O içinde çözülür.

2X Laemmli Sample Buffer (LSB)

1,5 M Tris-Base pH : 8,8	12,5 ml
Gliserol	10 ml
%10 SDS	20 ml
Distile Su	7,5 ml
Toplam	50 ml

LSB Complete Buffer

2X LSB	1 ml
Proteaz inhibitörü (10X)	20 µl
Fosfataz inhibitörü (25X)	40 µl

LSB Complete buffer -20°C’de saklanır.

Primer Antikor Çözme Solusyonu:

		<u>10 ml için son konsantrasyon</u>
BSA	0,5 g	%5
1X TBS-T	10 ml	
NaAz	5 µl	%0.05

Primer antikorların sulandırılma oranları 1:1000

Primer antikor solusyonu	10 ml
Antikor	10 µl

Sekonder Antikor Çözme Solusyonu:

		<u>10 ml için son konsantrasyon</u>
Yağsız süt tozu	1 g	%5
1X TBS-T	20 ml	1X

Sekonder antikorların sulandırma oranları 1:2000

Sekonder antikor solusyonu	20 ml
Antikor	10 µl

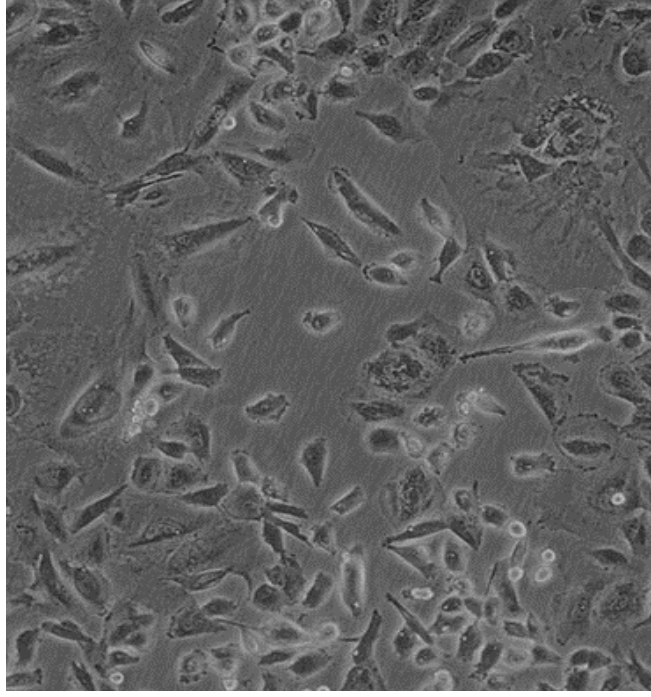
3.6. Yöntemler

3.6.1. Hücre Kültürü

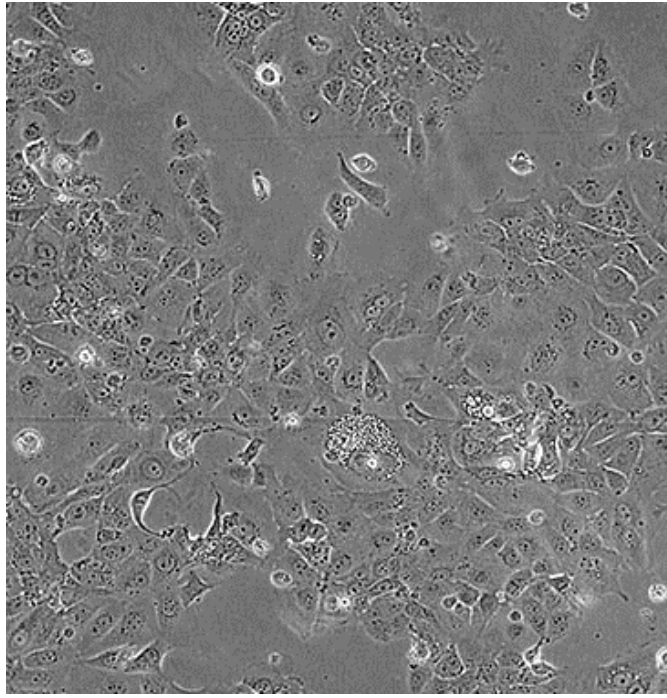
Çalışmamızda kullanılan tüm hücreler H1975 (Resim 1), HCC827 (Resim 2), PC9 (Resim 3), HCC827 GR5 (Resim 4) hücreleri Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan National Institutes of Health bünyesindeki National Cancer Institute'da Phillip Dennis'in laboratuvarından temin edilmiştir. HCC827 ve HCC827 GR5 hücrelerinde (E746-A750) delesyonu, PC9 hücrelerinde ekzon 19 delesyonu, vardır. HCC827 GR5 hücrelerinde bu mutasyona ek olarak MET amplifikasyonu da vardır. H1975 hücrelerinde ise hem L858R hem de T790M mutasyonu bulunmaktadır. Bununla birlikte bu hücrelerde çeşitli genlerde ek mutasyonlar da belirlenmiştir (Tablo 1). Tüm hücreler %5 ya da %10 FBS, 100U/ml penisilin ve 100mg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

Tablo 1. Çalışmamızda kullanılan hücre hatlarının mutasyonları

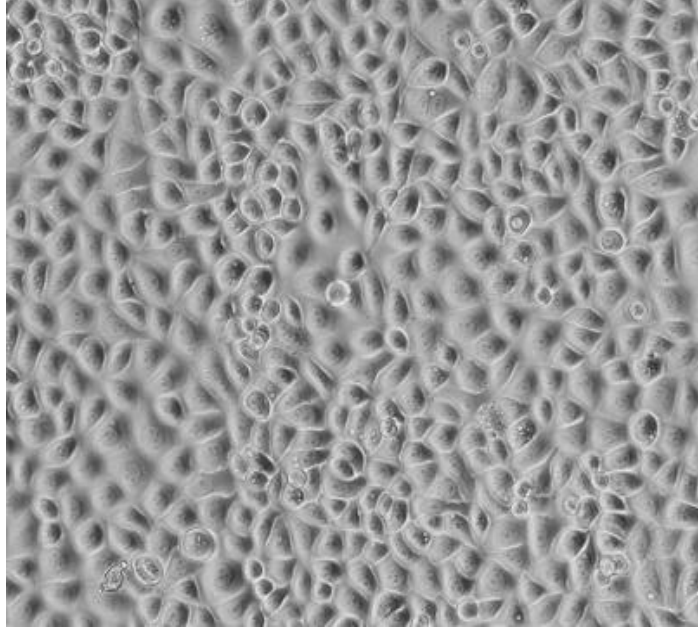
Hücre hattı	EGFR	p53	p16	PI3K
H1975	mut (L858R, T790M)	mut	mut	mut
PC9	mut (del in exon 19)	mut		
HCC827	mut (del E746-A750)			
HCC827-GR5	mut (del E746-A750)			



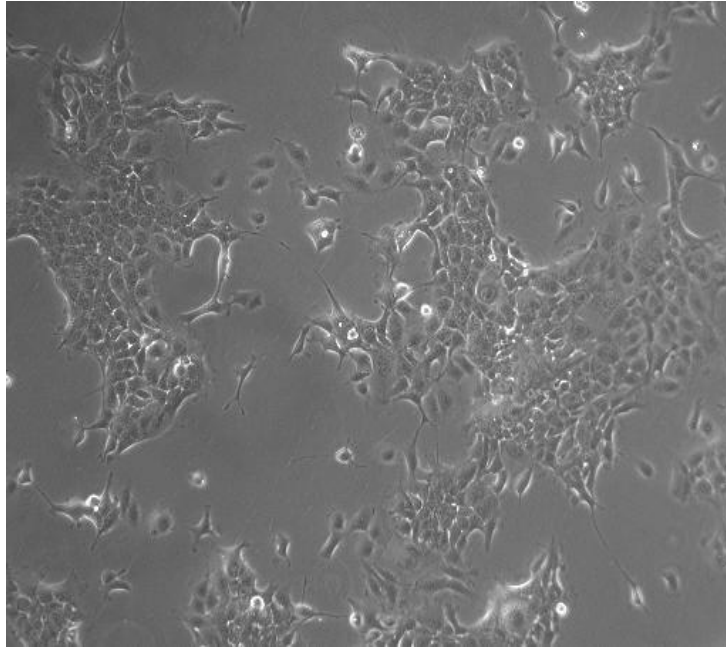
Resim 1. H1975 hücre hattı (20X)



Resim 2. HCC827 hücre hattı (20X)



Resim 3. PC9 hücre hattı (20X)



Resim 4. HCC827 GR5 hücre hattı (20X)

3.6.2. SRB Sitotoksosite Deneyi

Bu yöntem negatif yüklü bir boya olan sülforodaminin (SRB) hücre içine girmesine dayanır. Ne kadar çok canlı hücre bu boyayı alırsa, fiksasyon işleminden sonra o kadar çok boya açığa çıkıp çözünecek ve absorbans değeri yüksek olacaktır.

1. 96 kuyucuklu platelere ekilen hücreler çeşitli zaman ve konsantrasyonlarda inhibitörlerle muamele edildikten sonra aşağıdaki protokol uygulandı.
2. Hücreleri fixe etmek için 50 uL %10 trikloroasetik asit (TCA) eklenerek plate'ler 1 saat 4°C'de inkübe edildi.
3. Kuyucuklar fixatifin uzaklaşması için 5 kez distile su ile yıkandı ve kuruması için oda sıcaklığında 3 saat beklendi.
4. Kuyucuklara 100 uL sülforodamin (SRB) boyası eklendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.
5. Kuyucuklar 5 kez %1 asetik asit ile yıkandı ve kuruması için oda sıcaklığında 3 saat beklendi.
6. Kuyucuklara 200 uL 10 mM Tris buffer eklendi ve boyanın çözülmesi için 15 dakika çalkalayıcıda sallandı.
7. 570 nm dalga boyunda plate okuyucuda absorbans değerleri okunup, kaydedildi.

3.6.3. Hücrelerden Total Protein İzolasyonu

1. Aynı pasaj numarasına sahip H1975, PC9, HCC827, HCC827GR5 hücreleri, hücre kültür flasklarının %70'ini kapladığında besiyeri uzaklaştırıldı. 1ml %0.5 Tripsin-EDTA karışımı ile hücrelerin yapışık olduğu tabandan uzaklaştırıldı. %5 FBS' li DMEM' le muamele edilip 1000 rpm' de 5-10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant dökülerek hücreleri içeren pelet, hücre sayım cihazıyla sayıldı.

Uygulanan inhibitörlerin etkisine araştırmak amacıyla hücreler iki-üç tekrarlı olarak belirlenen saatlerde her bir hücre hattı için 5×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu platelere ekildi.

2. Platerler 1 gün 37°C 'de inkübe edildikten sonra besiyerleri tamamen çekilerek her hücre hattına çeşitli dozlarda inhibitörler verilerek ve DMSO'lu besiyerlerinde inkübasyona bırakıldı.
3. Inkübasyon süresi bittiğinde DMSO ve flavopiridol uygulanan hücrelerin besiyerleri döküldü.
4. Yaklaşık 1 ml PBS ile yıkandıktan sonra complete-LSB solusyonundan $150 \mu\text{L}$ eklendi.
5. LSB solusyonu ve kazıyıcıyla hücreler patlatılıp proteinler elde edildi.
6. Elde edilen protein solusyonu $1,5 \text{ ml}$ 'lik santrifüj tüplerine toplandı.
7. Protein solusyonları sonikatörle muamele edilerek hücrelerin mekanik parçalanması ve homojenizasyonu sağlandı.
8. Elde edilen proteinlerin yapısının bozulmaması için -20°C 'de saklandı.

3.6.4. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini için BCA protein miktar tayin kiti kullanıldı.

1. BCA çalışma solusyonu reagent A:B = 50:1 oranında, örnek sayısına bağlı olarak hazırlandı.
2. 96 kuyucuklu plağa her bir örnek iki tekrarlı olacak şekilde $5 \mu\text{L}$ eklendi.
3. Hazırlanan BCA çalışma solusyonu çok kanallı pipetle her kuyucuğa $95 \mu\text{L}$ eklendi.
4. Plak 37°C etüvde 30 dk inkübe edildi.
5. Proteinlerin spektrofotometrede, 562 nm 'da absorbanans değerleri okundu.

6. Absorbans değerleri okunan örneklerin protein miktarları, standart grafik üzerinden belirlendi.

3.6.5. Western Blot Protein Tayini

SOX2, OCT4, NANOG, c-NOTCH, HES1, AKT, p-AKT, p-S6, EGFR, p-EGFR, mt-EGFR, p-STAT3, p-FOXO1/3, IGFR, p-IGFR, IGFBP3, TUBULIN, GAPDH genlerinin protein ekspresyonları Western blot yöntemiyle belirlenmiştir.

Western blot, bir hücre özütünde ya da protein solusyonunda, spesifik bir proteinin saptanmasında, varsa miktar tayininde kullanılan yarı-ölçülebilir yöntemdir.

1. Protein Örneklerinin Hazırlanması: Protein tayini yapılan protein örnekleri 1,5 µl ependorf tüplere eşit protein konsantrasyonunda konup, eşit miktarda olması için de 2X LSB tamponuyla tamamlandı. Eşit miktarda yükleme tamponu olan yükleme tamponu eklendikten sonra 95°C 'de kuru ısıtıcı blokta 5 dk bekletilerek yüklenmeye hazır hale getirildi.
2. SDS Poliakrilamid Jelin Hazırlanması ve Yürütülmesi: Jel, sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle hazırlandı ve örnekler bu jel üzerinde yürütüldü. Proteinler, yüklerine göre değil moleküler ağırlıklarına göre dikey elektroforezde ayrılır. Bu nedenle daha yüksek yüzdeli jel hazırlanarak daha küçük moleküler ağırlıktaki proteinler daha düşük yüzdeli jel hazırlanarak da daha büyük moleküllerin tayini yapıldı. 1x yürüme tamponu da eklenerek proteinlerin yürümesi sağlandı. Elektroforez 100V, 250mA'de yaklaşık 3 saat yapılır.

3. Jelin Membrana Aktarılması: Dikey elektroforez işlemiyle proteinler ayrıldıktan sonra jeldeki proteinler nitrozelüloz membrana aktarıldı. Bunun için ıslak emdirim uygulandı. Aktarım 250mA, 100V 'da yaklaşık 90dk'da yapılır.
4. Membran, aranan proteine özgü birincil ve ikincil antikorda inkübe edilerek, antijen-antikor bağlantısı gerçekleşmesi: Transfer sonrası membran Ponceu ile boyandıktan ve bloklama solusyonuyla muamele edildikten sonra BSA'da hazırlanan primer antikorlarda bir gece +4°C 'de inkübasyona bırakıldı. Birincil antikordan alınan membranlar enzim konjuge ikincil antikorla 2 saat boyunca inkübe edildi (bütün proteinler için anti-rabbit).
5. Antikorla inkübasyon sonrası membranlar ECL çözeltisi ile muamele edildi ve görüntüleme sisteminde protein ekspresyonu gözlemlendi.

3.6.6. İmmunohistokimyasal Boyama

Mutant EGFR ifade eden CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerden alınan doku örnekleri SOX2 ekspresyonunu belirlemek için streptavidin-biyotin üçlü indirekt immün peroksidaz yöntemi kullanılarak boyama yapılmıştır.

Çalışmada SOX2 (Cell Signaling, ABD) antikor kullanılmıştır. Biotinlenmiş, bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biyotin kompleksi ve kromojen olarak kullanılan 3-3'diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB) ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklindedir.

Doku mikroyarray aleti ile hazırlanan bloklar ve diğer bloklardan elde edilen kesitler SOX2 antikor ile aşağıdaki prosedüre göre boyanmıştır:

1. Polilizinli lam üzerine alınan 4 mikronluk kesitler 37°C'de etüvde gece boyunca deparafinize edilmiştir.
2. Kesitler ksilolde 30 dakika bekletilmiştir.
3. Fiksasyon için %96'lık alkolde 15 dakika tutulmuştur.
4. Kesitler çeşme suyuyla, ardından distile su ile yıkanmıştır.
5. Antijen retrivel işleminde, kesitler SOX2 antikoru ile boyama için Tris-EDTA buffer (pH 9.0) içinde sırasıyla 90°C'de 10 dakika ve 85°C'de 5 dakika mikrodalgada bekletilmiştir.
6. Kesitler 20 dakika soğumaya bırakılmıştır.
7. Kesitler önce su, sonra PBS ile yıkanmıştır.
8. Örnekler hidrojen peroksidad 5 dakika bekletilmiştir.
9. Kesitler PBS ile yıkanmıştır.
10. Primer antikor olan SOX2 üreticinin önerdiği dilüsyonlarda hazırlanıp, lam üzerindeki doku kesitlerini kapatacak şekilde damlatılmıştır.
11. 16 saat +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır.
12. Kesitler PBS ile yıkanmıştır.
13. Bağlayıcı (sekonder) antikor ile oda sıcaklığında 15 dakika süre ile inkübasyon yapılmıştır.
14. Kesitler PBS ile yıkanmıştır.
15. Streptavidin-biyotin kompleksi uygulanarak 15 dakika bekletilmiştir.
16. Kesitler PBS ile yıkanmıştır.
17. Renk vererek görüntülemeyi sağlamak için DAB kromojen ile belirli bir süre ile inkübasyonu yapılmıştır.
18. Kesitler distile su ile yıkanmıştır.
19. 20 saniye hematoksilin ile zemin boyası yapılmış ve musluk suyunda yıkanmıştır.
20. Dehidratasyon için kesitler sırasıyla %90, %95 ve %100'lük alkollerde 5'er dakika tutulmuş, ksilolde şeffaflaştırılmıştır.
21. Doku kesitleri Dako mounting media ile kapatılmıştır

3.6.7. Plazmit DNA oğaltılması

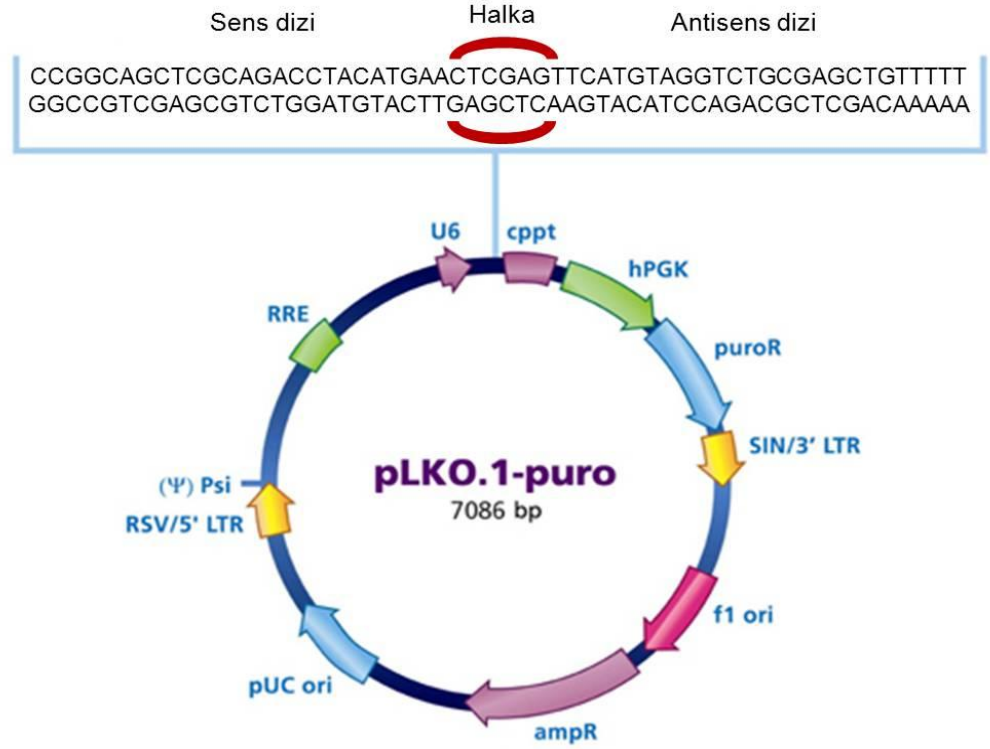
Hazır alınan plazmitlerin hücrelere uygulamadan önce çoğaltılması gereklidir. Bu nedenle plazmitleri bakteriye aktarıp, plazmiti taşıyan bakteriyi seçip, plazmit DNA'sını izole ettik.

Bunun için öncelikle plazmitin alıcı hücreye transformasyonunu yaptık.

1. 25 uL DHsα alıcı hücreleri üzerine 2 uL istenen plazmit eklenir.
2. 30 dakika buzun üzerinde beklenir.
3. Hücreleri ve plazmiti içeren tüp 1 dakika 42°C'de bekletilir
4. Ampisilin ve kanamisin içeren LB agar üzerine bu hücreler yayılır.
5. 37°C'de bir gece bekletilir.
6. LB agardan 1 koloni seçilir.
7. Koloni 100 mL LB Broth içine bırakılır.
8. LB Broth 1 gece 37°C'de çalkalanır.
9. Ertesi gün plazmit DNA izolasyonu yapılır.
10. Elde edilen DNA miktarı Nanodrop ile ölçülür.

3.6.8. Plazmit DNA izolasyonu

1. LB Broth içinde üretilmiş bakteriler 6000g'de 15 dakika santrifüj edilir.
2. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılır.
3. Peletin üzerine Qiagen kit içinde bulunan 4 mL Buffer P1 eklenir, yeni tüpe transfer edilir.
4. Bu karışım üzerine 4 mL Buffer P2 eklenir ve 4-6 kez alt üst edilir. Oda sıcaklığında 5 dakika beklenir.
5. 4 mL Buffer P3 eklenir ve 4-6 kez alt üst edilir. Buzda 15 dakika bekletilir.
6. 16000g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapılır.
7. Süpernatant alınıp, qiagen tip üzerine dökülür ve sıvının akması beklenir.
8. Qiagen tip 2 kez Buffer QC ile yıkanır.
9. Filtrede takılan DNA Buffer QF uygulanarak yeni tüpe alınır.
10. DNA üzerine 3 mL izopropanol eklenir.
11. 15000g'de 4°C'de 30 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
12. DNA peleti 2 mL %70 ethanolle yıkanır.
13. 15000g'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır.
14. Pellet halindeki DNA TE buffer ya da elution buffer içinde çözülür.



Şekil 10. Çalışmamızda kullandığımız shSOX2 plazmiti

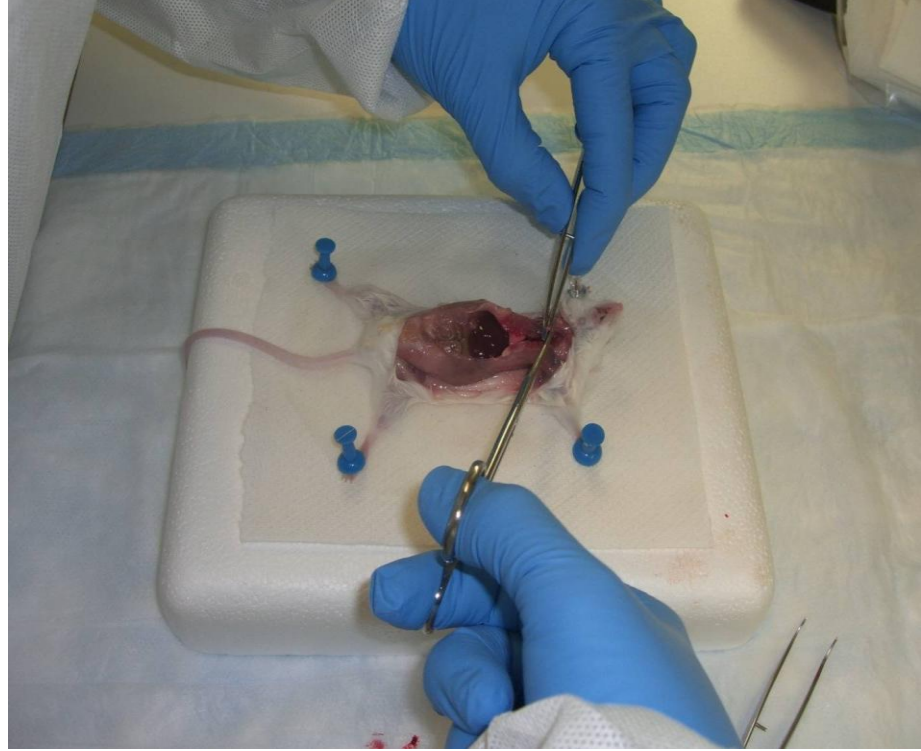
3.6.9. shRNA Üretimi İçin Lentivirüs Protokolü

1. 293FT hücreleri 1 hafta %10 DMEM besiyeri içinde üretilir.
2. 1×10^6 /25 cm² flask/3 ml besiyeri olacak şekilde hücreler ekilir.
3. Yaklaşık 16 saat sonra paketleyici, zarf ve hedeflenen shRNA'yı içeren plazmitler (Şekil 10) 100ul optimem ve 6ul lipofektamin ile hücrelerin üzerine eklenir.
4. 12 saat sonra hücrelerin besiyeri yeni besiyeri ile değiştirilir.
5. 24 saat sonra flasklardaki besiyeri alınıp, -80°C'de saklanır.
6. Lentivirüsle enfekte edilecek hücreler 1×10^5 /6 kuyucuklu plate olacak şekilde ekilir.
7. Ertesi gün ilk kuyucuğa 100ul virüs eklenir. Virüs eklenen kuyucuktan 200 ul alınıp, ikinci kuyucuğa, ikinci kuyucuktan 200 ul alınıp üçüncü kuyucuğa 200 ul aktarılır. Bu seyreltme işlemi son

- kuyucuğa kadar devam eder. Son kuyucuk negatif kontrol olduğundan virüs aktarılmaz.
8. Ertesi gün tüm kuyucuklardaki besiyeri 2 mg/ml puromisinli besiyeri ile değiştirilir.
 9. Virüsü alan hücreler puromisinli besiyerlerinde canlı kalırken, almayanlar ölür.
 10. Canlı hücreler üretilerek hedeflenen geni baskılanan hatlar yapılmış olur.

3.7. Deney Hayvanı Çalışmaları

Tüm hayvan çalışmaları Ulusal Kanseri Enstitüsü'nün Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi'nin kurallarına uygun olarak yapılmıştır. CC10-EGFR^{L858R/T790M} transgenik fareler William Pao'dan alınmıştır. Çalışmamızda 6 haftalık CC10-EGFR^{L858R/T790M} transgenik fareler her grupta 3 fare olacak şekilde 4 gruba bölündü. İlk grup 3 hafta boyunca doksosiklin içeren besin alırken, ikinci grup almadı. Üçüncü grup 9 hafta boyunca doksosiklin alırken dördüncü grup almadı. İlk iki grup 3 hafta sonunda, son iki grup 9 hafta sonunda sakrifiye edildi. Sakrifikasyonun ardından farelerin akciğerleri ve karaciğerleri steril bir şekilde çıkartıldı (Resim 5). Bir kısmı protein analizi için sıvı azotta dondurulurken, diğer kısmı formalin içine alındı. Formalinde saklanan doku parçaları 24 saat sonra immunohistokimya merkezine gönderildi. Bu merkezde dokular parafin içine gömülüp, enine kesitler alındı.



Resim 5. Çalışmamızda kullanılan CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerin sakrifiye edilmesinin ardından akciğerin çıkarılışı

Xenograft çalışması için 6 haftalık bağışıklık sistemi zayıflatılmış farelere sağ ve sol tarafa subkutan olarak omuz ve sırt bölgelerinden çeşitli sayılarda 200ul matrijel içinde hücre enjeksiyonu yapıldı. Sağ taraftaki enjeksiyonlar scr hücreler içerirken, sol tarafa aynı sayıda knockout edilmiş geni taşıyan hücreler enjekte edildi. Farede oluşan tümörler hergün kontrol edildi ve gözle ölçüm yapıldı. Tümörler farenin yaşamını engeller büyüklüğe geldiğinde (yaklaşık 2,25 cm) fareler sakrifiye edildi. Oluşan tümörler çıkartılıp, sıvı azotta donduruldu ya da formalin içine alındı.

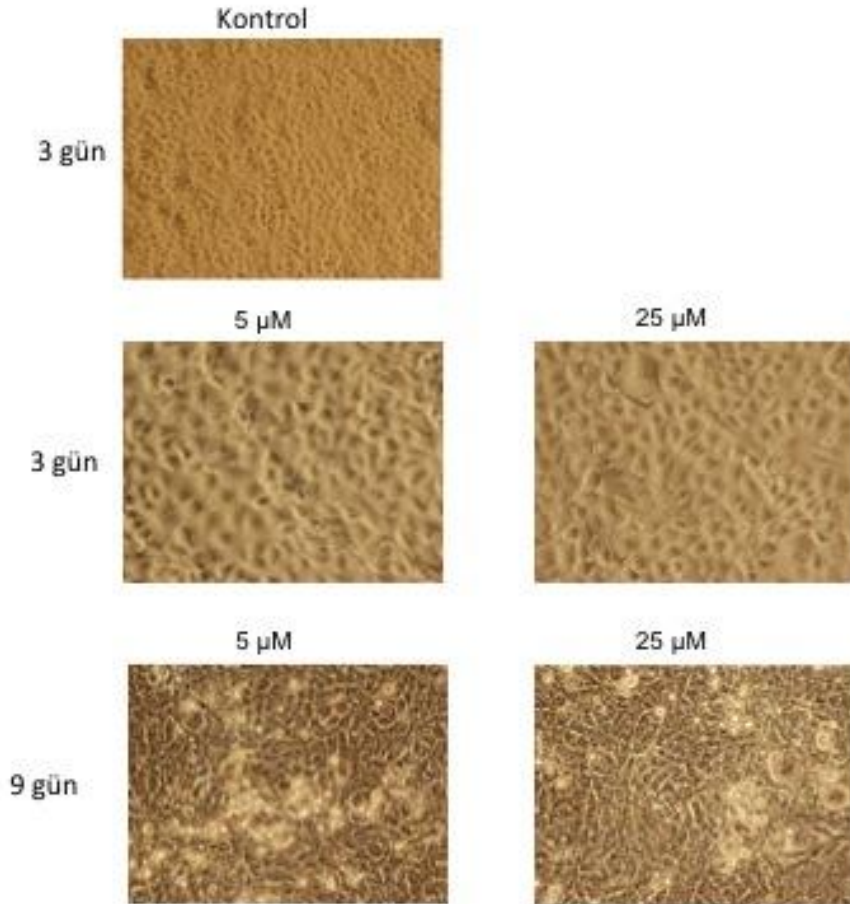
3. 8. İstatiksel Analiz Yöntemleri

Hücre canlılığı ve ilaç yanıtı deneylerindeki değişimler “tek yönlü Anova” testiyle karşılaştırıldı. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

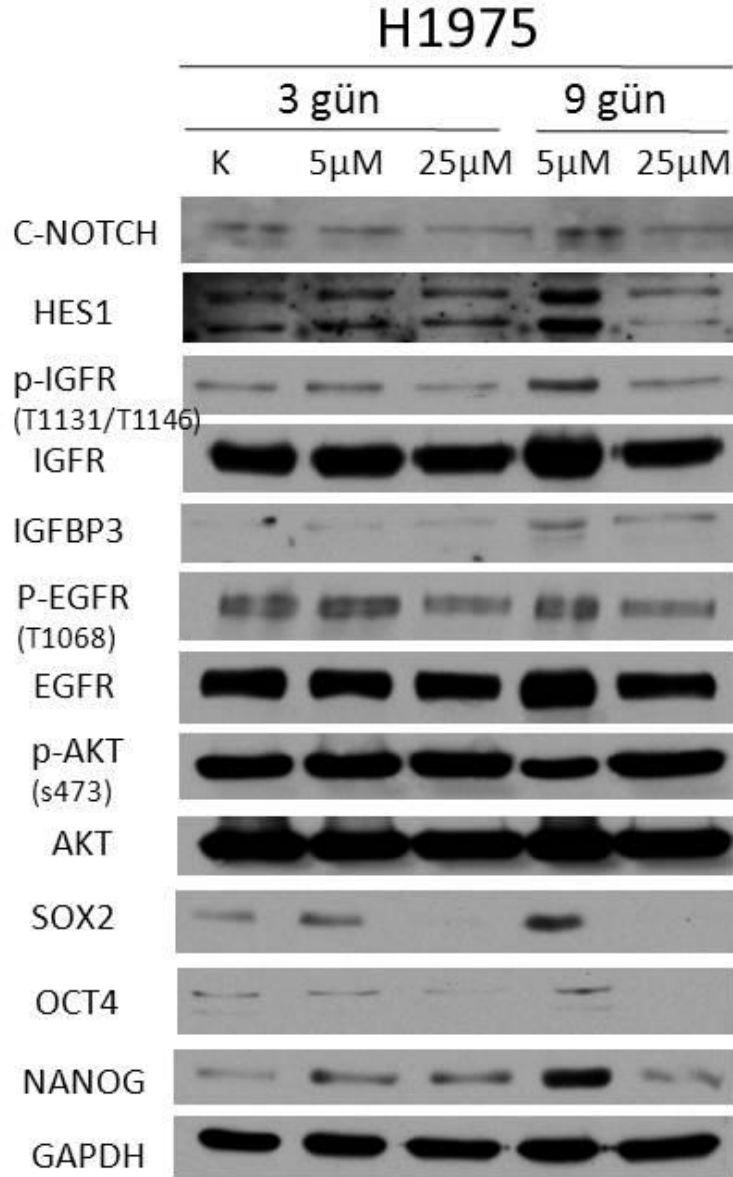
4.1. EGFR Mutant KHDAK Hücrelerinin Erlotinib Yanıtı

Çalışmamızda EGFR tirozin kinaz inhibitörü (TKI) olan erlotinibi çeşitli konsantrasyonlarda 3 ve 9 gün boyunca, her 3 günde bir ilaçlı besiyerini değiştirecek şekilde EGFR geninde çeşitli mutasyonlara sahip küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri üzerine uyguladık. H1975 hücreleri TKI'ne karşı hem L858R duyarlı mutasyona hem de T790M direnç mutasyonuna sahip oldukları için IC50 oranları daha yüksektir. Bu nedenle H1975 hücrelerini %10 FBS içeren RPMI içinde 3 gün ve 9 gün 5 μ M ve 25 μ M erlotinib ile muamele ettik (Şekil 11).



Şekil 11. H1975 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra 20X mikroskop görüntüleri

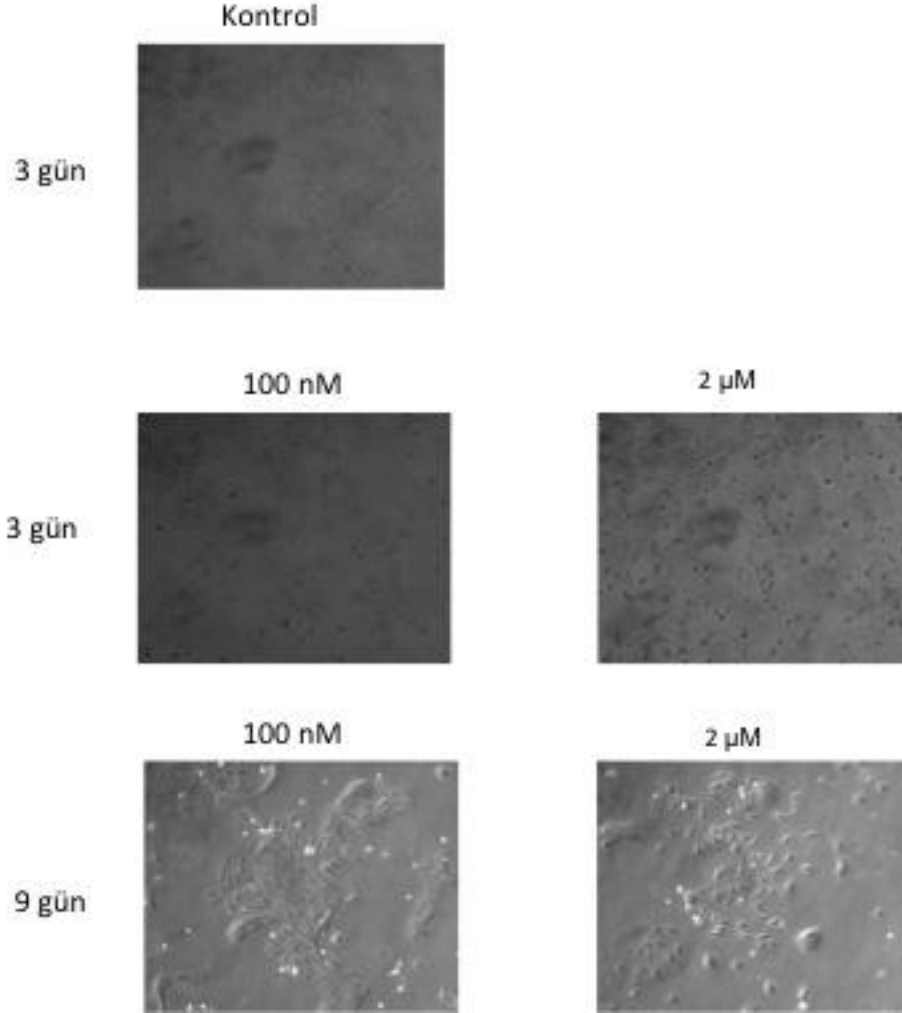
Uygulama sonrasında hücre kazıyıcılar yardımıyla hücreleri flasklardan kaldırıp, protein izolasyonu yaptık. Western blot yöntemiyle C-NOTCH, HES1, p-IGF1R, IGFR, IGFBP3, EGFR, p-EGFR, P-AKT, AKT, SOX2, NANOG ve GAPDH proteinlerini görüntüledik. Şekilde görüldüğü gibi 9. gün 5 μ M erlotinib konsantrasyonunda C-NOTCH ve HES1 ifadesi kontrole göre artmıştır. Yine aynı konsantrasyonda p-IGF1R aktivitesi IGFBP3 aktivitesi ile birlikte artmıştır. EGFR düzeyi erlotinib uygulanan gruplarda değişmezken, p-EGFR düzeyi ancak 25 μ M`da kontrole göre azalmıştır. AKT ve p-AKT düzeyi tüm gruplarda yaklaşık aynı düzeydedir. Öte yandan SOX2 düzeyi 3 ve 9 günde 5 μ M erlotinib uygulanan gruplarda artarken, 25 μ M erlotinib uygulanan gruplarda kontrole göre azalmıştır. OCT4 düzeyi ise sadece 9 gün 25 μ M uygulanan grupta artarken, NANOG kontrole göre uygulama yapılan tüm gruplarda artmıştır (Şekil 12).



Şekil 12. H1975 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra bazı protein ifadelerindeki değişimler

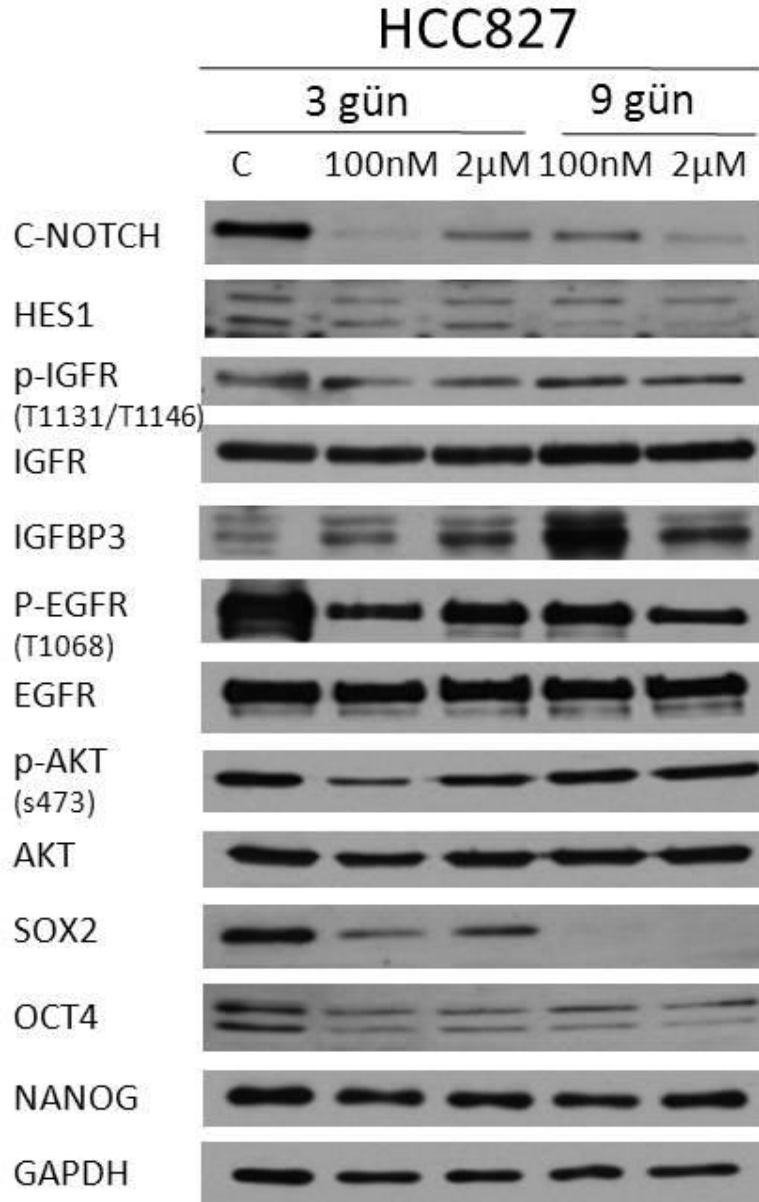
HCC827 hücrelerinde EGFR geninde delE746-A750 mutasyonu olduğundan bu hücreler TKI'ne duyarlıdır. Bu nedenle uygulanan erlotinib konsantrasyonu H1975 hücrelerinde olduğu kadar fazla uygulanmamıştır (Şekil 13). HCC827 hücrelerinden %10 FBS içeren

RPMI içinde 3 ve 9 gün süresince 100 nM ve 2 µM erlotinib uygulamasının ardından protein izolasyonu yapıldı.



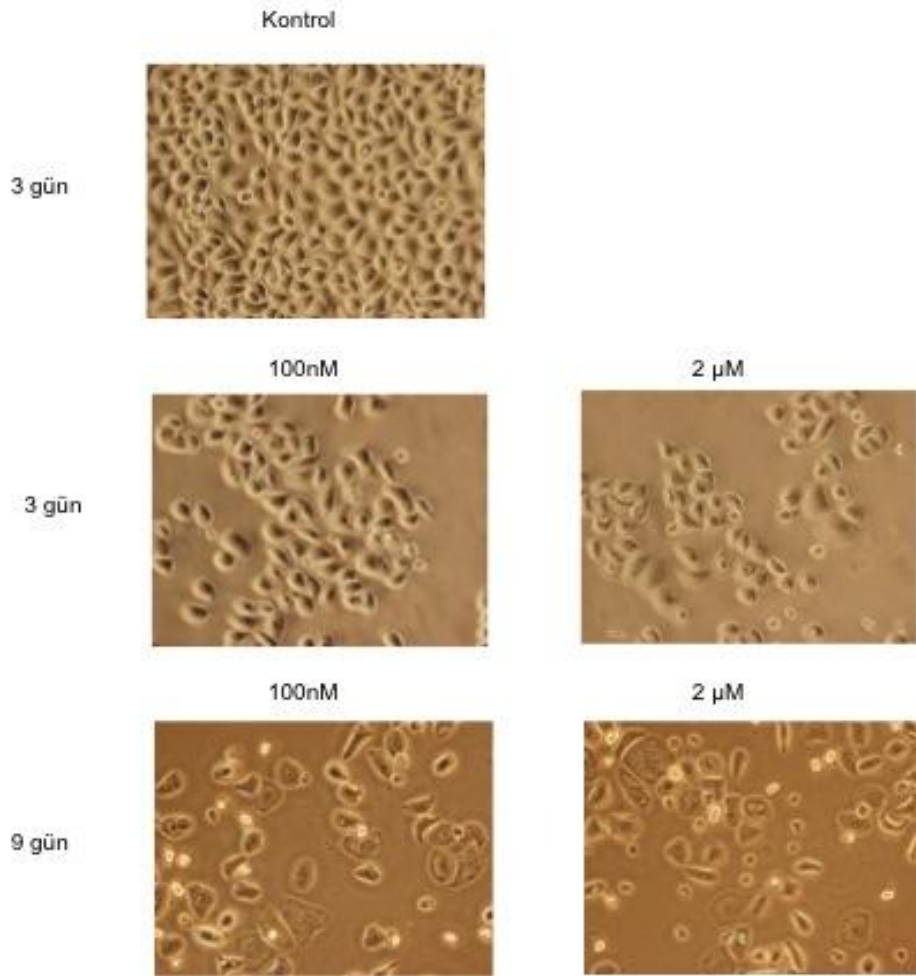
Şekil 13. HCC827 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra 20X mikroskop görüntüleri

Western blot yöntemi ile çeşitli genlerin ifade düzeyleri incelendi. Buna göre c-NOTCH ve HES1 ifadesi uygulama yapılan gruplarda kontrol grubuna göre azalırken, p-IGF1R düzeyleri değişmemiştir. IGFBP3 düzeyi kontrol grubuna göre artmıştır. p-EGFR erlotinib uygulanan gruplarda azalmıştır. P-AKT ise ilk 3 gün azalmış, 9. günde tekrar artmıştır. NANOG ifadesi değişmezken, SOX2 ve OCT4 düzeyi azalmıştır (Şekil 14).



Şekil 14. HCC827 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra bazı protein ifadelerindeki değişimler

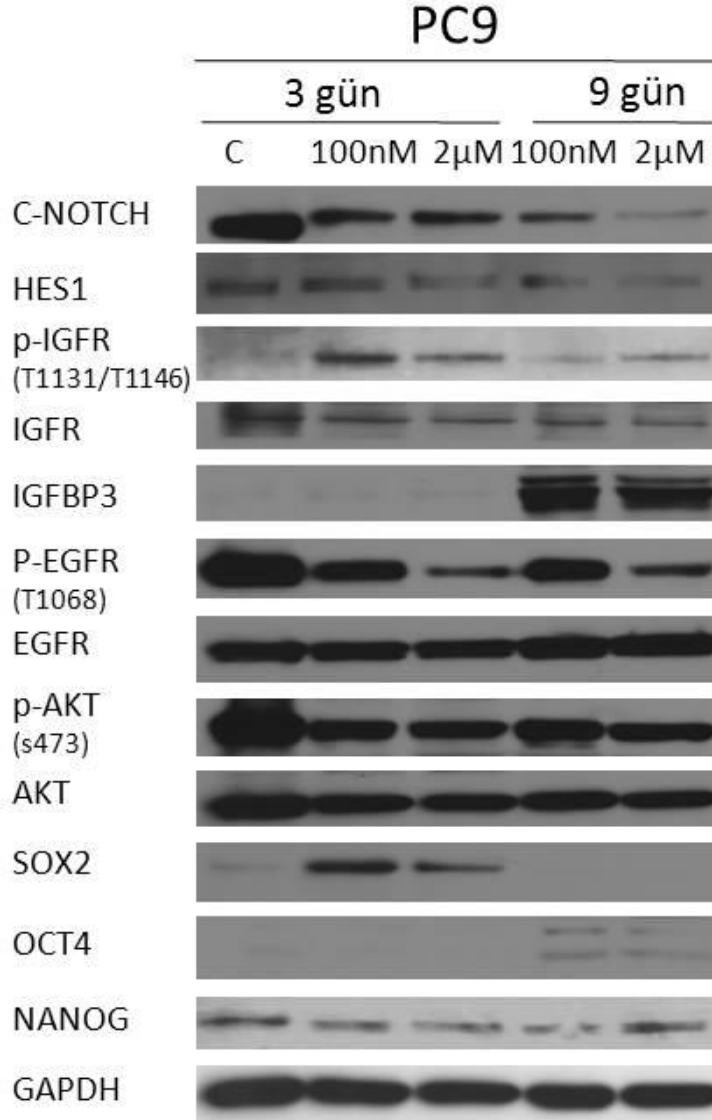
PC9 küçük hücreli dışı akciğer kanser hücrelerinin EGFR geninde DelE746A750 mutasyonu olduğundan bu hücreler TKI'ne duyarlıdır. HCC827 hücrelerinde olduğu gibi bu hücrelerde de erlotinib konsantrasyonları %10 FBS içeren RPMI içinde 3 ve 9 gün süresince 100 nM ve 2 µM olarak uygulandı (Şekil 15).



Şekil 15. PC9 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra 40X mikroskop görüntüleri

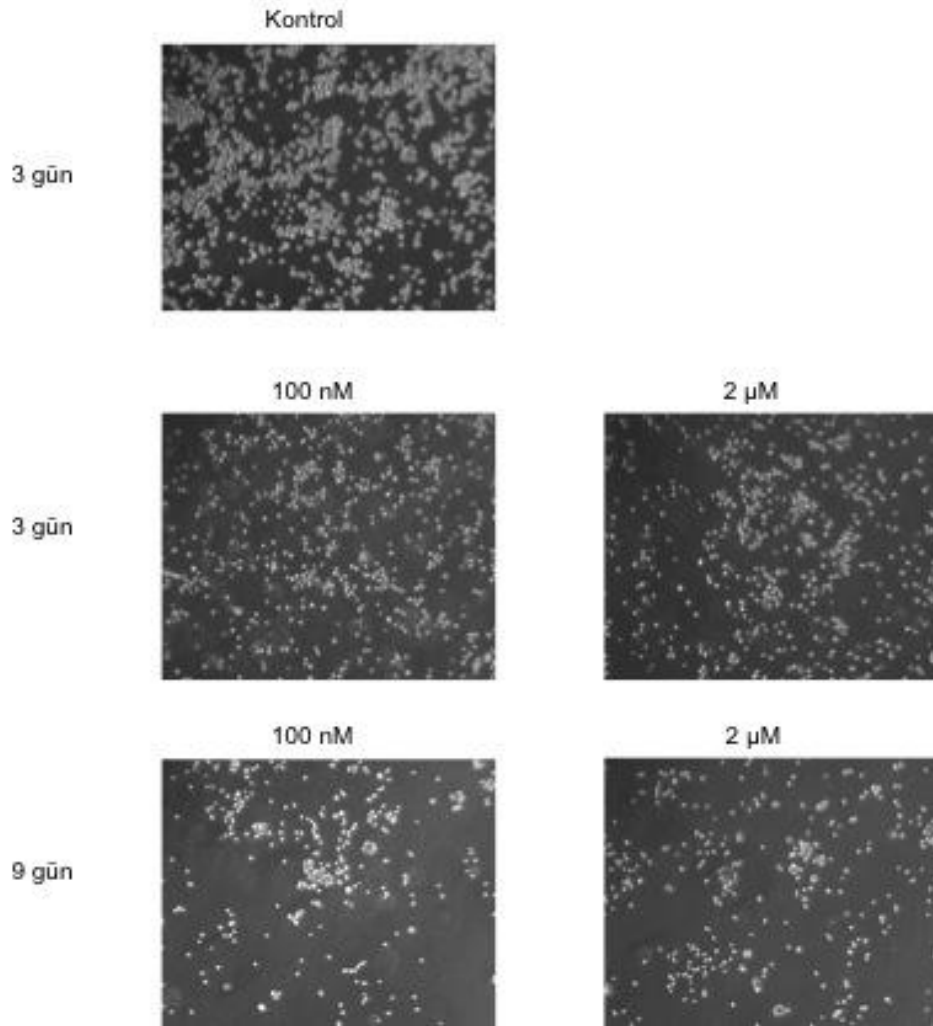
C-NOTCH ifadesi tüm uygulama yapılan gruplarda azalırken, HES1 ifadesi 3. gün 2 μ M, 9. gün 100 nM ve 2 μ M'da azalmıştır. p-IGF1R aktivasyonu uygulama yapılan gruplarda kontrol grubuna göre artmıştır. Öte yandan IGFBP3 düzeyi sadece 9. günde görülmektedir. EGFR düzeyleri eşitken, p-EGFR erlotinib uygulanan gruplarda azalmıştır. Aynı şekilde AKT ifadesi tüm gruplarda aynı iken, p-AKT erlotinib uygulanan gruplarda azalmıştır. SOX2 kontrole göre erlotinib uygulamasında yalnızca 3. gün artarken, 9. gün de ifadesi gözlenmemiştir. Bunun aksine OCT4'ün ifadesi 3. gün yokken, 9. gün de

erlotinib uygulamasının ardından ortaya çıkmıştır. NANOG düzeyleri tüm gruplarda genellikle aynıdır (Şekil 16).



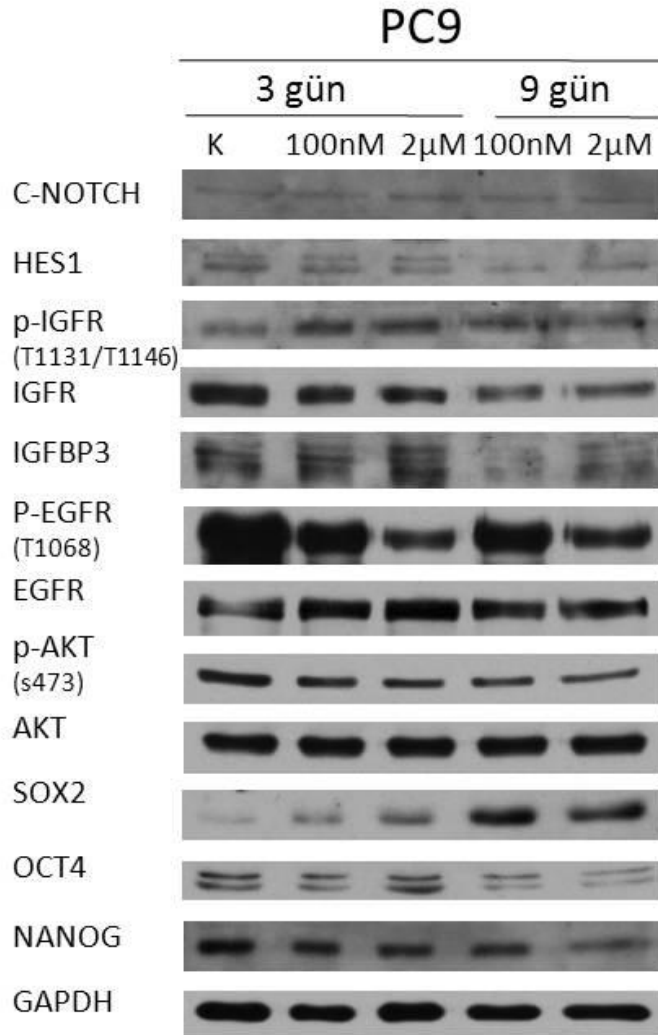
Şekil 16. PC9 hücreleri çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra bazı protein ifadelerindeki değişimler

PC9 hücreleri kök hücre besiyerinde çoğaltılıp, 3 ve 9 gün 100 nM ve 2 µM erlotinib uygulaması yapıldığında sonuçlar %10 RPMI içeren besiyerinde yapılan deneyden farklılık göstermektedir. Hücreler yapışkan yüzeyi olmayan flasklarda çoğaltıldıkları için yüzer görünüm almıştır (Şekil 17).



Şekil 17. PC9 hücreleri kök hücre besiyerinde çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra mikroskop görüntüleri (20X)

C-NOTCH düzeyi tüm gruplarda aynı iken, HES1 9. günde azalmaktadır. p-IGF1R erlotinib uygulanan gruplarda kontrole göre artmıştır. Bununla birlikte IGFBP3 9 günde azalmıştır. p-EGFR aktivitesi 3 ve 9. gün kontrole göre azalmış hatta erlotinib konsantrasyonu arttıkça aktivitede daha büyük bir düşüş gözlenmiştir. AKT düzeyi aynı kalırken, p-AKT aktivitesi erlotinib uygulanan gruplarda azalmıştır. SOX2 ifadesi 3 ve 9. günde kontrole göre erlotinib uygulanan gruplarda artmıştır. OCT4 ise erlotinib uygulaması ile değişmemiş ya da azalmıştır. NANOG düzeyi kontrol grubuna göre uygulama yapılan gruplarda azalmıştır (Şekil 18).

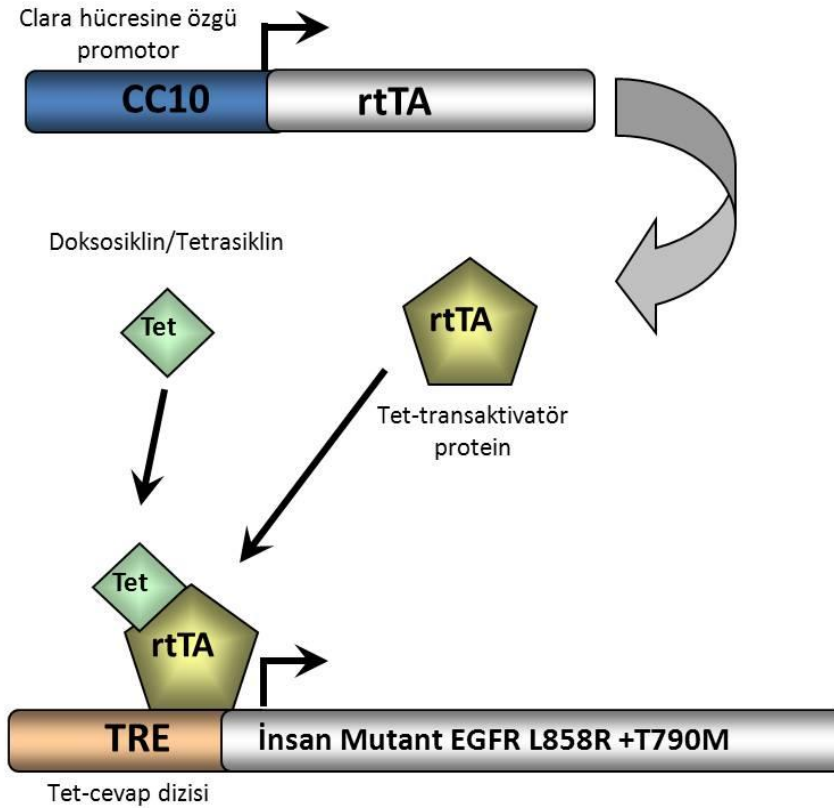


Şekil 18. PC9 hücreleri kök hücre besiyerinde çeşitli süre ve konsantrasyonlarda erlotinib ile inkübe edildikten sonra bazı protein ifadelerindeki değişimler

İn vitro çalışmalarımızın sonucunda uzun süre ilaç uygulanan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinin erlotinibe karşı moleküler düzeyde farklı cevaplar verdiği görüldü.

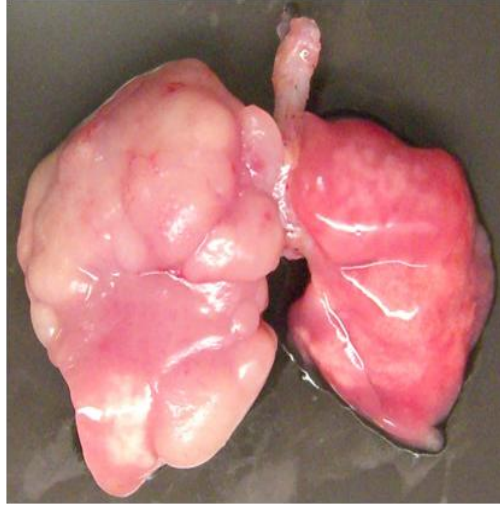
4.2. CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerde EGFR sinyallesmesi ile artan SOX2 ifadesi

İn vivo deneyler mutant EGFR genine sahip fare modelinde gerçekleştirildi. Bu modelde fare genomunun bir bölgesinde CC10 promotoruna bağlı rtTA geni bulunurken, başka bir bölgede tet cevap dizisine bağlı insan mutant EGFR geni bulunmaktadır. Mutant EGFR’de hem L858R hem de T790M mutasyonu vardır. Bu indüklenebilen sistemde fareye tetrasiklin ya da doksosiklin içeren yem verildiğinde hücreye giren doksosiklin sadece CC10’in ifade edildiği hücrelerde ifade edilen rtTA proteinine bağlanacaktır. Aktifleşen rtTA proteini tet cevap dizisine bağlanacak ve mutant EGFR’nin ifadesini sağlayacaktır (Şekil 19).



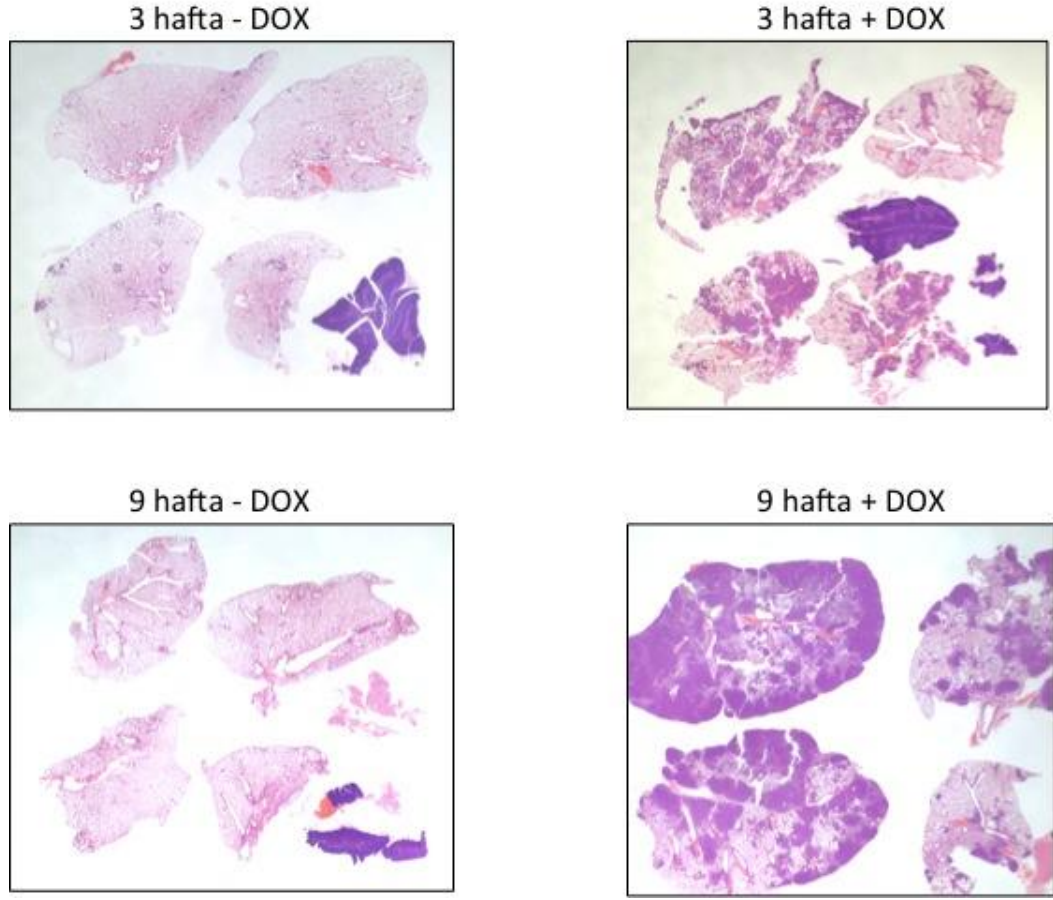
Şekil 19. CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerde mutant EGFR sinyal yolağının indüklenmesi

Mutant EGFR transgenini içeren fareler 6 haftalık olduktan sonra 3 hafta ve 9 hafta süreyle DOX içeren yemle beslendiler. 3 ve 6 hafta sonunda servikal dislokasyonla sakrifiye edildiler. Sakrifikasyonun ardından hızlı bir şekilde akciğerleri çıkartılıp çeşitli proteinlerin analizi yapılmak üzere uygun koşullarda saklandı.



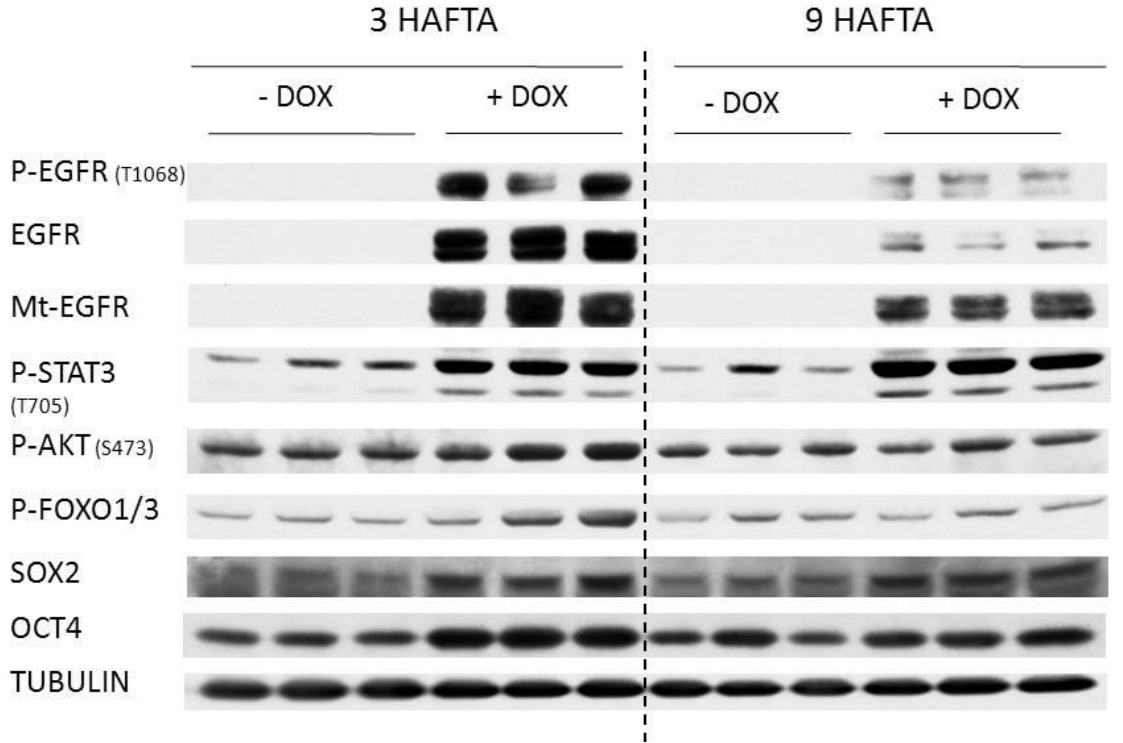
Resim 6. Mutant EGFR sinyal yolağı aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğeri

Farelerden alınan akciğerlerde heterojen tümör oluşumları gözlemlendi (Resim 6). Özellikle 9 hafta doksosiklin uygulanan farelerin akciğerlerinde 3 hafta uygulananlara göre çok daha fazla ve büyük tümör oluşumu gözlemlendi. Resim 7’de parafine gömülmüş akciğer kesitlerinin hemotoksilin eozin (H&E) boyaması görülmektedir. Kesitlerdeki koyu alanların yoğunluğundan 9 hafta dox alan farelerin 3 hafta alanlara göre daha büyük adenokarsinomlarının olduğu anlaşılmaktadır.



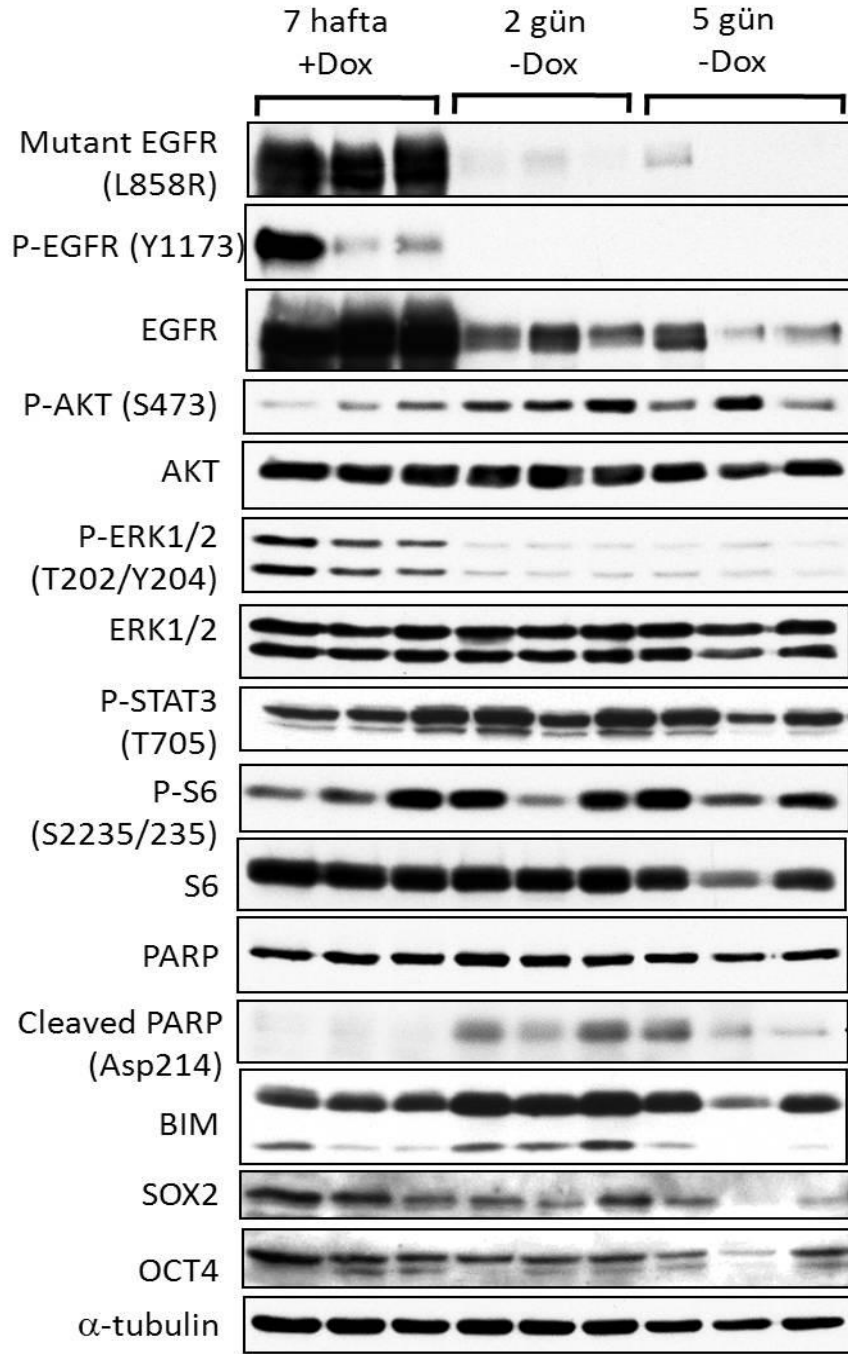
Resim 7. Mutant EGFR sinyal yolağı 3 ve 9 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğerinin H&E boyaması

EGFR tümörigenezinde SOX2'nin rolünün anlaşılabilmesi için mutant EGFR taşıyan CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerden 3 ve 9 hafta doksosiklinle beslenen ve beslenmeyenlerin akciğerleri alınıp immünohistokimyasal analizleri ve protein izolasyonu yapıldı. Her iki zaman grubunda da doksosiklin alan farelerde EGFR sinyalleşmesinin arttığı görülmüştür. Bununla birlikte p-STAT3 artmıştır. p-AKT 3. haftada artarken, 9. Haftada değişmemiştir. Aynı şekilde p-AKT ile birlikte p-FOXO1/3 3 haftada artmış ancak 9 haftada bir değişim gözlenmemiştir. SOX2 ve OCT4 ifadesi EGFR sinyalleşmesi ile birlikte 3 ve 9 haftada artmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. Mutant EGFR sinyal yolağı 3 ve 9 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğerindeki sinyal değişimleri

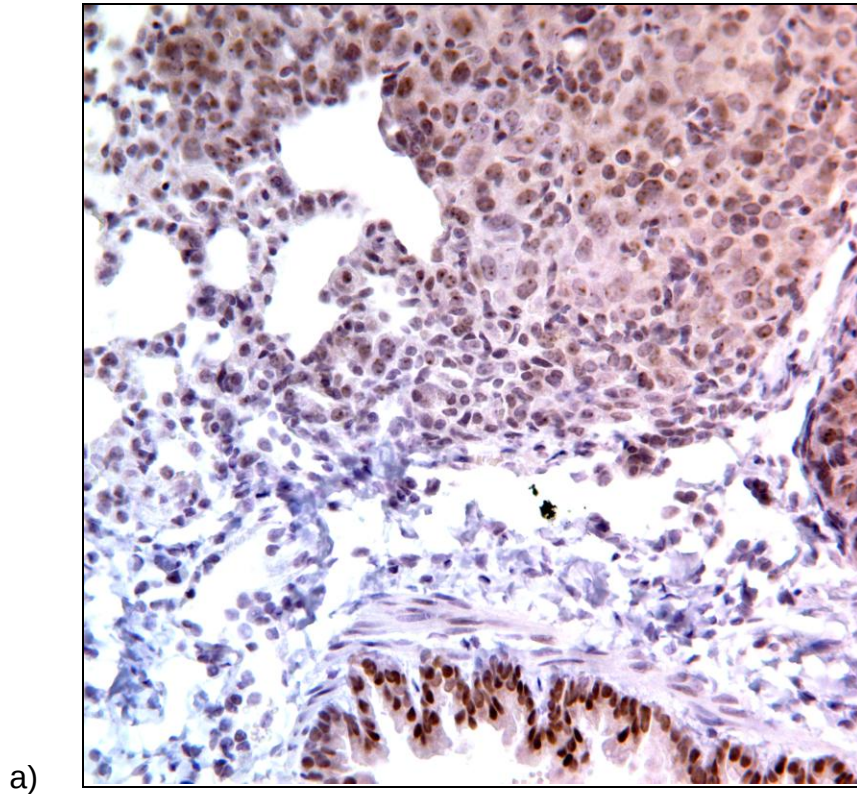
Bu sonuçlar SOX2'nin küçük hücreli dışı akciğer kanserinde EGFR tümörigenezinde etkili olduğunu göstermektedir. Başka bir şekilde bu sonucu kontrol etmek istediğimizde 7 hafta boyunca doksosiklinle beslenmiş farelerden 2 gün ve 5 gün doksosiklin uzaklaştırılıp akciğerleri alındı ve çeşitli protein ifadelerine bakıldı. Buna göre doksosiklinli besin ortamdan uzaklaştırıldığında EGFR sinyali de azalmaktadır. Bununla birlikte p-ERK aktivitesi de azalmıştır. İlginç olarak p-AKT düzeyi 2 gün ve 5 gün doksosiklin almayan farelerde doksosiklin alan farelere göre artmıştır. S6 düzeyi gruplar arasında aynı kalırken, p-S6 düzensiz bir değişim göstermiştir. Apoptozisde rol oynadığı bilinen PARP molekülü doksosiklin uygulaması durdurulduğunda kırılıma uğramıştır. Aynı şekilde proapoptotik proteinlerden biri olan BIM'in ifadesi de 2 gün ve 5 gün doksosiklin uygulanmayan gruplarda artmıştır.

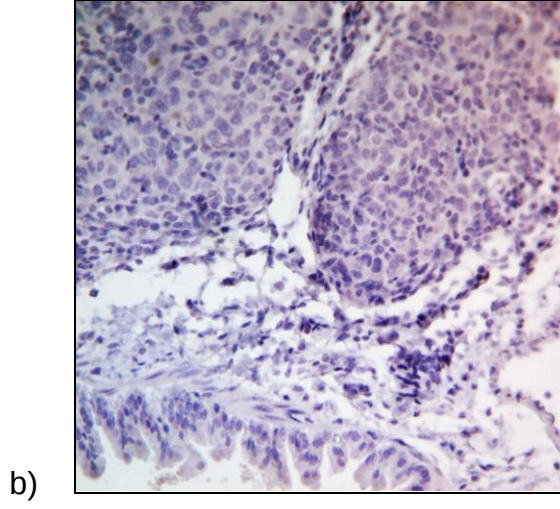


Şekil 21. Mutant EGFR sinyal yolağı 7 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fareler 2 ve 5 gün doksosiklin almadıklarında akciğerlerindeki sinyal değişimleri

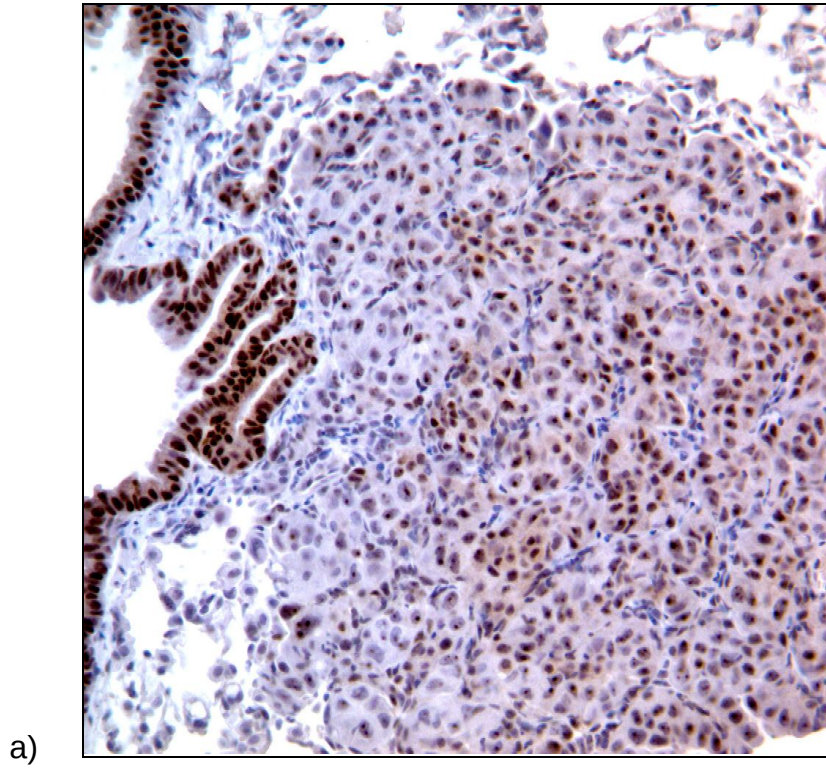
Öte yandan SOX2 ve OCT4 ifadesi EGFR sinyalleşmesinin azalması ile azalmış bu da bir kez daha bize EGFR tümörigenezinde SOX2'nin rol oynayabileceğini göstermiştir.

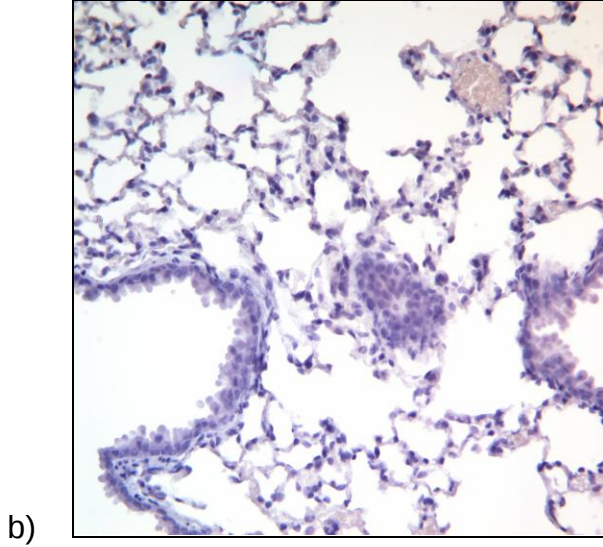
SOX2'nin tümörde nerede bulunduğunu görmek için immünohistokimya yöntemi ile CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerden alınan akciğer kesitlerini SOX2 ile boyadık. 3 hafta ve 9 hafta doksosiklin alan farelerin akciğer kesitlerinde adenokarsinom oluşumları gözlenmektedir (Resim 8 ve 9). Bu adenokarsinomların SOX2 ile boyandığı, ancak normal alveolar tip1 ve tip2 hücrelerin boyanmadığı gözlenmiştir. Bu durum akciğerde EGFR tümörigenezinde SOX2'nin rol oynadığını göstermektedir. Fotoğrafta görüldüğü gibi proksimal hava yolları da SOX2 ile boyanmıştır. Bu bölgede Clara, silli ve bazal hücreler yer almaktadır. Bu hücrelerin SOX2 proteinini ifade ettiği bilinmektedir.





Resim 8. SOX2 antikoru ile boyanmış Mutant EGFR sinyal yolağı 3 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğer kesitlerinin immunohistokimyasal analizi (a) ve negatif kontrol (b).



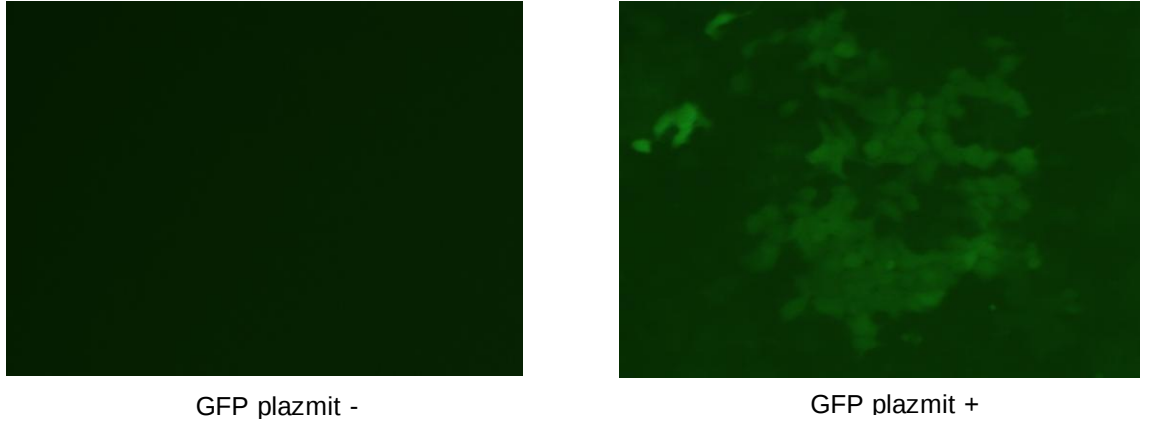


Resim 9. SOX2 antikoru ile boyanmış Mutant EGFR sinyal yolağı 9 hafta boyunca aktifleşerek adenokarsinom oluşumu gözlenmiş CC10-EGFR L858R/T790M transgenik fare akciğer kesitlerinin immunohistokimyasal analizi (a) ve negatif kontrol (b).

SOX2'nin küçük hücreli akciğer kanseri EGFR tümörigenezinde etkili olabileceğini in vivo çalışmalarla gördükten sonra proliferasyon, erlotinib direnci ve tümörün başlamasında etkisini araştırabilmek için SOX2'yi shRNA kullanarak lentivirüs aracılığıyla ifadesi susturulmuştur.

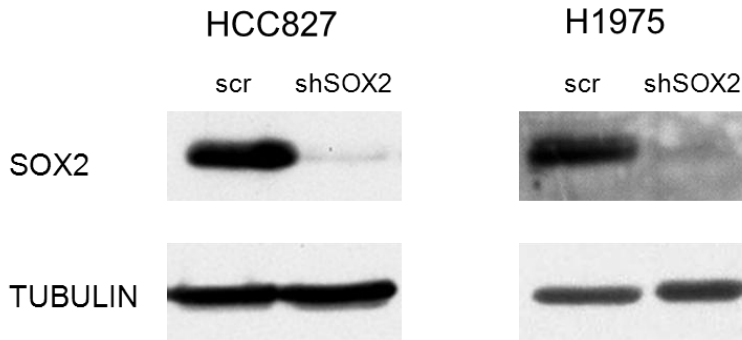
4.3. shRNA Kullanılarak SOX2'nin Susturulması

Gen susturması çalışmalarında çok önemli bir adım olan kontrol grubunu oluşturmak için hem GFP hem scr plazmit kullanıldı. GFP plazmit kullanılmasının amacı oluşan lentivirüsün hücreyi enfekte edip etmediğinin görüntülenmesi içindir. Resim 10'da görüldüğü gibi GFP virüsü kullanılan plazmitlerle 293 FT hücrelerinde oluşmuş ve küçük hücreli akciğer kanser hücre hattını enfekte etmiştir.



Resim 10. KHDAC hücre hattının GFP geni taşıyan lentivirüs ile enfeksiyonu

SOX2 genini susturmak için EGFR mutant küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hatlarından TKI'ne bir duyarlı (HCC827) bir de dirençli (H1975) hücre hattı oluşturulan lentivirüs ile enfekte edildi. Puromisin içeren besiyerinde canlı kalan hücreler shSOX2'ya sahip hücrelerdir. Bunu kontrol etmek için Western blot yöntemiyle virüs ile enfekte edilen hücrelerde SOX2 yokluğu doğrulandı (Şekil 22).

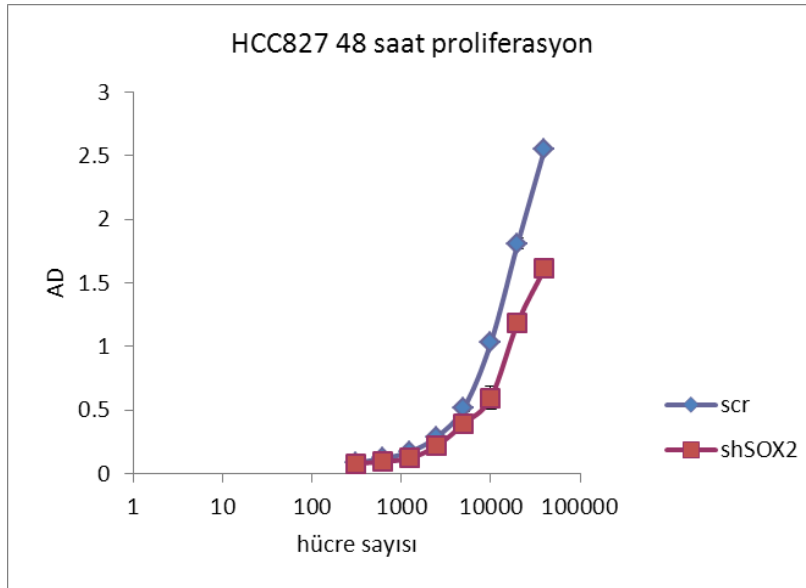
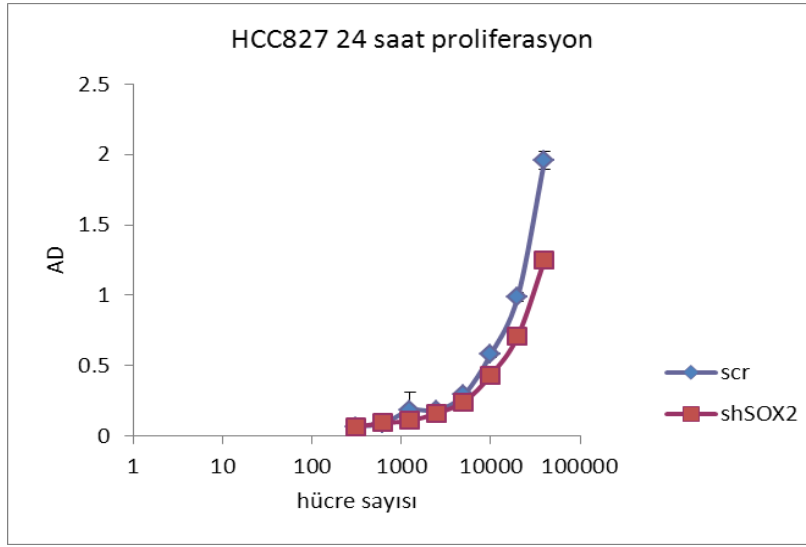


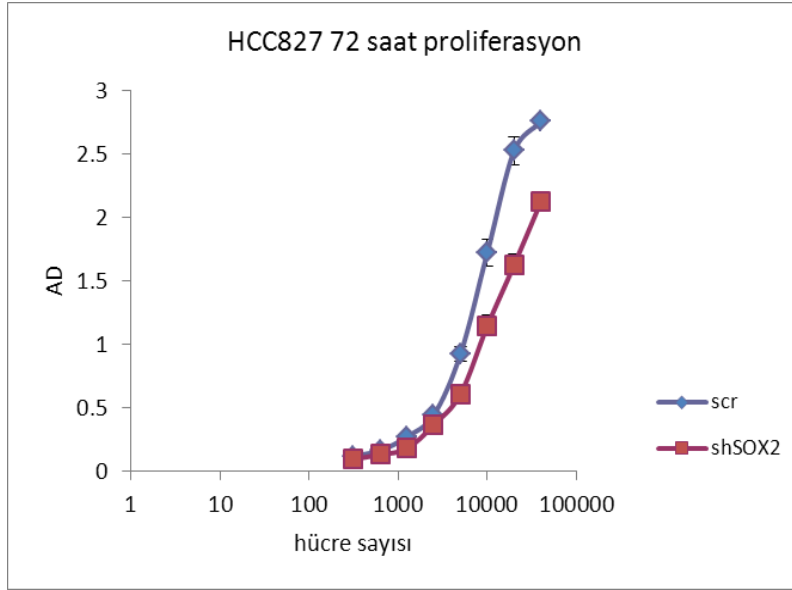
Şekil 22. HCC827 ve H1975 hücrelerinde SOX2 eksikliğinin kontrolü

4.4. SOX2 Eksikliğinin Hücre Çoğalmasına Etkisi

SOX2 ifadesi baskılanmış hücreler ve baskılanmamış hücrelerdeki proliferasyon farkını gözlemek için hücreler çeşitli sayılarda 96'lık platelere ekilip 24, 48, 72 saat sonra SRB deneyi yapıldı. Elde

edilen sonuçlara göre SOX2 ifadesi baskılanmış HCC827 hücreleri kontrol grubuna göre 2500 hücre ve üzeri hücre ekildiğinde 24, 48 ve 72. saatte daha yavaş çoğalmaktadır (Grafik 3 ve Tablo 2). H1975 hücrelerinde ise 24, 48 ve 72. saate SOX2 eksikliğinin proliferasyon üzerinde bir etkisi yoktur (Grafik 4 ve Tablo 3).

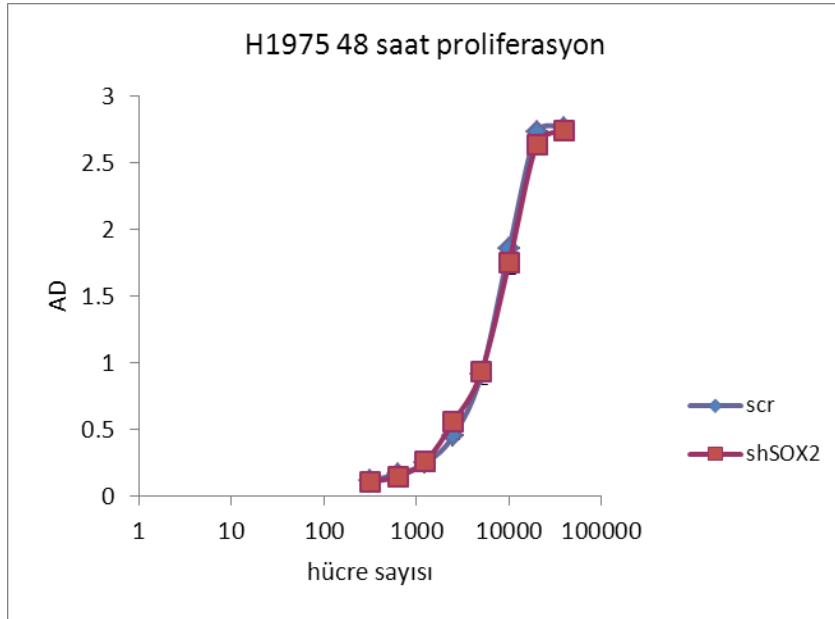
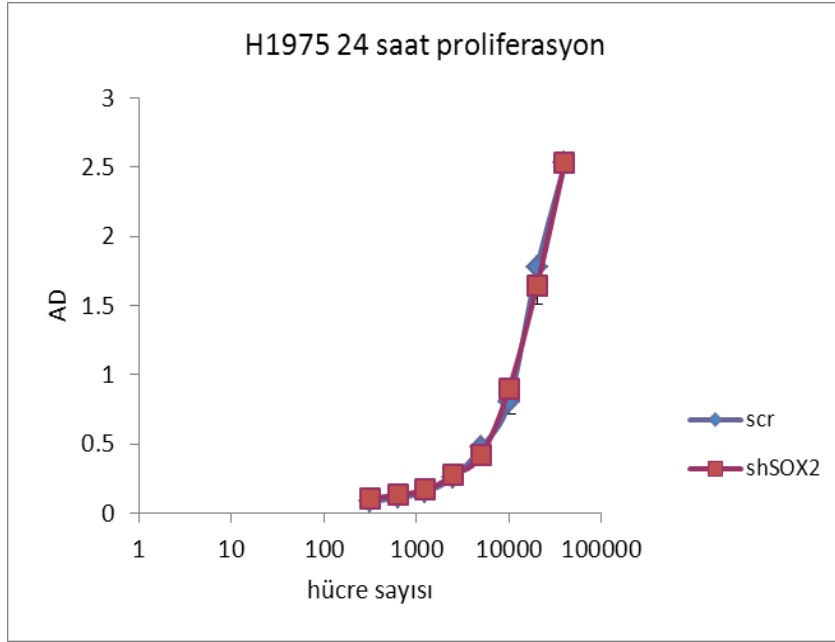


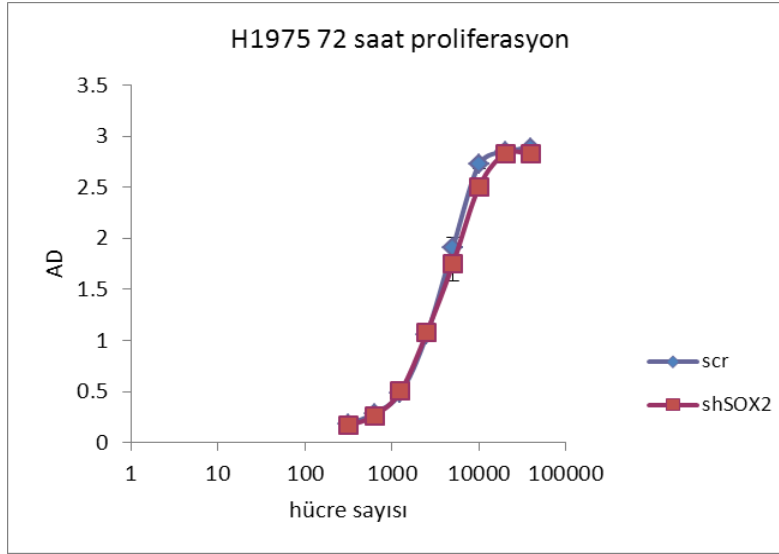


Grafik 3. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatte proliferasyon oranları

Tablo 2. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatte proliferasyon oranları arasındaki istatistiksel fark ($p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).

Hücre sayısı	24 saat	48 saat	72 saat
312	0.31	0.18	<0.05
625	0.73	0.01	<0.05
1250	0.27	<0.05	<0.05
2500	<0.05	<0.05	<0.05
5000	<0.05	<0.05	<0.05
10000	<0.05	<0.05	<0.05
20000	<0.05	<0.05	<0.05
40000	<0.05	<0.05	<0.05





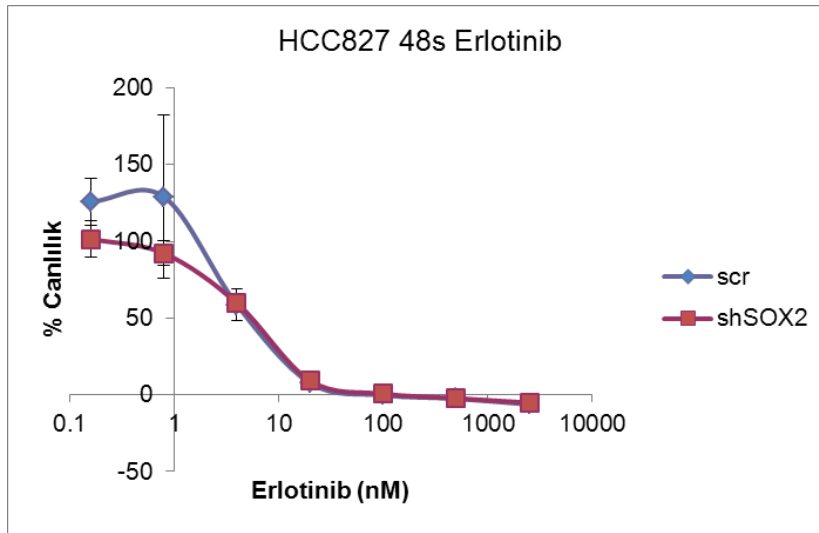
Grafik 4. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatte proliferasyon oranları

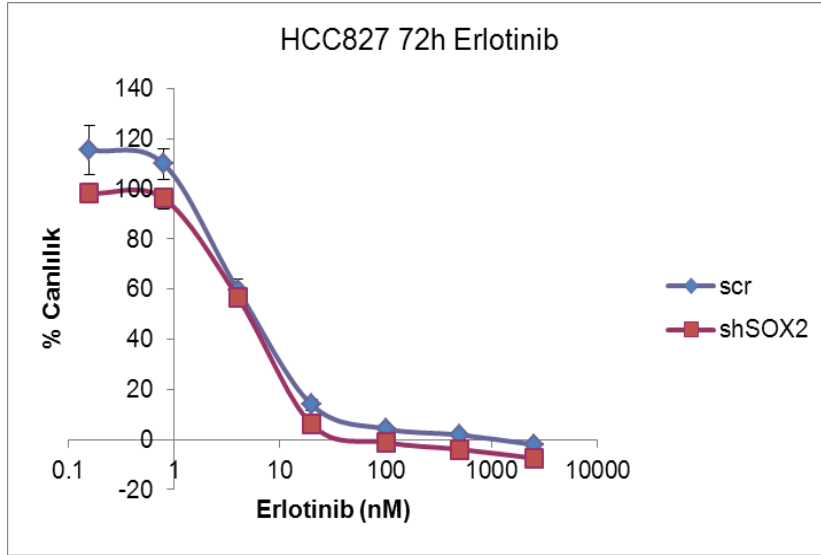
Tablo 3. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatte proliferasyon oranları arasındaki istatistiksel fark ($p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).

Hücre sayısı	24 saat	48 saat	72 saat
312	0.051	0.26	0.21
625	<0.05	0.02	0.11
1250	0.11	0.25	0.65
2500	0.23	0.016	0.56
5000	0.01	0.72	0.14
10000	0.054	0.093	<0.05
20000	0.11	0.025	0.14
40000	0.86	0.36	0.087

4.5. SOX2 Eksikliğinin Erlotinib ve Triciribine Yanıtına Etkisi

SOX2 eksikliğinin EGFR inhibitörü, erlotinib yanıtına etkisini araştırmak için SOX2 ifadesi olan ve olmayan HCC827 ve H1975 hücrelerine çeşitli konsantrasyonlarda erlotinib uygulandı. HCC827 hücre hattında SOX2 eksikliği 72 saat sonra erlotinib yanıtında az da olsa etkili olmuştur (Grafik 5 ve Tablo 4). Ancak 48 saatte erlotinibin yüksek konsantrasyonlarında dahi istatistiksel olarak kontrol grubu ve SOX2 olmayan grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.



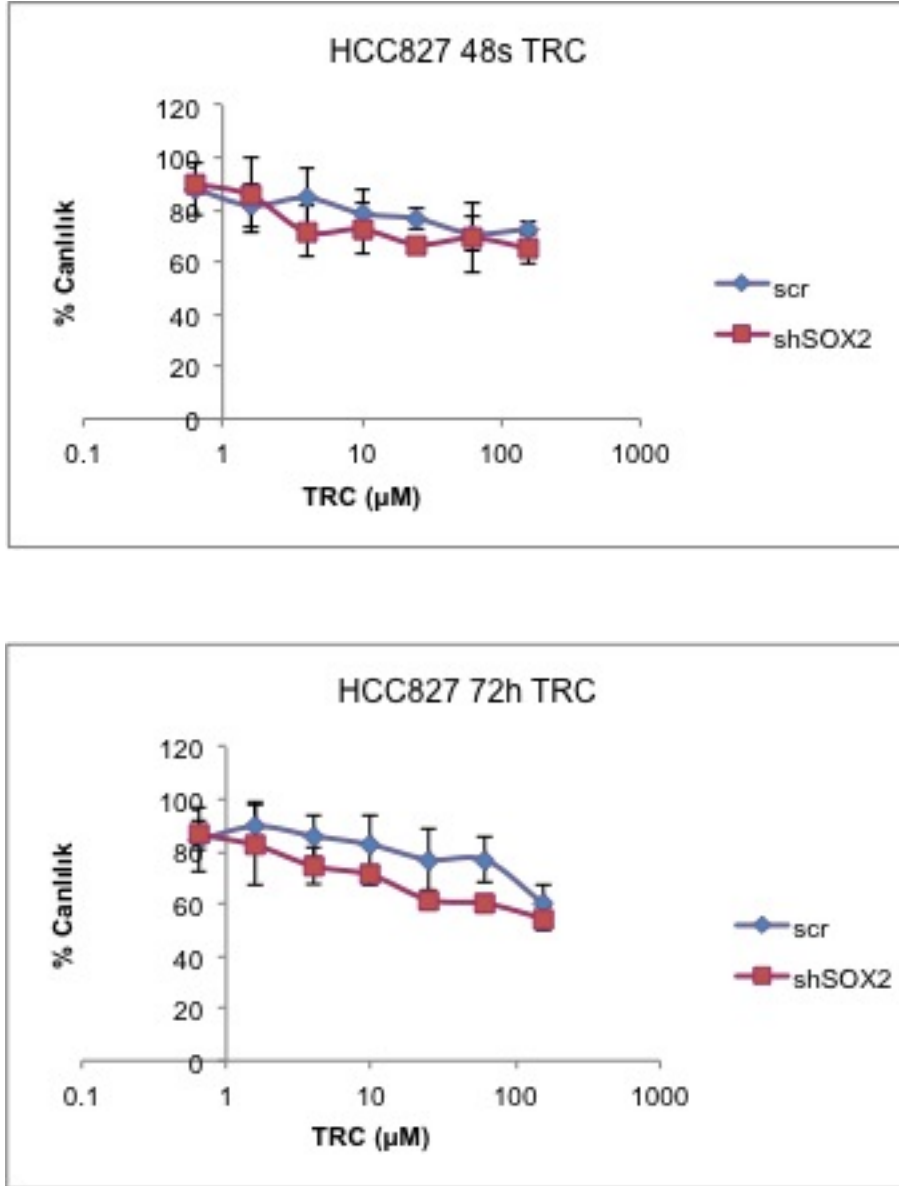


Grafik 5. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 48 ve 72 saatte erlotinib yanıtı

Tablo 4. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 48 ve 72 saatte erlotinib yanıtı arasındaki istatistiksel fark ($p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).

Erlotinib konsantrasyonu	48 saat	72 saat
0.16 nM	0.05	0.013
0.8 nM	0.22	<0.05
4 nM	0.84	0.24
20 nM	0.51	<0.05
100 nM	0.36	0.011
500 nM	0.3	0.038
2500 nM	0.64	<0.05

Bir AKT inhibitörü olan triciribine'in çeşitli konsantrasyonları SOX2 ifadesi baskılanmış ve baskılanmamış HCC827 hücrelerine 48 ve 72 saat uygulandığında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (Grafik 6 ve Tablo 5).

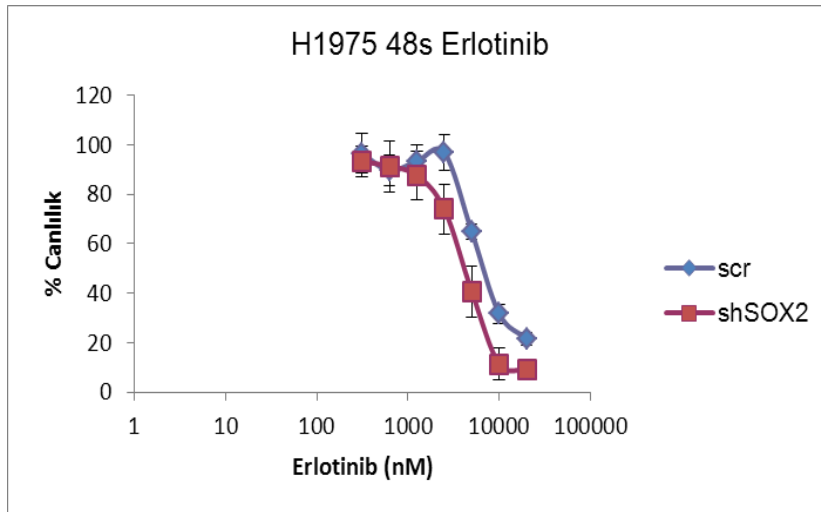


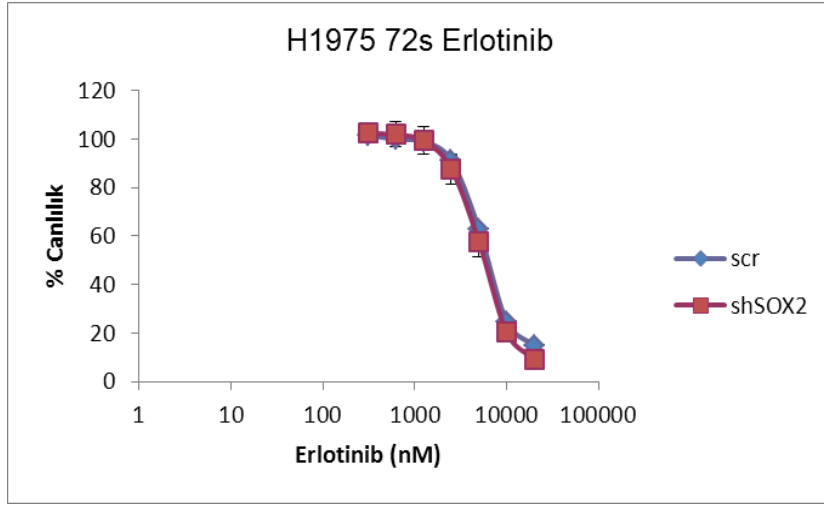
Grafik 6. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 48 ve 72 saatte triciribine yanıtı

Tablo 5. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan HCC827 hücrelerinde 48 ve 72 saatte triciribine yanıtı arasındaki istatistiksel fark ($p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).

Triciribine konsantrasyonu	48 saat	72 saat
0.64 μM	0.72	0.77
1.6 μM	0.93	0.45
4 μM	0.14	0.075
10 μM	0.41	0.1
25 μM	0.0038	0.055
62.5 μM	0.84	0.06
156.2 μM	0.058	0.24

H1975 hücrelerinde ise erlotinib ancak 10 μM 'dan sonra SOX2 eksikliği erlotinib yanıtını etkilemiştir. Ancak bu çok yüksek bir dozdur (Grafik 7 ve Tablo 6).





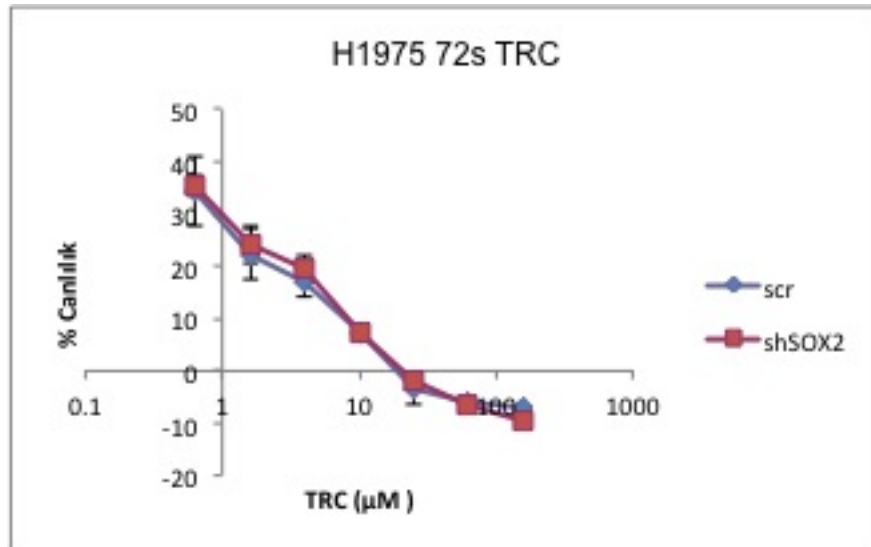
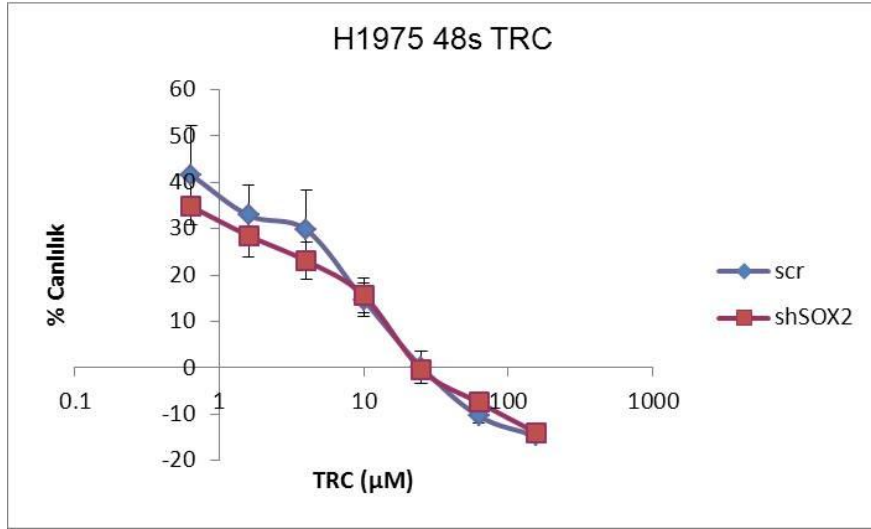
Grafik 7. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 48 ve 72 saatte erlotinib yanıtı

Tablo 6. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 48 ve 72 saatte erlotinib yanıtı arasındaki istatistiksel fark ($p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).

Erlotinib konsantrasyonu	48 saat	72 saat
312 nM	0.57	0.7
625 nM	0.79	0.53
1250 nM	0.37	0.92
2500 nM	0.01	0.34
5000 nM	0.0038	0.17
10000nM	0.0017	0.028
20000nM	<0.05	<0.05

Triciribine'in çeşitli konsantrasyonları SOX2 ifadesi baskılanmış ve baskılanmamış H1975 hücrelerine 48 ve 72 saat

uygulandığında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (Grafik 8 ve Tablo 7).



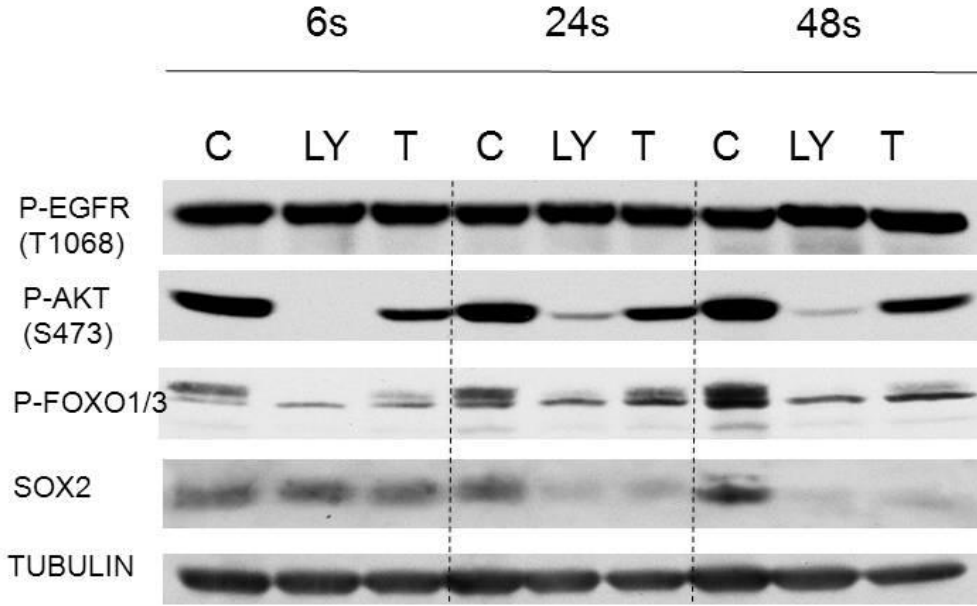
Grafik 8. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 48 ve 72 saatte triciribine yanıtı

Tablo 7. SOX2 ifadesi baskılanan ve baskılanmayan H1975 hücrelerinde 48 ve 72 saatte triciribine yanıtı arasındaki istatistiksel fark ($p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir).

Triciribine konsantrasyonu	48 saat	72 saat
0.64 μ M	0.25	0.97
1.6 μ M	0.32	0.6
4 μ M	0.21	0.39
10 μ M	0.73	0.54
25 μ M	0.21	0.21
62.5 μ M	0.019	0.38
156.2 μ M	0.02	<0.05

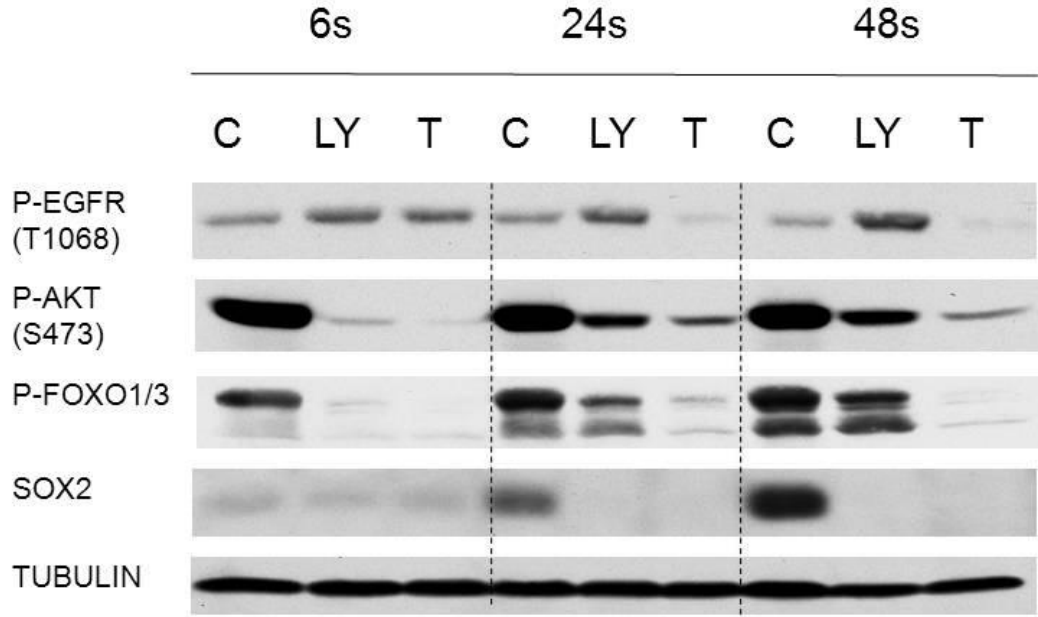
4.6. PI3K/AKT Yolağının SOX2 İfadesine Etkisi

PI3K/AKT yolağının SOX2 ifadesi üzerindeki etkilerini araştırmak için H1975 ve HCC827 hücrelerine 6, 24 ve 48 saat 10 μ M LY294002 ve 10 μ M triciribine uygulandı. Uygulama süresi bittiğinde, her gruptan protein izolasyonları yapıldı. Western blot yöntemi ile p-EGFR, p-AKT, p-FOXO1/3, SOX2 ve TUBULIN protein ifadeleri araştırıldı. LY294002 ve triciribine uygulama yapılan tüm saattlerde etkili olsa da, ilk 6 saatte AKT fosforilasyonunu daha etkin bir şekilde baskılamıştır. Özellikle H1975 hücrelerinde triciribine 6. saatte, HCC827 hücrelerinde ise LY294002 p-AKT aktivitesini tamamen ortadan kaldırmıştır. AKT aktivitesine paralel olarak p-FOXO1/3 aktivasyonu da uygulama yapılan tüm gruplarda PI3K/AKT inhibitörleriyle azalsa da, en etkili olduğu zaman aralığı ilk 6 saattir. SOX2 ifadesi zamanla birlikte kontrol gruplarında artmakta ancak bu artış özellikle 24 ve 48. saatte LY294002 ve triciribine ile baskılanmaktadır. Bu azalış SOX2 ifadesinin PI3K/AKT yolağından etkilendiğini göstermektedir (Şekil 23).



Şekil 23. HCC827 hücrelerinde 6, 24 ve 48 saat LY294002 ve triciribine uygulamasının SOX2, p-AKT ve p-FOXO1/3 ifadesi üzerine etkisi

Buna benzer olarak H1975 hücrelerinde LY294002 ve triciribine ile p-AKT aktivitesi azalmış, p-FOXO1/3 artmıştır. SOX2 protein ifadesi ise 24 ve 48 saat uygulama yapılan gruplarda kontrole göre belirgin şekilde azalmıştır. Bu hücre hattında da SOX2 ifadesi PI3K/AKT yolağının etkisi altındadır (Şekil 24).

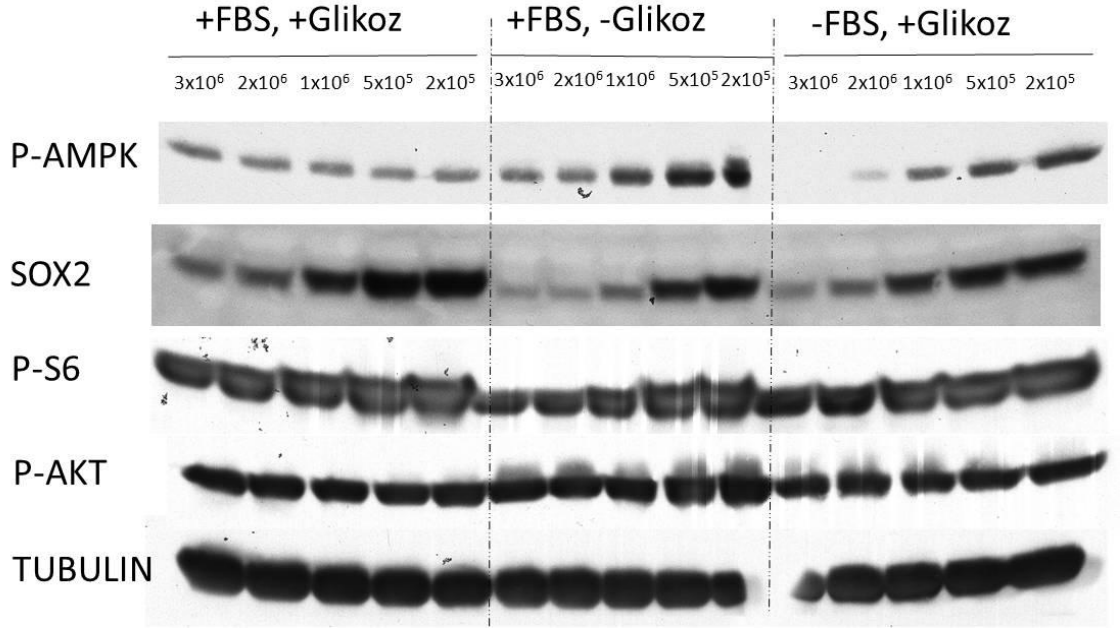


Şekil 24. H1975 hücrelerinde 6, 24 ve 48 saat LY294002 ve triciribine uygulamasının SOX2, p-AKT ve p-FOXO1/3 ifadesi üzerine etkisi

4.7. Hücre Yoğunluğu ve Besinin SOX2 İfadesine Etkisi

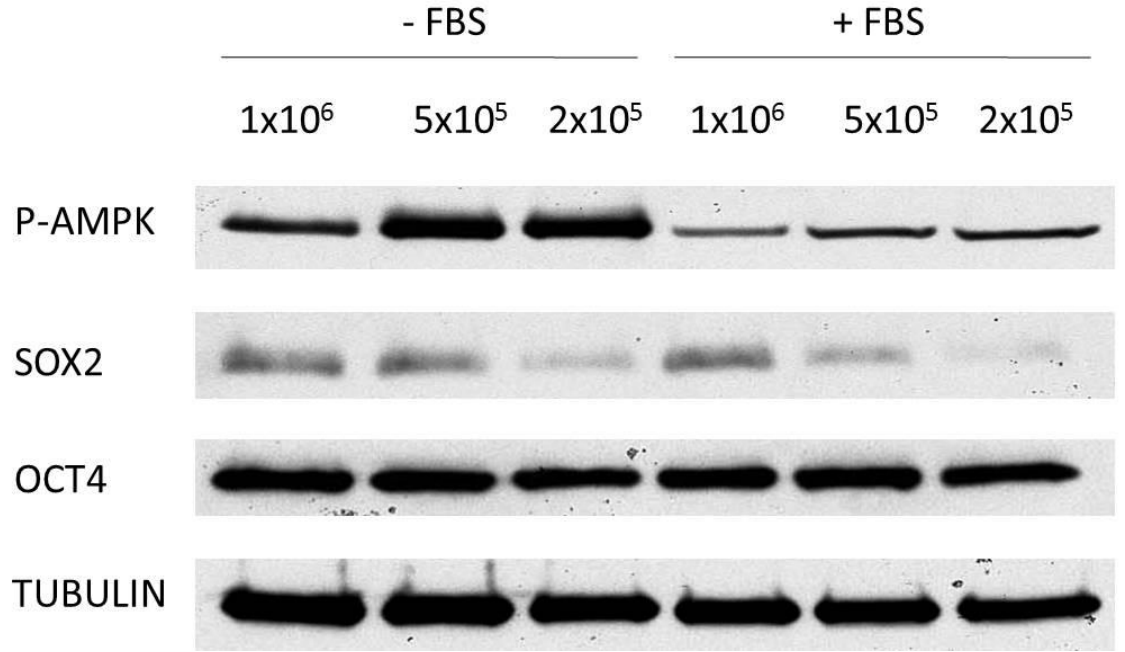
SOX2'nin H1975 ve HCC827 hücrelerinde zamanla birlikte artması, SOX2 ifadesinin hücre yoğunluğundan etkilenebileceğini düşündürmüştür. Hücre yoğunluğunun SOX2 ifadesine etkisini araştırmak için hücreleri farklı yoğunlukta ekip eş zamanlı olarak SOX2 ifadesi incelenmiştir. Bununla birlikte glikoz ve serum eksikliğinde SOX2 ifadesinin nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Şekilde görüldüğü gibi PC9 hücrelerinde, hücreler çok yoğun ekildiğinde SOX2 ifadesi azken, az yoğun ekildiğinde fazladır. P-AMPK aktivitesi de SOX2'ye paralel bir şekilde hücre yoğunluğuyla birlikte azalmaktadır. Öte yandan p-AKT aktivitesi değişmemiştir. P-S6 aktivitesinde az bir değişim olmakla beraber, hücre yoğunluğu arttıkça ifade azalmıştır. Besiyeri ortamından glikoz uzaklaştırıldığında aynı yoğunlukta ekilen PC9 hücreleri kıyaslandığında p-AMPK aktivitesi artmıştır. SOX2 ifadesi ise glikoz eksikliğinde azalmıştır. Besiyerinde glikoz olup, serum olmadığında ise

yine p-AMPK aktivitesi artmıştır. SOX2 ifadesi glikoz yokluğuna benzer şekilde serum yokluğunda da azalmıştır (Şekil 25).



Şekil 25. PC9 hücrelerinde glikoz, serum eksikliğinin ve hücre yoğunluğunun SOX2, p-AMPK, p-AKT ve p-S6 ifadesi üzerindeki etkisi

Öte yandan diğer bir hücre hattı olan H1975’de, PC9 hücrelerinde görülenin aksine hücre yoğunluğu arttıkça SOX2 ifadesi de artmaktadır. Aynı hücre yoğunluğunda FBS olmadığında p-AMPK aktivitesi artarken, OCT4 ifadesi aynı kalmaktadır. Hücre yoğunluğu azaldığında ise SOX2 ifadesi azalmakta, p-AMPK artmaktadır. OCT4 değişmemektedir (Şekil 26).



Şekil 26. H1975 hücrelerinde serum eksikliğinin ve hücre yoğunluğunun SOX2, p-AMPK ve OCT4 ifadesi üzerindeki etkisi

4.8. SOX2 Eksikliğinin Tümör Oluşumundaki Rolü

SOX2'nin tümörigenezdeki başlatıcı rolünü değerlendirebilmek için SOX2 olan ve olmayan H1975 ve HCC827 hücreleri immun sistemi olmayan farelere çeşitli sayılarda (2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5) enjekte edildi (Tablo 8). Farelerin hem sırt hem kasık bölgesine hücre enjeksiyonu yapıldı. Yüksek sayıda hücrelerin oluşturduğu solid tümörler yaklaşık bir hafta sonra gözle görülür hale geldi (Resim 11).

Tablo 8. Xenograft modellerde SOX2 ifadesi olan ve olmayan H1975 ve HCC827 hücrelerin enjeksiyonu sonucu tümör oluşumu

	Hücre sayısı	scr	shSOX2
H1975	2×10^3	4/4	4/4
	2×10^4	4/4	4/4
	2×10^5	4/4	4/4
HCC827	2×10^3	4/4	4/4
	2×10^4	4/4	4/4
	2×10^5	4/4	4/4



Resim 11. Çalışmamızda kullandığımız atimik farelerin sırt ve enselerinde oluşan tümörler.

Tümör oluşumu ve büyüklüğü açısından SOX2 ifadesi olan ve olmayan grup arasında bir fark gözlenmedi. Örneğin, dört farenin

dördünde de 2×10^3 scr H1975 hücresinin ve 2×10^3 shSOX2 H1975 hücresinin tümör oluşum hızı ve büyüklüğü aynıydı.

Sonuçlarımıza göre EGFR mutant KHDAK gelişiminde bir rol oynayabileceğini düşündüğümüz SOX2 protein ifadesi hücre çoğalması ve erlotinib yanıtını etkilememiştir. Bununla birlikte SOX2 ifadesi atimik farelerde çeşitli hücre yoğunluğunda tümör oluşumunu etkilememiştir. Ancak bu modelde SOX2 ifadesi PI3K/AKT yolağından ve hücre yoğunluğundan etkilenmiştir.

5. TARTIŞMA

KHDAK'nde EGFR geninde görülen mutasyonlar nedeniyle tümörün gelişmesi, sağ kalımın sağlanması, apoptozisin EGFR TKI ile uyarılması onkogen bağımlılığının bir örneğidir. Onkogen bağımlı KHDAK tedavisi diğer tedavilerden farklılık göstermektedir çünkü bu hastalıkta EGFR sinyal yolağının inhibisyonu temel alınmaktadır ¹⁸⁸.

Ligandın EGFR'ye bağlanmasıyla, EGFR aile üyesi reseptörler heterodimer ya da homodimer oluşturur ve sitozolik kısımdaki anahtar tirozin amino asitleri otofosforile olur. Bu fosforile olan tirozinler sinyalleşme molekülleri için tutunma bölgesi olur, böylece proliferasyon ve sağkalımı sağlayan sinyalleşme yolları aktive olur. Glioblastomada EGFR proteininin hücre dış kısmını kodlayan ekzon 2-7 delesyonu sıklıkla gözlenmektedir ¹⁸⁹. Akciğer adenokarsinomlarının %10'unda tirozin kinaz bölgesini kodlayan ekzonlarda mutasyonlar belirlenmiştir ^{50, 51}. Glioma, baş-boyun, akciğer, meme, over ve mesane gibi pek çok kanserinde artmış EGFR ekspresyonu gözlenmiştir. Ayrıca gliomalarda ve akciğer kanserinde genellikle EGFR amplifikasyonuna da rastlanmaktadır ⁴⁹.

Akciğer adenokarsinomlarında görülen somatik EGFR mutasyonları; ekzon 19'daki çerçeve içi delesyonlar (746-753), ekzon 18'deki G719 değişimi ve ekzon 21'deki L858 ya da L861 nokta mutasyonudur. Bu mutasyonlara sahip hastaların sigara içmeyen, kadın ve Asyalı olma gibi benzer ortak klinik özellikleri vardır. Ayrıca bu mutasyonlar TKI'lerine duyarlılıkla ilişkilendirilmiştir ^{50, 51}.

Epitelyal tümörlerde sıklıkla görülen artmış EGFR ekspresyonu, bu reseptörü hedefleyerek kanseri önleyebilen ajanların geliştirilmesine neden olmuştur ¹⁹⁰. EGFR'yi hedefleyen tedaviler arasında

günümüzde proteinin hücre zarı dışında kalan kısmını hedefleyen antikörler (cetuximab, panitumumab) ve tirozin kinaz bölgesine bağlanabilen küçük molekül inhibitörleri (erlotinib, gefitinib) kullanılmaktadır. Bu ajanlar yabancı tip EGFR'ye karşı geliştirilmiş, baş-boyun ve akciğer kanserinde kullanılmakta olan FDA onaylı ilaçlardır. 2004 yılında birbirinden farklı birçok grup, EGFR'nin tirozin kinaz bölgesinde mutasyonu olan akciğer adenokarsinomlu hastaların gefitinib ve erlotinibe diğerlerine göre daha duyarlı olduklarını gözlemlemiştir ^{50, 51}. Ekzon 19 delesyonu ya da 858. pozisyonunda lösinin arjinine dönüşmesiyle oluşan bu EGFR mutasyonları, sürekli aktif olarak çalışan bir kinaz oluşumuyla sonuçlanır. Bu mutant allellerin akciğer epitelinde ifadesi, akciğer tümörlerinin oluşumuna neden olur ¹⁹¹. Bu mutant reseptörler ATP'ye göre ilaca daha fazla afiniteye sahiptir ¹⁹². EGFR mutasyonlu hastaların TKI ile tedavisi faz III çalışmalarında Doğu Asyalı ilerlemiş KHDAK hastalarda geleneksel kemoterapi ajanları (carboplatin/paclitaxel) ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışma IRESSA Pan Asian Study, IPASS olarak da bilinir. Bu çalışmada gefitinib kullanan EGFR mutasyonlu hastalarda platin bazlı ilaç kullananlara göre, hayatta kalım süresi aynı olsa da, daha uzun durağan hastalık süresine sahip oldukları görülmüştür ¹⁹³. Ancak, terapi başladıktan 1 yıl sonra ilaca duyarlı EGFR mutasyonlu, gefitinib ve erlotinibe yanıt veren hastalarda direnç gelişmiştir ¹⁹⁴. Tümörden yapılan biyopside hastaların yarısında EGFR kinaz bölgesinde ikinci bir mutasyon belirlenmiştir ¹⁶⁸. En sık rastlanan değişim ekzon 20'de 2369. nükleotiddeki C-T değişimidir. Bu nokta mutasyonu, treonin amino asitinin metiyonine (T790M) değişimini sağlar. Bu değişim CML hastalarında BCR-ABL geninde T315I değişiminin analogudur ve imatinib (Gleevec)'e direnç neden olmaktadır ¹⁹⁵. Kristal yapı analizlerine göre EGFR'deki T790M değişimi gefitinib ya da erlotinibin ATP bağlanma paketine bağlanmasını bozabilir ¹⁹⁶. Bu değişim aynı zamanda afinitenin ilaçtan çok ATP'den yana olmasını sağlar ¹⁹⁷. Diğer ilaca direnç mekanizmalarında

olduğu gibi, T790M değişimi kinaz aktivitesini ve onkolojik potansiyeli yabancı tip proteine göre artırır ¹⁹⁸.

Çalışmamızda EGFR TKI'ne duyarlı ve dirençli hücre hatları kullanılmış ve bu hücrelerde EGFR sinyal yolağı erlotinib ile inhibe edilmeye çalışılmıştır. EGFR mutant hücre hatlarına 3 ve 9 gün süreyle uygulanan erlotinib TKI duyarlı hücre hatlarında p-EGFR aktivitesini azaltırken, dirençlilerde aktivitede bir değişim gözlenmemiştir. Hücre hatlarının sahip olduğu bazı mutasyonların dirence neden olması beklenen bir sonuçtur. Erlotinib uygulamasının ardından H1975 ve PC9 hücrelerinde doza ve süreye bağlı olarak p-IGF-1R aktivitesinde artış gözlenmiştir. Bu durum Hurbin ve arkadaşlarının çalışması ile uyumludur. Bu çalışmada EGFR TKI dirençli hücrelere IGF-1R inhibitörü verildiğinde apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir ¹⁹⁹. Bu direnç mekanizmalarından T790M mutasyonu ve MET amplifikasyonu klinikde görülse de, PTEN kaybı, IGF-1R aktivasyonu gibi mekanizmalar yalnızca in vitro çalışmalarda gözlenmiştir.

EML4-ALK füzyon onkoproteini ilk kez 2007'de küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalarda tanımlanmış ²⁰⁰ ve bu proteine karşı bir ALK tirozin kinaz inhibitörü olan Crizotinib geliştirilmiştir ve 2011 yılında FDA onayı almıştır. EML4-ALK onkoproteini gözlenen hastaların genellikle genç yaşta olması, sigara kullanmamaları ve adenokarsinomlu olmaları dikkat çekmiştir ²⁰¹.

İlk jenerasyon EGFR TKI terapisi standart kemoterapiye kıyasla EGFR mutant KHDAK hastalarında durağan hastalık süresini ve toplam sağkalım oranını %25 oranında arttırmıştır ²⁰². İkinci jenerasyon TKI EGFR'nin T790M mutasyonuna göre geliştirilmiştir. Bunlar da ilk jenerasyonda olduğu gibi zarda EGFR proteininin hücre içi bölgesine

bağlanır ²⁰³. Bu inhibitörlerden pekçoğu birden fazla reseptör tipine afinite gösterirler. Geri dönüşümsüz olarak bağlanabilen ve şimdilik klinik deneme aşamasında olan bu ilaçlardan bazıları PF0299804 ve afatinib (BIBW2992) ²⁰³.

EGFR T790M nedeniyle oluşan ilaç direncini ortadan kaldırmak için kullanan yaklaşımlardan biri WZ4002 ya da PF299804 gibi dönüşümsüz yüksek konsantrasyonda mutant seçici inhibitörlerin kullanılmasıdır. Cortot ve arkadaşlarının çalışmasında EGFR mutant PC9 hücrelerine gefitinib uygulanarak T790M mutasyonuna sahip ilaca dirençli tipte hücreler elde edilmiştir. Aynı şekilde PC9 hücrelerinde PF299804 ve WZ4002 dirençli klonlar geliştirilmiş ancak bunlarda T790M mutasyonu gözlenmemiştir. Bu klonlarda ise IGFBP3 ifade kaybı ile gelişen aktifleşmiş IGF1R sinyalleşmesi belirlenmiştir. IGF1R inhibitörü BMS 536924 uygulaması EGFR inhibitörüne duyarlılığı arttırmıştır. PF299804 ya da WZ4002'nin daha uzun süre uygulanması ile PC9 hücrelerinde ERK aktivasyonu görülmüştür. MEK inhibitörü olan CI-1040 ise EGFR/IGF1R inhibitör kombinasyonuna olan duyarlılığı arttırmıştır ²⁰⁴. Çalışmamızda erlotinib uygulaması ile IGFBP3 ifadesi doza ve zamana bağlı olarak artmıştır.

T790M mutasyonunun KHDAK hastalarında sık rastlanması neratinib (HKI-272), dacomitinib (PF00299804) ve afatinib (BIBW2992) gibi ikinci jenerasyon, geri dönüşümsüz EGFR inhibitörlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Ancak, bu ajanlarla yapılan klinik denemelerde de tek ajan olarak kullanımları sınırlı bir ilerleme kaydetmiştir. Neratinib, yapılan faz II denemesinde, KHDAK hastalarında yan etkiler nedeniyle yararlı olamamıştır ²⁰⁵. Afatinib, faz III çalışmasında erlotinib ya da gefitinib alan hastalarla karşılaştırıldığında hastalığın durağan kalma süresinde artış gözlenmiş ancak toplam hayatta kalım

süresi aynı kalmıştır ²⁰⁶. Dacomitinib ise tüm EGFR reseptörlerini hedeflemektedir ve henüz faz II deneme aşamasındadır ²⁰⁷. Geri dönüşümsüz EGFR inhibitörlerinden istenen sonucun alınmamasının nedeni, hastaların gerekli dozları tolere edememesidir. Bu inhibitörler yüksek konsantrasyonlarda doğal tip EGFR'yi de baskılamakta, bu da kaşıntı ve diyare gibi yan etkilere neden olmaktadır ²⁰⁸.

Başka bir çalışmada ise H358, H1650, H292 ve HCC827 hücrelerine EGFR siRNA'ları uygulanmış ve hücre çoğalmasının yavaşladığı belirlenmiştir. T790M'e özel olan siRNA'ların EGFR mRNA'sını baskıladığı ve protein ifadesini azalttığı gösterilmiştir. H1975 hücrelerinde yapılan bu deney sonrası hücre büyümesinin yavaşladığı, kaspaz aktivitesinin ise arttığı gözlenmiştir. H1975 hücrelerinde normalde TKI ve cetuximab etkili olmasa da T790M siRNA'ları ile birlikte uygulandığında TKI'ne duyarlılık artmıştır. Cetuximab ve T790M siRNA'ları uygulandığında ise hücre çoğalmasında azalma görülmüş ve apoptozisin uyarıldığı belirlenmiştir. Dönüşümsüz bir TKI olan afatinib ve T790M siRNA'ları uygulamasında ise en güçlü apoptotik etki gözlenmiştir ²⁰⁹.

EGFR TKI'ne karşı gelişen direnç mekanizmalarından biri ise MET amplifikasyonudur. Çalışmamızda kullandığımız HCC827 GR5 hücrelerinde MET geninin amplifiye olduğu bilinmektedir. İkinci jenerasyon TKI'lerine benzer şekilde, birçok MET inhibitörü klinik deneme aşamasındadır. Bunlardan MetMab ve ARQ197 (tivantinib) en bilinenleridir. MetMab MET reseptörünün hücre dışı bölümüne bağlanan ve böylece HGF aracılı reseptör aktivasyonunu engelleyen, tek kolu olan bir monoklonal antikordur ²¹⁰.

Henüz klinik deneme aşamasında olan MET kinaz inhibitörü E7050'ın, PC9, HCC827 ve H1975 hücre hatlarında HGF-indüksiyonlu

dönüşümlü gefitinib, dönüşümsüz BIBW2992 ve mutant seçici WZ4002 ile gelişen dirençte, duyarlılığın artırılmasında etkili olduğu belirlenmiştir. E7050, MET/GAB1/PI3K/AKT yolağını inhibe ederek etkisini göstermektedir. Bu modelde yapılan in vivo çalışmada ise E7050 ve gefitinib kombinasyonunun AKT fosforilasyonunu engellediği ve tümör büyümesini yavaşlattığı belirtilmiştir ²¹¹.

Kanserin bir gelişim hastalığı olduğu, kanser patogenezinde gelişimsel yolların aktif olduğu bilinmektedir. Klinik çalışmalarda ilaca bir süre ara verildikten sonra, dirençli tümörün EGFR TKI'ne tekrar yanıt verdiği görülmüştür ²¹². Ancak bu durumun nedeni henüz anlaşılamamıştır. Bir çalışmada TKI'ne direnç geliştirmiş tümörlerden tekrar biyopsi alınıp histolojik ve moleküler analizler yapıldığında, EGFR mutasyonu olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında TKI'ne direnç gelişiminde %49 oranda T790M mutasyonu, EGFR ve MET amplifikasyonu, EMT, PIK3CA mutasyonu ve hastaların %14'ünde küçük hücreli dışı akciğer kanserinden küçük hücreli akciğer kanserine dönüşüm gibi değişimler gözlenmiştir. Geçiş gözlenen bu hastalarda ilk gözlenen duyarlı EGFR mutasyonu kalmıştır ancak ne MET amplifikasyonu ne de T790M mutasyonu gözlenmemiştir. Ayrıca birkaç hastada T790M mutasyonu ile ayrıca b-katenin mutasyonları da gözlenmiştir. Bu durum direnç geliştiren hastaların tümörlerinden tekrar biyopsi yapmanın gerekliliğini ortaya koymuştur ²¹³. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinden küçük hücreli akciğer kanserine değişim EGFR TKI'ne özel bir direnç mekanizması olarak düşünülmektedir, çünkü diğer kemoterapi ajanlarına dirençli küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında böyle bir değişim gözlenmemiştir. Tümör tipleri arasındaki bu histolojik değişimin kaynağı kanserdeki temel heterojeniteden kaynaklanıyor olabilir. Bu durum da kemoterapi direncinde ve tümörlerde fenotip değişimlerinde rol oynayabilir.

Kanser kök hücre hipotezine göre tümör oluşumundan ve ilerlemesinden başlatıcı hücreler sorumludur. Bu hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma özelliği vardır. Kanser başlatıcı (kök) hücrelerin diğer bir özelliği çeşitli mekanizmalarla kemoterapi ajanlarına direnç göstermeleridir. Bu mekanizmalardan bazıları epitelyal-mezenşimal dönüşüm ve hücre zarında bulunan ve ilacı dışarı atan pompalardır ²¹⁴, ²¹⁵. Pekçok kanser tipinde kanser kök hücrelerinin tanımlanıp, izole edilmesinde kullanılan yaklaşımlardan biri Hoechst 33342 gibi lipofilik ve floresan boyaları dışarı atan pompalara sahip hücrelerin kullanılmasıdır. Bu pompalara sahip olup, boyayı dışarı atan hücreler yan populasyon hücrelerdir ve kanser kök hücresinin bir özelliği olan kemoterapi ajanlarına dirençle ilişkilendirilmişlerdir ²¹⁶. Akciğer kanser kök hücrelerini izole etmek için CD44, CD133, ALDH, Sca-1 gibi pek çok belirteç kullanılmıştır ²¹⁷⁻²²⁰. Ancak bu hücrelerin akciğerdeki yeri tam olarak belirlenememiştir. Kim ve arkadaşları farede CC10 ve SPC proteinlerini ifade eden BAKH'lerin hem bronş hem de alveol için kök hücreler olduğunu savunurken ²¹⁷, Rawlins ve arkadaşları BAKH'lerin çoğalma ve onarımda rol oynamadığını göstermiştir ²²¹. Başka bir çalışmada ise alveolar tip 2 hücrelerin alveolar epitelin öncülleri olduğu gösterilmiştir ²²². Bronşlarda bulunan Clara hücrelerinin kendini yenilediği ve silli hücrelere dönüşebildiği belirlenmiştir. Trakeada ise yine Clara hücreleri silli hücreleri oluşturmuş ancak kendini yenileme özelliğini kaybetmiştir ²²¹. Trakede Clara hücrelerinde oluşan hasarın ardından, bazal hücreler kök hücre görevini üstlenmiştir ancak trakeada bulunan silli hücreler hasara uğradığında sadece Clara hücreleri bölünmüştür ²²³. Bu durum trakede iki ayrı hücre populasyonunun da (Clara ve bazal hücreler) kök hücre özelliğine sahip olduğunu göstermektedir. Naftalin ile akciğer hasarı oluşturulmuş farede sağ kalan Clara hücreleri nöroendokrin hücrelerin etrafında ya da BADJlarda konumlanmıştır ²²⁴. Son yapılan bir çalışmada

CD44, SOX2, ALDH1 ve Sca-1'e sahip hücrelerin fare akciğerlerinde Clara hücrelerinin öncülü olabileceği belirtilmiştir ²²⁵.

Kök hücrelerde sağ kalım ve pluripotensinin korunmasını sağlayan yollardan biri NOTCH sinyal yolağıdır. Çalışmamızda erlotinib uygulanmış EGFR TKI dirençli ve duyarlı hücre hatlarında NOTCH3 ve etki ettiği diğer bir transkripsiyon faktörü HES1 ifade düzeylerine baktığımızda, sadece H1975 hücrelerinde NOTCH3'ün 9 gün 5 µM erlotinib uygulamasıyla arttığını, diğer hücre hatlarında genellikle azaldığını belirledik. Aynı patern NOTCH1'in etki ettiği HES1 transkripsiyon faktöründe de gözlenmiştir. Dolayısıyla NOTCH sinyal yolağının EGFR mutant KHDAC hücrelerinde ilaç direncinde etkili olmadığını düşünmekteyiz, ancak akciğer kanserinde yapılan bir başka çalışmada ALDH1 ifade eden hücrelerde NOTCH3 ifadesi de görülmüştür. Bunun adenokarsinom başlatıcı hücrelerin bir özelliği olabileceği belirtilmiştir ¹¹⁸.

İlaç direnci, tümörün gelişim ve büyüme kapasitesinin yeniden programlanmasında önemlidir. Prostat kanserinde, kemoterapi dirençli, CD177 ve ABCG2 pozitif hücrelerde SOX2, OCT4, NANOG, NESTİN ve CD133 ifadesi de gözlenmiştir ²²⁶. Hagerstrand ve arkadaşları glioblastoma hücrelerinde EGFR mutasyonu olan tümörlerin daha fazla SOX2 ifade ettiklerini ve bunun da tümörijenite ile ilişkili olduğunu, PDGF ve IGF-I hedefli terapilere dirençli olduğunu göstermişlerdir ²²⁷. Ayrıca tümör başlatıcı pankreas kanser hücrelerinde EGFR-Hedgehog/Gli sinyal yolağında SOX9'u uyardığı, bunun da onkojenik transformasyonla sonuçlandığı belirlenmiştir ^{228, 229}.

Bir pluripotensi transkripsiyon faktörü olan SOX2, akciğerde normalde basal ve Clara hücrelerinde ifade edilirken, uç hava yollarında ifade edilmemektedir ²³⁰. Bazal ve Clara hücreleri proksimal hava

yollarının öncül hücreleri olarak bilinmektedir. Alveolar tip II hücreler ise distal hava yollarında hasar sonrası ve kanser oluşumunda ilk çoğalan hücrelerdir. Bronşiyal epitelde hasar sonrası onarımda SOX2'nin indüklendiği gösterilmiştir ¹⁷⁰. Ayrıca erken gelişim evresinde SOX2'nin fazla ifade edilmesi akciğerde dallanma morfogenezini bozmakta ve neonatal ölüme neden olabilmektedir ¹⁷². Tümör genotipinin tümörü başlatan hücrelerin tanımlanmasında çok önemli olduğu bilinmektedir ²³¹. Belirli bir dokuda kök/öncül hücre belirtecinin bulunması, malign dönüşümün tanımlanmasında kuşkusuz faydalı bir yaklaşımdır. Bu nedenle çalışmamızda ilk olarak mutant EGFR sinyal yolağı uyarılmış 3 ve 9 haftalık farelerin akciğer dokularında EGFR sinyalleşmesine ve SOX2, OCT4 gibi pluripotensi faktörlerinin ifadesini araştırdığımızda, bu transkripsiyon faktörlerinin EGFR sinyalleşmesi ile uyarıldığını belirledik. EGFR yolağının aktifleşmesiyle birlikte STAT3 ve AKT aktivitesi artmış, AKT tarafından regüle edilen p-FOXO1/3 aktivitesi ise azalmıştır.

İmmünohistokimyasal olarak ALDH1 ve SOX2 ifade eden üreter hücre karsinomasında tümör başlatıcı hücrelerin agresif bir özelliği olan kötü prognozla ilişkilendirilmiştir ²³². Meme kanserinde SOX2'nin fazla ifadesi klinik olarak kötü prognoz ile bağlantılı bulunmuştur ²³³. SOX2'nin sessizleştirilmesi hücre döngüsünün durmasına, tümör oluşumunun ve CYCLIND1'in baskılanmasına neden olmuştur ²³⁴. SOX2 kolorektal kanser hücrelerinde susturulduğunda, mezenşimalden epitelyale geçiş olmuş, MMP2 ve WNT yolak aktivitesi azalmıştır. Ayrıca SOX2 ifadesi hücre göçü ve metastaz ile bağlantılı bulunmuştur ²³⁵.

SOX2'nin akciğer skuamöz hücre karsinomunda amplifiye olduğu ve proliferasyon, hücre göçü ve bir yüzeye bağımsız çoğalmada gerekli olduğu gösterilmiştir ^{91, 236-238}. Nakatsugawa ve arkadaşları SOX2 pozitif adenokarsinom hücrelerinin yan populasyon karakteristiği

gösterdiği ve daha fazla tümörjenik olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, SOX2'nin sessizleştirilmesi in vivo tümör oluşumunu engellemiştir ²³⁹. Benzer şekilde, Xiang ve arkadaşları yan populasyon hücrelerin daha fazla OCT4 ve SOX2 ifade ettiğini göstermiştir. Ayrıca SOX2'nin azalması akciğer kanserinde apoptoza neden olup, metastazı baskılamıştır ²⁴⁰. A549, KRAS mutant akciğer adenokarsinom hücrelerinde SOX2 shRNA kullanılarak downregüle edildiğinde tümörjenik kapasite ve c-MYC, WNT1, WNT2 ve NOTCH1 gibi kanser kök hücresiyle ilgili protein ifadeleri azalmıştır ²⁴¹. Buna karşın çalışmamızda xenograft modellerde HCC827 ve H1975 hücrelerinde SOX2 eksikliği in vivo tümör oluşumunu etkilememiştir. Bu durumun diğer çalışmalardan farklı olması hücrelerin genomik farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamıza benzer şekilde, SPC+ hücrelerde tamoksifen uygulamasından sonra KRASG12D indüklendiğinde, bronşioalveolar geçiş bölgelerinde ya da alveolide oluşan hiperplazi ya da adenom oluşumlarında SOX2 ifadesi gözlenmemiştir. Bu durum SOX2'nin adenokarsinom oluşumuyla ilgili olmadığını göstermiştir ²⁴². Bununla birlikte EGFR mutasyonu olan 28 adenokarsinom dokusunun %85.7'sinde SOX2 ifadesi gözlenmiştir. Ekzon 19 delesyonu olan adenokarsinomlularda ise daha fazla MET ifadesi ve daha az SOX2 ifadesi gözlenmiştir. Bu durum MET ifadesi ile SOX2 ifadesinin ters orantılı olduğunu göstermektedir ve genellikle EGFR mutasyonu olmayan tümörlerde gözlenmiştir ²⁴³. Çalışmamızda kullandığımız hücre hatları HCC827 ve HCC827 GR5'in farkı, HCC827 GR5 hücrelerinin MET amplifikasyonuna sahip olmalarıdır. HCC827 GR5 hücreleri çalışmamızda SOX2 proteinini ifade etmemiştir.

SOX2 geni, tümörün başlaması, farklılaşması ve ilerlemesinde pekçok mekanizmaya karışabilir. Dolayısıyla kanser gelişimi için önemli bir hedeftir. Ancak transkripsiyon faktörlerini hedeflemek oldukça güçtür. Bu nedenle transkripsiyon faktörlerinin ifadesini

düzenleyen sinyal yollarını hedeflemek, onların aktivitesini arttırmak ya da azaltmak daha mantıklı bir yaklaşımdır. Bizim çalışmamızda SOX2'nin sessizleştirilmesi mutant EGFR tümörigenezinde sadece TKI duyarlı hücre hattı HCC827 hücrelerinde proliferasyonu etkilemiş, ancak erlotinib ve triciribine cevabını etkilememiştir. H1975 TKI dirençli hücre hattında ise SOX2 eksikliği proliferasyon ya da ilaç yanıtını etkilememiştir.

Singh ve arkadaşlarının çalışmasında KHDAC hücre hatları H1650, H1975 ve A549'da yan populasyon hücreler seçilmiş ve bu populasyonun kendini yenileme ve sferoid oluşturma gibi yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu hücreler bağışıklık sistemi baskılanmış SCID fareye verildiğinde birincil ve metastatik tümör oluşturmuşlardır. Yan populasyon hücrelerinde OCT4, SOX2 ve NANOG gen ifadesinin daha fazla olduğu ve EMT özelliği gösterdikleri belirlenmiştir ²⁴⁴. Yan populasyon hücrelerde SRC ya da AKT geninin inhibe edilmesiyle kendini yenileme özelliğini kaybettikleri ve SOX2 ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. SOX2'nin siRNA aracılı baskılanması da yan populasyon hücrelerinde kendini yenileme kapasitesini engellemiştir. SOX2'nin KHDAC için EGFR/SCR/AKT sinyalleşmesinde hedef bir molekül olabileceği belirlenmiştir ²⁴⁴. Barr ve arkadaşları çeşitli akciğer kanser hücre hatlarını bir yıl süreyle cisplatin dirençli hale getirmiş ve bu sürenin ardından hücrelerde çeşitli genlerin ifade profillerine baktıklarında OCT4, NANOG, SOX2 gibi pluripotensi faktörlerinin ifadesinin arttığını gözlemlemişlerdir ²⁴⁵. Embriyonik kök hücrelerde pluripotensinin korunması için SOX2'nin OCT4 ile birlikte işlev gördüğü bilinmektedir. Nishi ve arkadaşlarının çalışmasında meme kanser hücrelerine OCT4, SOX2, KLF4 ve c-MYC genleri aktarıldığında, yeni oluşan hücrelerin daha tümörjenik olduğu ve kemoterapiye dirençli oldukları gösterilmiştir ²⁴⁶. Çalışmamızda EGFR mutant farelere 3 ve 9 hafta dox verip, EGFR sinyal yolağını aktifleştirdiğimizde SOX2 ifadesi ile birlikte OCT4 ifadesinin de arttığını belirledik. Deneyin bir başka aşamasında, erlotinib ile EGFR sinyal yolağı

inhibe edilmeye çalışılmış TKI duyarlı ve dirençli hücre hatlarında OCT4 ifadesi PC9 hücre hattı hariç, diğer hücrelerde ya aynı kalmış ya da azalmıştır. PC9 hücre hattında 9. gün 100 nM ve 2 μ M'da OCT4 ifadesi gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre OCT4 ifadesinin erlotinib uygulaması ile artması daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu iken, diğer hücre hatlarından elde edilen sonuçlar uyumsuz bulunmuştur. NANOG ifadesi ise H1975 hücrelerinde erlotinib uygulaması ile artmış, diğer hücrelerde artmamıştır. Bu durumun hücre hatlarının sahip olduğu diğer mutasyonlardan ve pluripotensiye kontrol eden hücresel pekçok faktörden kaynaklandığını düşünüyoruz.

Sonuçlarımıza göre kanser hücre yoğunluğu SOX2 ifadesi üzerinde çok önemli rol oynamaktadır. Örneğin H1975 hücre hattında hücrelerin yoğun olduğu durumda SOX2 ifadesi fazlayken, PC9 hücrelerinde hücre yoğunluğu azaldıkça SOX2 ifadesi artmaktadır. FBS ve glikoz yokluğu PC9 hücrelerinde SOX2 ifadesini azaltmış ancak FBS yokluğu H1975 hücrelerinde etkili olmamıştır. P-AMPK ve SOX2 ifadelerinin hücre yoğunluğuyla değişmesi oldukça ilginç olup, bu protein ifadelerinin hücresel strese etkilendiğini düşündürmüştür. Özellikle hücreler birbirinden uzaklaştıkça, FBS ya da glikoz yokluğunda artan p-AMPK aktivitesi hücrede stresin arttığının bir göstergesi olabilir. Ayrıca, AMPK'deki bu değişim SOX2 gen ifadesini etkilemiş olabilir. Dong ve arkadaşlarının çalışmasında AMPK düzenleyicisi LKB1, 2-deoksiglikoz ile uyarılmış ve KHDAK hücre hatlarında PI3K/AKT yolağının üyesi olan mTOR'u inhibe ederek hücre çoğalmasını durdurmuştur ²⁴⁷. Fare embriyonik ve insan fibroblastlarında yapılan bir çalışmada hücreler geriye farklılaştırılmadan önce metformin ya da A-769662 gibi AMPK aktivatörleriyle inkübe edildiğinde geriye farklılaşmanın engellendiği gösterilmiştir. P-AMPK aktivitesinin özellikle OCT4 ifadesi üzerinde olumsuz düzenleyici etkisinin olduğu belirlenmiştir ²⁴⁸. Çalışmamızda

H1975 hücrelerinde P-AMPK aktivitesiyle birlikte OCT4 ifadesi değişmese de, SOX2'nin azalması daha önce yapılan bu çalışmalarla paralellik göstermektedir.

SOX2 geni olmayan fare embriyolarında, nöral doku öncüllerinin de bulunduğu trofoektoderm oluşumu gözlenmemiştir ²⁴⁹. SOX2'nin baskılanması nöral progenitör hücre proliferasyonunun azalmasına neden olmuştur ²⁵⁰. SOX2'nin fazla ifadesi ise nöral progenitör hücrelerin proliferasyonlarında artışa ve nöral farklılaşmanın azalmasına neden olmuştur ^{176, 251}. SOX2'nin HMG ve serin amino asitlerince zengin bölgesinin EGFR ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Ancak bu bölgelerden HMG bölgesinin, SOX2 transaktivasyon aktivitesi için daha önemli olduğu belirtilmiştir. SOX2'nin nöral progenitör hücrelerde EGFR gen promotoruna bağlanabildiği ve EGFR ifadesini düzenlediği gösterilmiştir. Ayrıca nöral progenitör hücrelerde SOX2 adenovirüs aracılığı ile knockout edilmiş, koloni oluşumunun ve EGFR ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. Buna karşılık SOX2'nin fazla ifadesi, EGFR ifadesini ve kendini yenileme potansiyelini arttırmıştır. Nöral progenitör hücreler bir EGFR inhibitörü olan AG1478, PI3K inhibitörü LY294002 ve ERK1/2 inhibitörü U0126 ile inkübe edildiğinde koloni sayısında ve büyüklüğünde azalma gözlenmiştir. Bu durum EGFR'nin SOX2 ifadesini düzenlediğini göstermektedir ¹⁷⁶. Bununla birlikte SOX2 ve EGFR geni olmayan farelerin postnatal beyinde benzer defektler gözlenmiştir ²⁵². Nöral progenitör hücrelerde SOX2'nin EGFR'yi doğrudan regüle ettiği anlaşılmıştır. Biyoinformatik analizlerle EGFR geninde SOX2'nin bağlanabileceği özgün CTTTGTA dizisi bulunmuştur ¹⁷⁶.

SOX2'nin posttranslasyonel modifikasyona uğrayabildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Dong ve arkadaşları fare indüklenmiş

pluripotent kök hücrelerde AKT1'in SOX2'yi treonin 118'den fosforladığını ve bu değişimin transkripsiyonda SOX2 aktivitesini arttırdığını belirlemişlerdir. Ayrıca SOX2 fosforilasyonu ubiquitin aracılı yıkımı engellediği için protein kararlılığında önemlidir ²⁵³. Bununla birlikte fare hücrelerinde SOX2'nin lizin 247'den sumolasyonu DNA'ya bağlanma kapasitesini azaltarak, transkripsiyonel aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir ²⁵⁴. SOX2'nin lizin 75'den asetilasyonu ise çekirdek dışına atılmasını sağlamıştır. Bu asetilasyon engellendiğinde, SOX2 çekirdekte kalmakta ve hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmaya devam etmektedir ²⁵⁵. SOX2'nin kütle spektrometre analizleri, serin 249, 250 ve 251'den fosforlanabileceğini göstermiştir ²⁵⁶. Ancak bu değişimlerin biyolojik ve işlevsel görevinin ne olduğu henüz bilinmemektedir.

İndüklenmiş pluripotent hücreler ya da indüklenmiş pluripotent kanser hücreleri, SOX2, OCT4, KLF4 ve c-MYC gibi pluripotensi transkripsiyon faktörü cDNA'larının fibroblastlara ya da kanser hücrelerine aktarılmasıyla oluşturulur ^{257, 258}. Chen ve arkadaşlarının çalışmasında insan KHDAK ve KHAK doku örneklerinde SOX2'nin fazla ifade edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada A549 KHDAK hücreleri yan populasyonu elde edilmiş ve bu populasyonun SOX2, WNT1, WNT2, NOTCH1 ve c-MYC onkogenlerini daha fazla ifade ettiği belirlenmiştir. SOX2'nin A549 hücrelerinde sessizleştirilmesi NOD/SCID farede tümörjenik kapasitenin azalması ile sonuçlanmıştır ²⁴¹. Buna benzer olarak Xiang ve arkadaşlarının çalışmasında fare D121 hücrelerinde yan populasyon izole edilmiş ve bu hücrelerde SOX2 ve OCT4 düzeyi daha fazla bulunmuştur. SOX2'nin D121 hücrelerinde siRNA ile baskılanması kontrol hücrelerine göre apoptozisi arttırmıştır. SOX2 sessizleştirilmiş D121 hücreleri singenik C57BL/6 fareye aktarıldığında metastazın azaldığı görülmüştür ²⁴⁰. SOX2'nin küçük hücreli akciğer kanseri hastalarında %41 oranda ifade edildiği belirlenmiştir ²⁵⁹. Rudin ve arkadaşlarının çalışmasında ise insan

küçük hücreli akciğer kanseri örneklerinin %27'sinde SOX2 amplifikasyonu görülmüş ve SOX2'nin insan hücre hatlarında shRNA ile susturulmasının proliferasyonda azalmaya neden olduğu belirtilmiştir ²⁶⁰. SOX2'nin pankreas ²⁶¹ ve prostat ²⁶² kanserlerinde invazyon ve metastaz gibi önemli karsinogenik olaylarda rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca meme kanser hücrelerinde SOX2, WNT sinyal yolağının bir üyesi olan b-KATENİN ile birlikte, hücre proliferasyonunu ve tümörigenezi kontrol eden CCND1 gibi çeşitli genlerin transkripsiyonunu sağladığı gösterilmiştir ²³⁴. İnsan bazal meme kanserinde ise %43 oranda SOX2 ifadesi belirlenmiştir ²⁶³.

Gelişim aşamasında primer akciğer, önbağırsaktan köken almaktadır. SOX2, gelişim sırasında bir döngü içinde ilk akciğer oluşurken ifadelenmekte ancak dallanma morfogenezi başladığında ifadesi durmaktadır ²⁶⁴. Akciğerde dallanma olmayan bölgelerde fazla ifade edilirken, dallanan yerlerde ifade görülmemektedir. Bu durum, SOX2 ifade azalmasının akciğer epitelinin dallanmayı uyaran sinyallere cevabında önemli olduğunu göstermektedir. SOX2'nin sürekli ifadesinin dallanma sürecini bozduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu bulguların ardından SOX2'nin havayollarının dallanmasını engelleyen bir faktör olduğu ve hücreleri daha az farklılaşmış evrede bıraktığı belirtilmiştir ¹⁷².

Günümüzde pekçok EGFR TKI direnç mekanizmasını çözerken kullanılan ortak görüş, kanser hücresinin hücre içi sinyal yolaklarını devre dışı bırakabilecek çözümler geliştirmektir. EGFR hücresel sağkalım ve proliferasyon yolaklarını uyarmaktadır. Bunlardan en önemlisi PI3K/AKT sinyal yolağıdır ²⁶⁵. EGFR gibi RTK'ların fosforilasyonu PI3K'ın uyarılmasını, bu da PIP2'nin PIP3'e fosforillenmesini sağlar. PIP3'ün hücre zarında birikimi PDK1 ve AKT gibi proteinlerin aktifleşmesini sağlar. PDK1, AKT'yi fosforlar, AKT ise hücre

zarından ayrılıp çekirdek ve sitoplazmaya geçerek birçok hedef molekülü aktiveştirir. AKT, p53'ün negatif düzenleyicisi MDM2'yi fosforlayarak hücre sağ-kalımını düzenler. Ayrıca AKT proapoptotik BCL-2 ailesi üyelerinden BAD ve FOXO'yu fosforlayıp, inaktifleştirir. TSC kompleksinin negatif regülasyonu, AKT mTORC1'in aktiveşmesine neden olur. mTORC1, eIF4E'ye bağlanan proteinleri (4E-BP ve S6 kinazlar) regüle ederek, hücre çoğalması ve protein sentezini kontrol eder²⁶⁶.

Çalışmamızda TKI dirençli ve duyarlı hücrelerde triciribine ve LY29004 ile PI3K/AKT yolağının inhibisyonu sonucu p-AKT aktivitesinde azalış, bununla birlikte bir tümör baskılayıcı protein olan p-FOXO1/3 aktivitesine artış gözlenmiştir. Ayrıca PI3K/AKT inhibitörünün etkisiyle SOX2 ifadesinin de azalması, SOX2'nin PI3K/AKT yolağının etkisinde olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda beklendiği gibi p-AKT aktivitesi ise TKI duyarlı hücrelerde azalmış, dirençli hücrelerde aynı kalmıştır. HCC827 hücrelerinde PIK3CA mutant hale getirildiğinde hücreler gefitinibe dirençli hale gelmiştir. Bu bulgu erken evre klinik araştırmalar için önemlidir, çünkü pekçok klinik araştırmada EGFR inhibitörü ile beraber PI3K yolak inhibitörleri uygulanmaktadır²⁶⁷. Bu histolojik değişimin nedeni EGFR mutant tümörlerdeki pluripotensi ya da kanser kök hücreleri olabilir.

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı RAS/RAF/MEK yolağı gibi diğer hücrel sinyal yolakları ile de etkileşir. Örneğin AKT, RAF'ı baskılayabilir ya da ERK, RHEB aracılığıyla mTORC1'i aktiveştirebilir.²⁶⁸. RAS/RAF/MEK yolağı EGFR sinyalleşmesiyle aktiveşen diğer bir yolağıdır. Dolayısıyla PI3K inhibitörleri EGFR'nin hedeflerini tamamen inhibe edemeyebilir. Ercan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise geri dönüşümsüz EGFR inhibitörü olan WZ4002 ile T790M mutasyonu hedeflenmiş ancak ERK sinyalinin aşırı aktiveşmesi sonucu direnç

gelişmiştir. MEK ya da ERK'in inhibisyonu ile WZ4002'ye karşı tekrar duyarlılık gözlenmiştir ²⁶⁹.

MET amplifikasyonu ERBB3'ün fosforilasyonuna neden olmakta, bu da PI3K/AKT/mTOR yolağının sürekli aktif kalmasına yol açmaktadır. Bu dirençli durumda, EGFR tam olarak inhibe edilse dahi, PI3K/AKT/mTOR yolağı HGFR ve ERBB3 etkileşimi nedeniyle aktif kalmaktadır ²⁷⁰. EGFR mutant hücrelere MET ligandı olan hepatosit büyüme faktörü (HGF) verildiğinde gefitinibe direnç gelişmiştir ¹⁶⁷. Bu deneylerde HGF, HGFR'yi ERBB3 ve EGFR'den bağımsız olarak fosforlamış ve PI3K/AKT /mTOR yolağını aktive etmiştir. Başka bir çalışmada H1975 hücrelerinde HGF sinyalleşmesinin geri dönüşümsüz EGFR inhibitörlerine karşı da direnç gelişimine neden olduğu belirlenmiştir ²⁷¹.

Yamamoto ve arkadaşlarının çalışmasında 86 KHDAC hücre hattında ve 691 KHDAC tümörde PIK3CA mutasyonu ve kopya sayısı değişimleri araştırılmıştır. PIK3CA mutasyonu hücre hatlarının %4.7'sinde, tümör örneklerinin ise %3.1'inde görülmüştür. PIK3CA amplifikasyonu ise hücre hatlarının %9.3'ünde, tümör örneklerinin %17.1'inde görülmüştür ⁷⁵. PIK3CA'daki değişimlere ek olarak, PTEN geni de mutant ya da sessizleştirilmiş olabilmektedir. Jin ve arkadaşlarının çalışmasında 176 adet KHDAC tümör dokusunda %4.5 oranında PTEN mutasyonu görülürken ²⁷², başka bir çalışmada %73.5 oranında PTEN ifade kaybı gözlenmiştir ²⁷³. HCC827 hücrelerine mutant p110a geni aktarıldığında, gefitinibe karşı direnç gelişmiştir ²⁷⁴. PC9 hücreleri ise PTEN ifadesinin azalması ile gefitinib direnci gösterirken, H1650 hücrelerinde PTEN ifadesi gözlenmemiştir ²⁷⁵.

La monica ve arkadaşları EGFR ve mTOR inhibitör kombinasyonunun 11 KHDAK hücre hattında EGFR, KRAS, PI3K ve PTEN ifadesi üzerine etkilerini incelemiş ve gefitinibe duyarlı olan hücre hatlarının pS6K aktivitesinde düşüş gözlerken, dirençli olanlarda ise bir değişim belirlenmemişlerdir. Bu durum PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının gefitinib direnciyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Kombine tedavi ise 6 adet gefitinib dirençli hücre hattına uygulanmış bunlardan KRAS mutasyonu olan H460 ve SKMES-1 hücrelerinde ve p53 mutasyonu olan H1299 hücrelerinde sinerjik etki göstermiştir ²⁷⁶. Li ve arkadaşları rapamycin ve neratinibin kombine etkisini L858R ve T790M mutasyonu olan transgenik fare modelinde araştırmıştır. Neratinib tek ajan olarak periferik tümörlerde tümörün küçülmesini sağlarken, rapamycinle birlikte tüm tümörlerde küçülme gözlenmiştir. Rapamycin tek başına antitümörjenik bir etkiye sahip olmadığı, ayrıca erlotinib ile birlikte uygulandığında benzer sinerjinin gözlenmediği belirlenmiştir. Neratinib tek ajan olarak kullanıldığında EGFR kinaz aktivitesini tamamen engelleyememiş, p-AKT ve p-S6 fosforilasyonu değişmemiştir. Öte yandan neratinib rapamycin ile birlikte uygulandığında PI3K yolağı inhibe olmuştur ²⁷⁷.

Bu bilgiler göstermiştir ki, EGFR mutant tümörlerde, EGFR'nin yetersiz inhibisyonu ile hücre sağkalımı PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı ile uyarılabilir. mTOR'un baskılanması hücre proliferasyonunu azaltırken, apoptotik etki göstermemektedir. Başka bir çalışmada ise rapamycinin tek ajan olarak kullanılması AKT'nin fosforilasyonuna neden olmaktadır. Rapamycin ve analogları mTORC1'e bağlanmakta, mTORC2'yi etkilememektedir. Sadece mTORC1'in baskılanması mTORC2'nin serbest kalmasını ve yolağın daha da aktifleşmesine neden olmaktadır. mTORC2, AKT'yi fosforile ederek, apoptotik etkilerin azalmasını sağlamaktadır. Bu nedenle akciğer kanserinde mTORC1

inhibitörlerinin tek ajan olarak kullanımı başarısız olmuştur ²⁷⁸. PI3K inhibitörleri rapamycin ile birlikte uygulanırsa klinik açıdan daha anlamlı sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir. Örneğin, HER2 fazla ifade eden meme kanseri hastalarında PI3K ve mTORC1/2 ikili inhibitörü BEZ235 uygulandığında apoptozis uyarılırken, everolimus uygulamasında bu etki görülmemiştir ²⁷⁹. H1975 hücre hattına BEZ235 uygulandığında in vitro ve in vivo çoğalmayı durdurmuş ancak apoptozisi etkilememiştir. Ancak MEK inhibitörü selumetinib (AZD6244), BEZ235 ile birlikte uygulandığında H1975 xenograflarında apoptozis ve tümör küçülmesi görülmüştür ²⁸⁰. BEZ235'in MEK inhibitörü PD325901 ile birlikte uygulanmasının H1993 hücrelerinde proliferasyonu azalttığı belirlenmiştir. Bu kombinasyon c-MET inhibitörü PF2341066'nın tek ajan olarak kullanımından ya da BEZ235 ile birlikte kullanımından daha etkili olmuştur. Dolayısıyla MET amplifikasyonu olan tümörler için PI3K ve MEK inhibitörünün kombine kullanımı gerekebilmektedir ²⁸¹.

BIM (BCL2L11), Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesidir. Küçük hücreli akciğer kanserinde EGFR TKI uygulandığında, BIM aktivite artışı gözlenmektedir. Ancak Doğu Asyalıların %12'sinde BIM delesyonu belirlenmiştir. Bu durum, gefitinib ve erlotinib gibi TKI'ne direnç gelişimine neden olabilmektedir. Küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda bu polimorfizmi taşıyanlar, taşımayanlara göre TKI'ne daha az cevap vermektedir. Bir histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü olan vorinostat, BIM polimorfizmi olan EGFR mutant küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatlarına uygulanıp EGFR-TKI direnci kırılmaya çalışılmıştır. Vorinostat uygulaması BIM'in proapoptotik izoformu BH3'ün ifadesini arttırmış ve gefitinibe duyarlılığın artmasını sağlamıştır. Xenograft modellerde ise BIM polimorfizmi olmadığında gefitinib apoptozisi uyarmıştır. Gefitinib ve vorinostat kombinasyonu ise BIM polimorfizmi olduğunda da aynı şekilde apoptozisi uyarmış, tümörün küçülmesini sağlamıştır. HDAC inhibisyonu

epigenetik olarak BIM proteininin tekrar işlev görmesini sağlamış ve TKI'ne duyarlılık kazandırmıştır ²⁸². Bizim çalışmamızda ise yedi hafta dox verilip EGFR sinyalleşmesi uyarılan farelerde, 7 haftanın ardından 2 ve 5 gün normal besinle beslendiklerinde tümörlü akciğer dokularında p-EGFR sinyalleşmesindeki azalma ile birlikte, c-PARP ve BIM gibi apoptotik parametreler artmıştır. Bu durum mutant EGFR sinyalleşmesi kesildiğinde tümörde apoptozisin arttığını göstermektedir. Bununla birlikte hücresel proliferasyon yollarında etkili olan moleküllerden p-AKT beklenmedik bir şekilde artarken, p-ERK azalmıştır. P-IGF-1R, p-STAT3 ve p-S6 aktivitelerinin gruplar arasında anlamlı olmadığı görülmüştür.

Görüldüğü gibi hedefli terapilerde dahi hastalarda bir süre sonra kullanılan ajana direnç gelişebilmekte ve hasta tedaviden yarar sağlayamamaktadır. Bu direncin mekanizmasının farklı mutasyon tiplerine göre değişebileceği düşünülmektedir, ancak henüz kesin bir mekanizma tanımlanamamıştır. Tümörde EGFR inhibitörlerine direnç klonal seçilim nedeniyle de olabilir. Tümör hücre popülasyonu arasında bulunan bir grup hücre tümör oluşurken EGFR inhibitörlerine direnç sağlayacak mutasyonlara sahip olduğundan terapi uygulandıktan sonra sağ kalıyor olabilirler. Bu hipotezi doğrulayan başka bir görüş ise bir hastada birden fazla direnç mekanizmasının gelişmesidir. SOX2 gibi pluripotensi faktörlerinin tümörjenik dokularda rolünün araştırılması, kanser kök hücrelerinin bulunması ve ilaç direnci gibi durumlarda aydınlatıcı olabilmektedir ve elde edilen bilgiler ileride kanser hastaları için fayda sağlayabilecektir.

Hasta dokuları, geliştirdikleri direnç mekanizmaları için moleküler ve histolojik olarak ayrıntılı incelenmeli ve ayrıntılı dizi analizleri yapılmalıdır. Gelişen direnç, onkogen bağımlı tümörün heterojenitesinden kaynaklanabilmektedir. Tedavi başladığında hedeflenen molekülün

baskılanmasıyla tümör küçölse de, geride kalan hücreler daha yavaş çoğalan ve tümörün tekrar oluşmasını, rejenerasyonunu ve heterojenitesini sağlayan hücrelerdir. Yeni moleküler ve teknolojik gelişmeler akciğer kanserinde hedefli tedavi için bir umut ışığı olmaktadır. Kanserli hücrenin ayrıntılı dizi analizi ve tümörün moleküler profilinin çıkartılması tedavide büyük avantaj sağlayacaktır. Akciğer kanserinde olduğu gibi moleküler düzeyde tümör heterojenitesinin ve tümör direnç mekanizmalarının anlaşılması ile kanser terapisinde çok önemli adımların atılabileceğı düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ

Günümüzde akciğer kanseri hastalarının ortalama sağ kalım süreleri uzatılabilse de, bu hastalığı ortadan kaldıracı bir tedavi halen bulunamamıştır. Hastalar tedavi başladığında ilaca yanıt vermekte, ancak belirli bir süre sonra direnç geliştirmektedirler. Gelişen dirençin moleküler mekanizması hastaya göre değişim gösterebilmektedir. Son yıllarda kanserde pluripotensinin varlığı belirlenmiş ve özellikle ilaç direncindeki rolü önem kazanmıştır.

Çalışmamızda EGFR mutant küçük hücreli dışı akciğer kanser hücrelerinde ilaca yanıtta çeşitli pluripotensi transkripsiyon faktörlerinin ve bazı hücre yolaklarının rolünü araştırdık. EGFR TKI olarak kullandığımız erlotinib farklı zaman ve dozlarda EGFR mutant hücrelere uygulandığında SOX2 ifadesinin, hücre tipine, uygulanan zamana, doza ve hücrenin çoğaldığı ortama göre değişiklik gösterse de ilaca yanıtta önemli olabileceğini belirledik. Ayrıca in vivo çalışmalarımızda EGFR sinyal yolağı doksosiklin verildiğinde indüklenebilen CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerde SOX2'nin akciğer adenokarsinom gelişiminde rol aldığını gösterdik. EGFR mutant KHDAK hücre hatlarında SOX2 geni sessizleştirildiğinde hücre çoğalma hızının sadece HCC827 hücrelerinde değiştiğini, H1975 hücre hattında kontrol grubu ile aynı kaldığını belirledik. Bununla birlikte SOX2 geni susturulmuş hücrelerde erlotinib ve triciribine yanıtının kontrol grubuna göre farklılık göstermediğini belirledik. SOX2 eksikliğin tümör oluşumu üzerine etkisini çeşitli hücre konsantrasyonlarında xenograft deneylerinde araştırdığımızda tümör oluşum kapasitesinde kontrole göre anlamlı bir fark olmadığını gösterdik.

Kimyasal inhibitör çalışmalarımızla kanser hücrelerinin sağ kalım ve hücre çoğalması için gerekli sinyal yollarından biri olan PI3K/AKT sinyal yolağının SOX2 ifadesini düzenlediğini belirledik. LY290004 ve triciribine gibi PI3K/AKT yolak inhibitörlerinin SOX2 ifadesini azalttığını gösterdik. Bununla birlikte SOX2 ifadesinin hücre hattına bağlı olarak hücre yoğunluğundan etkilendiğini belirledik.

Çalışmamızda SOX2'nin etkilendiği hücresel yolları, SOX2'nin EGFR mutant KHDAK oluşumunda rolü olduğunu ancak hücre proliferasyonu ve ilaç direncinde etkili olmadığını gösterdik. SOX2 ve diğer pluripotensi faktörlerinin çeşitli kanser tiplerinde rolünün araştırılması, pluripotensi ve ilaç direnci ilişkisinin aydınlatılması açısından ileride kanser hastaları için daha uygun tedavi seçenekleri sağlayabilecektir.

7. ÖZET

EGFR Mutant Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Gelişiminde ve Kemoterapi Direncinde Çok Potansiyelliliğin Rolü

Erlotinib, EGFR mutant küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarında sağ kalımı uzatan bir tirozin kinaz inhibitörüdür (TKI). Hastalar 6-9 ay erlotinibe cevap vermekte ancak genellikle EGFR`de gelişen ikinci bir mutasyon ya da MET amplifikasyonu nedeniyle ilaca direnç gelişmektedir. SOX2, OCT4 ve NANOG gibi çeşitli pluripotensi transkripsiyon faktörlerinin ifadesinin görüldüğü diğer bir ilaç direnç mekanizması hücrenin farklılaşması ile gelişebilmektedir.

Bu çalışmada, CC10-EGFR L858R/T790M transgenik farelerde, doksisisiklin ile indüklenen mt-EGFR ifadesinin SOX2 ekspresyonu ile bağlantılı olduğunu gözledikten sonra, SOX2`nin akciğer tümörigenezinde ve ilaç direncinde etkili olup/olmadığını araştırdık. Öncelikle, EGFR mutant NSCLC hücre hatlarını erlotinib ile inkübe ettik. Erlotinib p-EGFR aktivitesini azaltırken, SOX2 ekspresyonu hücre hattı ve hücre kültürü koşullarına göre farklılık göstermiştir. EGFR TKI`ne duyarlı bir hücrede (HCC827) erlotinib, SOX2 ekspresyonunu azaltırken, duyarlı diğer hücrede (PC9) önce arttırıp, zamanla azaltmıştır. TKI dirençli NSCLC hücre hattı H1975`de erlotinib, SOX2 ekspresyonunu arttırmıştır. SOX2`nin fonksiyon çalışmaları için, hücreler SOX2 shRNA içeren lentivirusle enfekte edildi. SOX2`nin genetik inhibisyonu HCC827 hücrelerinde bazal proliferasyonu azaltırken, H1975 hücrelerinde etkilememiştir. Her iki hücre hattında da SOX2 eksikliği erlotinibe duyarlılığı etkilememiştir. Xenograft deneylerinde, shSOX2-HCC827 ve shSOX2-H1975 hücreleri, kontrollerle aynı büyüklükte ve sayıda tümör oluşturdu. PI3K/AKT yolağı EGFR TKI direnci ile ilişkili olabileceği için,

hücreler PI3K/AKT inhibitörleriyle inkübe edildi ve SOX2 ekspresyonunun doza ve zamana bağlı olarak azaldığı gözlemlendi. Ayrıca SOX2 ekspresyonunun tüm hücre hatlarında hücre yoğunluğundan etkilendiği belirlendi.

Sonuçta, çalışmamızda EGFR mutant NSCLC`de SOX2 ekspresyonunun PI3K/AKT yolağının kontrolü altında olduğunu ve hücre yoğunluğundan etkilendiği belirlenmiştir. Ancak mt-EGFR nedeniyle oluşan akciğer tümörlerinde ya da EGFR TKI kemoterapi direncinde SOX2`nin etkili olmadığını gözledik.

Anahtar kelimeler: KHDAK, EGFR, TKI, SOX2, PI3K/AKT

8. SUMMARY

The effects of pluripotency on tumor formation and chemotherapy resistance in EGFR mutant NSCLC

Erlotinib is an EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI) that prolongs overall survival in NSCLC patients whose tumors bear activating mutations in the EGFR kinase domain. Responders benefit for an average of 6-12 months yet ultimately progress, and the prognosis for metastatic disease remains grim. A common mechanism of resistance is through acquisition of secondary mutations in EGFR (primarily T790M) or met amplification. Another kind of drug resistance is associated with cellular differentiation state, and this can be influenced by the action of global pluripotency transcription factors such as SOX2, OCT4 and NANOG.

In a murine model of mutant EGFR-driven, TKI-resistant lung cancer, induction of mutant EGFR in the lung correlated with increased SOX2 levels in normal tissue, and SOX2 levels were further elevated in tumors, therefore we hypothesized SOX2 may play a role in lung tumorigenesis or TKI resistance in humans. To examine this, human NSCLC cell lines with EGFR mutations were treated with erlotinib and the expression of p-EGFR and SOX2 were examined. While erlotinib decreased p-EGFR as expected, it exerted differential effects on SOX2 expression that depended on the cell line and growth conditions used. In EGFR TKI-sensitive HCC827 cells, (EGFR amplification with E746_A750 del) erlotinib decreased SOX2 levels. In another EGFR TKI-sensitive cell line, PC9 (E746-A750 del), erlotinib initially increased SOX2 at 3d then decreased it at 9d. (Interestingly, if PC9 cells were switched to serum-free culture conditions erlotinib produced a sustained increase in SOX2 levels.) In TKI-resistant H1975 cells (L858R, T790M mut) erlotinib

increased SOX2 expression. To determine the importance of SOX2, cells were infected with lentivirus containing SOX2 shRNA. Knockdown of SOX2 decreased proliferation rate in HCC827 cells but failed to affect in H1975. Furthermore, SOX2 loss did not alter their sensitivity to erlotinib and triciribine. In a limiting cell dilution assay *in vivo*, HCC827 and H1975 cells with SOX2 knockdown formed tumors at the same rate as vector control cells when injected into immune deficient mice. Because sustained activation of the PI3K/Akt pathway is associated with EGFR TKI resistance, cells were treated with PI3K/AKT inhibitors and the effect on SOX2 was examined by immunoblot. PI3K/Akt inhibitors decreased SOX2 expression in a time-dependent manner. Furthermore, SOX2 expression was influenced by cell confluency in all the cell lines examined.

Taken together, our data suggests that SOX2 may be under the control of the PI3K/Akt pathway in EGFR mutant NSCLC and depend on cell density; however our data does not support a role for SOX2 in tumor formation or therapeutic resistance to EGFR TKIs.

Keywords: NSCLC, EGFR, TKI, SOX2, PI3K/AKT

9. KAYNAKLAR

1. Wistuba II and Gazdar AF, Lung cancer preneoplasia. Annu Rev Pathol-Mech, 2006. 1(1): 331-348.
2. Sekido Y, Fong KM, and Minna JD, Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. Bba-Rev Cancer, 1998. 1378(1): F21-F59.
3. Nowell PC, Citation Classic - the Clonal Evolution of Tumor-Cell Populations. Cc/Life Sci, 1988(18): 19-19.
4. Hanahan D and Weinberg RA, The hallmarks of cancer. Cell, 2000. 100(1): 57-70.
5. Hanahan D and Weinberg RA, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell, 2011. 144(5): 646-674.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, and Pisani P, Global cancer statistics, 2002. Ca-Cancer J Clin, 2005. 55(2): 74-108.
7. Gönügür U GT, Akciğer kanseri olgusunun geriye dönük analizi. Solunum Hastalıkları, 2008. 19: 89-94.
8. Tuncer M, *Türkiye'de kanser kontrolü*. Vol. 1. 2007: Sağlık Bakanlığı.
9. Siegel R, Naishadham D, and Jemal A, Cancer Statistics, 2012. Ca-Cancer J Clin, 2012. 62(1): 10-29.
10. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, and Forman D, Global Cancer Statistics. Ca-Cancer J Clin, 2011. 61(2): 69-90.
11. Akkoçlu A ÖC, *Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım*1999: Bilimsel Tıp Yayınevi. 17-26.
12. Akkoçlu A, Atıkcın S, Aysan T, Bayız H, Celik M, Celik P, et al., Pattern of lung cancer in Turkey, 1994-1998. Respiration, 2002. 69(3): 207-210.

13. Scagliotti GV, Longo M, and Novello S, Nonsmall cell lung cancer in never smokers. *Curr Opin Oncol*, 2009. 21(2): 99-104.
14. Brenner DR, McLaughlin JR, and Hung RJ, Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2011. 6(3): e17479.
15. Hubaux R, Becker-Santos DD, Enfield KS, Lam S, Lam WL, and Martinez VD, Arsenic, asbestos and radon: emerging players in lung tumorigenesis. *Environmental health : a global access science source*, 2012. 11(1): 89.
16. Hecht SS, Carcinogen biomarkers for lung or oral cancer chemoprevention trials. *IARC scientific publications*, 2001. 154: 245-55.
17. Dela Cruz CS, Tanoue LT, and Matthay RA, Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*, 2011. 32(4): 605-44.
18. Gazdar AF, Should we continue to use the term non-small-cell lung cancer? *Annals of Oncology*, 2010. 21: 225-229.
19. Spiro SG and Porter JC, Lung cancer - Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2002. 166(9): 1166-1196.
20. Evans WK, Combination Chemotherapy Confers Modest Survival Advantage in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung-Cancer - Report of a Canadian Multicenter Randomized Trial. *Semin Oncol*, 1988. 15(6): 42-45.
21. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, et al., Tobacco and cancer: Recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer I*, 2004. 96(2): 99-106.
22. Stellman SD, Muscat JE, Thompson S, Hoffmann D, and Wynder EL, Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking. *Cancer*, 1997. 80(3): 382-388.

23. Akopyan G and Bonavida B, Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis (Review). *International journal of oncology*, 2006. 29(4): 745-752.
24. Hoffmann D, Djordjevic MV, Rivenson A, Zang E, Desai D, and Amin S, A Study of Tobacco Carcinogenesis .51. Relative Potencies of Tobacco-Specific N-Nitrosamines as Inducers of Lung-Tumors in a/J Mice. *Cancer letters*, 1993. 71(1-3): 25-30.
25. Westra WH, Slebos RJC, Offerhaus GJA, Goodman SN, Evers SG, Kensler TW, et al., K-Ras Oncogene Activation in Lung Adenocarcinomas from Former Smokers - Evidence That K-Ras Mutations Are an Early and Irreversible Event in the Development of Adenocarcinoma of the Lung. *Cancer*, 1993. 72(2): 432-438.
26. Denissenko MF, Pao A, Tang MS, and Pfeifer GP, Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, 1996. 274(5286): 430-432.
27. Loeb LA, Ernster VL, Warner KE, Abbotts J, and Laszlo J, Smoking and Lung-Cancer - an Overview. *Cancer Research*, 1984. 44(12): 5940-5958.
28. Pisani P, Bray F, and Parkin DM, Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *International Journal of Cancer*, 2002. 97(1): 72-81.
29. Rudin CM, Avila-Tang E, and Samet JM, Lung Cancer in Never Smokers: A Call to Action. *Clinical Cancer Research*, 2009. 15(18): 5622-5625.
30. Sun S, Schiller JH, and Gazdar AF, Lung cancer in never smokers - a different disease. *Nature Reviews Cancer*, 2007. 7(10): 778-790.
31. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, Clarke CA, et al., Lung cancer incidence in never smokers. *Journal of Clinical Oncology*, 2007. 25(5): 472-478.
32. Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, and Colditz GA, Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tob Control*, 2008. 17(3): 198-204.

33. Yang P, Lung Cancer in Never Smokers. *Sem Resp Crit Care M*, 2011. 32(1): 10-21.
34. Gorlova OY, Weng SF, Zhang YQ, Amos CI, and Spitz MR, Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, 2007. 121(1): 111-118.
35. Dela Cruz CS, Tanoue LT, and Matthay RA, Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*, 2011. 32(4): 605-+.
36. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al., EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *P Natl Acad Sci USA*, 2004. 101(36): 13306-13311.
37. Toh CK, Gao F, Lim WT, Leong SS, Fong KW, Yap SP, et al., Never-smokers with lung cancer: Epidemiologic evidence of a distinct disease entity. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. 24(15): 2245-2251.
38. Nordquist LT, Simon GR, Cantor A, Alberts WM, and Bepler G, Improved survival in never-smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung. *Chest*, 2004. 126(2): 347-351.
39. Amos CI, Wu XF, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al., Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nature Genetics*, 2008. 40(5): 616-622.
40. Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, et al., A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*, 2008. 452(7187): 633-637.
41. Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, et al., A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*, 2008. 452(7187): 638-42.

42. Rafnar T, Sulem P, Besenbacher S, Gudbjartsson DF, Zanon C, Gudmundsson J, et al., Genome-Wide Significant Association Between a Sequence Variant at 15q15.2 and Lung Cancer Risk. *Cancer Research*, 2011. 71(4): 1356-1361.
43. Broderick P, Wang YF, Vijayakrishnan J, Matakidou A, Spitz MR, Eisen T, et al., Deciphering the Impact of Common Genetic Variation on Lung Cancer Risk: A Genome-Wide Association Study. *Cancer Research*, 2009. 69(16): 6633-6641.
44. Sekido Y, Fong KM, and Minna JD, Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med*, 2003. 54: 73-87.
45. Larsen JE and Minna JD, Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Clin Chest Med*, 2011. 32(4): 703-+.
46. Weir BA, Woo MS, Getz G, Perner S, Ding L, Beroukhi R, et al., Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*, 2007. 450(7171): 893-U22.
47. Weinstein IB, Cancer: Addiction to oncogenes - The Achilles heel of cancer. *Science*, 2002. 297(5578): 63-64.
48. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, et al., The ErbB receptors and their ligands in cancer: An overview. *Curr Drug Targets*, 2005. 6(3): 243-257.
49. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Di Maria MV, Veve R, Bremnes RM, et al., Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: Correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 2003. 21(20): 3798-3807.
50. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New Engl J Med*, 2004. 350(21): 2129-2139.
51. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al., EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004. 304(5676): 1497-1500.

52. Pao W and Chmielecki J, Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2010. 10(11): 760-74.
53. Sordella R, Bell DW, Haber DA, and Settleman J, Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*, 2004. 305(5687): 1163-1167.
54. Gazdar AF, Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 2009. 28: S24-S31.
55. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan QL, Ladanyi M, et al., KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *Plos Med*, 2005. 2(1): 57-61.
56. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al., Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *Plos Med*, 2005. 2(3): 225-235.
57. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song YC, Hyland C, Park JO, et al., MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, 2007. 316(5827): 1039-1043.
58. Hong DS, Angelo LS, and Kurzrock R, Interleukin-6 and its receptor in cancer - Implications for translational therapeutics. *Cancer*, 2007. 110(9): 1911-1928.
59. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al., The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*, 2005. 92(1): 131-9.
60. Downward J, Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 2003. 3(1): 11-22.
61. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al., KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *Plos Med*, 2005. 2(1): e17.

62. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al., Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(18): 5731-4.
63. Adjei AA, K-ras as a target for lung cancer therapy. *Journal of Thoracic Oncology*, 2008. 3(6): S160-S163.
64. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002. 417(6892): 949-954.
65. Krystal G, Birrer M, Way J, Nau M, Sausville E, Thompson C, et al., Multiple Mechanisms for Transcriptional Regulation of the Myc Gene Family in Small-Cell Lung-Cancer. *Molecular and cellular biology*, 1988. 8(8): 3373-3381.
66. Adhikary S and Eilers M, Transcriptional regulation and transformation by MYC proteins. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2005. 6(8): 635-645.
67. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al., Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007. 448(7153): 561-U3.
68. Solomon B, Varella-Garcia M, and Camidge DR, ALK Gene Rearrangements A New Therapeutic Target in a Molecularly Defined Subset of Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2009. 4(12): 1450-1454.
69. Engelman JA, Luo J, and Cantley LC, The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 2006. 7(8): 606-619.
70. Vanhaesebroeck B and Waterfield MD, Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Experimental cell research*, 1999. 253(1): 239-254.
71. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJC, Frech M, et al., Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(50): 31515-31524.

72. Feng JH, Park J, Cron P, Hess D, and Hemmings BA, Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(39): 41189-41196.
73. Hill MM, Feng JH, and Hemmings BA, Identification of a plasma membrane raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. *Current Biology*, 2002. 12(14): 1251-1255.
74. West KA, Linnoila IR, Belinsky SA, Harris CC, and Dennis PA, Tobacco carcinogen-induced cellular transformation increases activation of the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt pathway in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 2004. 64(2): 446-451.
75. Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood WW, Sato M, Okumura N, et al., PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Research*, 2008. 68(17): 6913-6921.
76. Vazquez F and Sellers WR, The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Bba-Rev Cancer*, 2000. 1470(1): M21-M35.
77. Maehama T and Dixon JE, The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(22): 13375-13378.
78. Hay N, The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer cell*, 2005. 8(3): 179-183.
79. Dancey J, mTOR signaling and drug development in cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 2010. 7(4): 209-19.
80. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, et al., Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 2004. 6(11): 1122-U30.
81. Nave BT, Ouwers DM, Withers DJ, Alessi DR, and Shepherd PR, Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J*, 1999. 344: 427-431.

82. Inoki K, Li Y, Zhu TQ, Wu J, and Guan KL, TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, 2002. 4(9): 648-657.
83. Zhang Y, Gao XS, Saucedo LJ, Ru BG, Edgar BA, and Pan DJ, Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nature Cell Biology*, 2003. 5(6): 578-581.
84. Vander Haar E, Lee S, Bandhakavi S, Griffin TJ, and Kim DH, Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology*, 2007. 9(3): 316-U126.
85. Inoki K, Ouyang H, Zhu TQ, Lindvall C, Wang Y, Zhang XJ, et al., TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 2006. 126(5): 955-968.
86. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, and Avruch J, Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(23): 14484-14494.
87. Gingras AC, Raught B, and Sonenberg N, mTOR signaling to translation. *Curr Top Microbiol*, 2003. 279: 169-197.
88. Brognard J, Clark AS, Ni YC, and Dennis PA, Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Research*, 2001. 61(10): 3986-3997.
89. Garraway LA and Sellers WR, Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2006. 6(8): 593-602.
90. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu SY, Perner S, Verhaak RG, et al., SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature Genetics*, 2009. 41(11): 1238-U105.
91. Yuan P, Kadara H, Behrens C, Tang X, Woods D, Solis LM, et al., Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. *PLoS One*, 2010. 5(2): e9112.

92. Kwei KA, Kim YH, Girard L, Kao J, Pacyna-Gengelbach M, Salari K, et al., Genomic profiling identifies TTF1 as a lineage-specific oncogene amplified in lung cancer. *Oncogene*, 2008. 27(25): 3635-3640.
93. Bingle CD, Thyroid transcription factor-1. *Int J Biochem Cell B*, 1997. 29(12): 1471-1473.
94. Ikeda K, Clark JC, Shawwhite JR, Stahlman MT, Boutell CJ, and Whitsett JA, Gene Structure and Expression of Human Thyroid Transcription Factor-I in Respiratory Epithelial-Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270(14): 8108-8114.
95. Kendall J, Liu Q, Bakleh A, Krasnitz A, Nguyen KCQ, Lakshmi B, et al., Oncogenic cooperation and coamplification of developmental transcription factor genes in lung cancer. *P Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(42): 16663-16668.
96. Winslow MM, Dayton TL, Verhaak RGW, Kim-Kiselak C, Snyder EL, Feldser DM, et al., Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. *Nature*, 2011. 473(7345): 101-U120.
97. Yuan P, Kadara H, Behrens C, Tang XM, Woods D, Solis LM, et al., Sex Determining Region Y-Box 2 (SOX2) Is a Potential Cell-Lineage Gene Highly Expressed in the Pathogenesis of Squamous Cell Carcinomas of the Lung. *PLoS One*, 2010. 5(2).
98. Breuer RHJ, Postmus PE, and Smit EF, Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration*, 2005. 72(3): 313-330.
99. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, and Harris CC, Mutations in the P53 Tumor-Suppressor Gene - Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Research*, 1994. 54(18): 4855-4878.
100. Ventura A, Kirsch DG, Mclaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, et al., Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 2007. 445(7128): 661-665.
101. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Kasugai T, Ishiguro S, et al., MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: Immunohistochemical expression of its

protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Brit J Cancer*, 1997. 75(9): 1302-1308.

102. Vonlanthen S, Heighway J, Tschan MP, Borner MM, Altermatt HJ, Kappeler A, et al., Expression of p16INK4a/p16 alpha and p19ARF/p16 beta is frequently altered in non-small cell lung cancer and correlates with p53 overexpression. *Oncogene*, 1998. 17(21): 2779-2785.
103. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, and Hara E, The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *The journal of medical investigation : JMI*, 2004. 51(3-4): 146-53.
104. Harbour JW, Lai SL, Whangpeng J, Gazdar AF, Minna JD, and Kaye FJ, Abnormalities in Structure and Expression of the Human Retinoblastoma Gene in Sclc. *Science*, 1988. 241(4863): 353-357.
105. Otterson GA, Kratzke RA, Coxon A, Kim YW, and Kaye FJ, Absence of P16(Ink4) Protein Is Restricted to the Subset of Lung-Cancer Lines That Retains Wildtype Rb. *Oncogene*, 1994. 9(11): 3375-3378.
106. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, et al., A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jegheus syndrome. *Nature*, 1998. 391(6663): 184-187.
107. Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Esteller M, Nomoto S, Trink B, Engles JM, et al., Inactivation of LKB1/STK11 is a common event in adenocarcinomas of the lung. *Cancer Research*, 2002. 62(13): 3659-3662.
108. Carretero J, Medina PP, Pio R, Montuenga LM, and Sanchez-Cespedes M, Novel and natural knockout lung cancer cell lines for the LKB1/STK11 tumor suppressor gene. *Oncogene*, 2004. 23(22): 4037-4040.
109. Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y, et al., Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*, 2007. 26(40): 5911-5918.

110. Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kasmalka M, Depinho RA, et al., The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer cell*, 2004. 6(1): 91-99.
111. Knight DA and Holgate ST, The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 2003. 8(4): 432-446.
112. Giangreco A, Arwerta EN, Rosewell IR, Snyder J, Watt FM, and Stripp BR, Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury. *P Natl Acad Sci USA*, 2009. 106(23): 9286-9291.
113. Rawlins EL and Hogan BLM, Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development*, 2006. 133(13): 2455-2465.
114. Nakajima M, Kawanami O, Jin E, Ghazizadeh M, Honda M, Asano G, et al., Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathology international*, 1998. 48(12): 944-953.
115. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, and Stripp BR, In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am J Physiol-Lung C*, 2004. 286(4): L643-L649.
116. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al., Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *P Natl Acad Sci USA*, 2009. 106(31): 12771-12775.
117. Barth PJ, Koch S, Muller B, Unterstab F, Von Wichert P, and Moll R, Proliferation and number of Clara cell 10-kDa protein (CC10)-reactive epithelial cells and basal cells in normal, hyperplastic and metaplastic bronchial mucosa. *Virchows Arch*, 2000. 437(6): 648-655.
118. Sullivan JP, Minna JD, and Shay JW, Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. 29(1): 61-72.

119. Boers JE, Ambergen AW, and Thunnissen FBJM, Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1999. 159(5): 1585-1591.
120. Buckpitt A, Chang AM, Weir A, Vanwinkle L, Duan XZ, Philpot R, et al., Relationship of Cytochrome-P450 Activity to Clara Cell Cytotoxicity .4. Metabolism of Naphthalene and Naphthalene Oxide in Microdissected Airways from Mice, Rats, and Hamsters. *Mol Pharmacol*, 1995. 47(1): 74-81.
121. Reynolds SD, Hong KU, Giangreco A, Mango GW, Guron C, Morimoto Y, et al., Conditional Clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Physiol-Lung C*, 2000. 278(6): L1256-L1263.
122. Reynolds SD, Giangreco A, Power JHT, and Stripp BR, Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *American Journal of Pathology*, 2000. 156(1): 269-278.
123. Turrisi AT and Sherman CA, The treatment of limited small cell lung cancer: a report of the progress made and future prospects. *European Journal of Cancer*, 2002. 38(2): 279-291.
124. Giangreco A, Groot KR, and Janes SM, Lung cancer and lung stem cells - Strange bedfellows? *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2007. 175(6): 547-553.
125. Reddy R, Buckley S, Doerken M, Barsky L, Weinberg K, Anderson KD, et al., Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells. *Am J Physiol-Lung C*, 2004. 286(4): L658-L667.
126. Giangreco A, Reynolds SD, and Stripp BR, Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *American Journal of Pathology*, 2002. 161(1): 173-182.
127. Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al., Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 2005. 121(6): 823-835.

128. Wicha MS, Liu SL, and Dontu G, Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift. *Cancer Research*, 2006. 66(4): 1883-1890.
129. Passegue E, Wagner EF, and Weissman IL, JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell*, 2004. 119(3): 431-443.
130. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, and Weissman IL, Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001. 414(6859): 105-111.
131. Wang JCY and Dick JE, Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*, 2005. 15(9): 494-501.
132. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Cacerescortes J, et al., A Cell Initiating Human Acute Myeloid-Leukemia after Transplantation into Scid Mice. *Nature*, 1994. 367(6464): 645-648.
133. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al., Highly tumorigenic lung cancer CD133(+) cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *P Natl Acad Sci USA*, 2009. 106(38): 16281-16286.
134. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing LX, et al., Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Tumor Stem Cell-Associated Marker in Lung Cancer. *Mol Cancer Res*, 2009. 7(3): 330-338.
135. Kitamura H, Okudela K, Yazawa T, Sato H, and Shimoyamada H, Cancer stem cell: Implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. *Lung Cancer*, 2009. 66(3): 275-281.
136. Ho MM, Ng AV, Lam S, and Hung JY, Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Research*, 2007. 67(10): 4827-4833.
137. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al., Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation*, 2008. 15(3): 504-514.

138. Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, et al., A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2001. 98(4): 1166-1173.
139. Sullivan JP, Spinola M, Dodge M, Raso MG, Behrens C, Gao BN, et al., Aldehyde Dehydrogenase Activity Selects for Lung Adenocarcinoma Stem Cells Dependent on Notch Signaling. *Cancer Research*, 2010. 70(23): 9937-9948.
140. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. 282(5391): 1145-1147.
141. Daniel VC, Peacock CD, and Watkins DN, Developmental signalling pathways in lung cancer. *Respirology*, 2006. 11(3): 234-240.
142. Riobo NA, Ke L, and Emerson CP, Hedgehog signal transduction - Signal integration and cross talk in development and cancer. *Cell Cycle*, 2006. 5(15): 1612-1615.
143. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang BL, Beachy PA, and Baylin SB, Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 2003. 422(6929): 313-317.
144. Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, et al., Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 2007. 26(7): 1046-1055.
145. Politi K, Feirt N, and Kitajewski J, Notch in mammary gland development and breast cancer. *Seminars in cancer biology*, 2004. 14(5): 341-347.
146. Sansone P, Storci G, Tavoroli S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, et al., IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *The Journal of clinical investigation*, 2007. 117(12): 3988-4002.
147. You L, He B, Xu ZD, Uematsu K, Mazieres J, Mikami I, et al., Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell

- death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*, 2004. 23(36): 6170-6174.
148. Uematsu K, He BA, You L, Xu ZD, McCormick F, and Jablons DM, Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene*, 2003. 22(46): 7218-7221.
 149. Hynes NE and Lane HA, ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors (vol 5, pg 341, 2005). *Nature Reviews Cancer*, 2005. 5(7).
 150. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, Mclellan MD, Cibulskis K, et al., Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 2008. 455(7216): 1069-1075.
 151. Chitale D, Gong Y, Taylor BS, Broderick S, Brennan C, Somwar R, et al., An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors. *Oncogene*, 2009. 28(31): 2773-2783.
 152. Yun CH, Boggon TJ, Li YQ, Woo MS, Greulich H, Meyerson M, et al., Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: Mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer cell*, 2007. 11(3): 217-227.
 153. Mulloy R, Ferrand A, Kim Y, Sordella R, Bell DW, Haber DA, et al., Epidermal growth factor receptor mutants from human lung cancers exhibit enhanced catalytic activity and increased sensitivity to gefitinib. *Cancer Research*, 2007. 67(5): 2325-2330.
 154. Gong YX, Somwar R, Politi K, Balak M, Chmielecki J, Jiang XJ, et al., Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. *Plos Med*, 2007. 4(10): 1655-1668.
 155. Pao W and Chmielecki J, Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2010. 10(11): 760-774.
 156. Marks JL, Broderick S, Zhou Q, Chitale D, Li AR, Zakowski MF, et al., Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS

mutations in resected lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 2008. 3(2): 111-116.

157. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, et al., Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2003. 21(12): 2237-2246.
158. Eisenhauer EA and Verweij J, New response evaluation criteria in solid tumors: RECIST GUIDELINE VERSION 1.1. *Ejc Suppl*, 2009. 7(2): 5-5.
159. Greulich H, Chen TH, Feng W, Janne PA, Alvarez JV, Zappaterra M, et al., Oncogenic transformation by inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutants. *Plos Med*, 2005. 2(11): 1167-1176.
160. Kawano O, Sasaki H, Endo K, Suzuki E, Haneda H, Yukiue H, et al., PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer*, 2006. 54(2): 209-215.
161. Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, et al., PTEN Loss Contributes to Erlotinib Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer by Activation of Akt and EGFR. *Cancer Research*, 2009. 69(8): 3256-3261.
162. Sharma SV, Lee DY, Li BH, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al., A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell*, 2010. 141(1): 69-80.
163. Gong YX, Yao E, Shen RL, Goel A, Arcila M, Teruya-Feldstein J, et al., High Expression Levels of Total IGF-1R and Sensitivity of NSCLC Cells In Vitro to an Anti-IGF-1R Antibody (R1507). *PLoS One*, 2009. 4(10).
164. Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ, and Meyerson M, Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Research*, 2002. 62(23): 7001-7003.
165. Pratilas CA, Hanrahan AJ, Halilovic E, Persaud Y, Soh J, Chitale D, et al., Genetic Predictors of MEK Dependence in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 2008. 68(22): 9375-9383.

166. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al., Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. 27(26): 4247-4253.
167. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, et al., Hepatocyte Growth Factor Induces Gefitinib Resistance of Lung Adenocarcinoma with Epidermal Growth Factor Receptor-Activating Mutations. *Cancer Research*, 2008. 68(22): 9479-9487.
168. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, et al., EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New Engl J Med*, 2005. 352(8): 786-792.
169. Que JW, Luo XY, Schwartz RJ, and Hogan BLM, Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development*, 2009. 136(11): 1899-1907.
170. Park KS, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, et al., Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2006. 34(2): 151-157.
171. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, and Lovell-Badge R, Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development*, 2003. 17(1): 126-140.
172. Gontan C, De Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, and Rottier R, Sox2 is important for two crucial processes in lung development: Branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Developmental biology*, 2008. 317(1): 296-309.
173. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JR, et al., Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005. 122(6): 947-956.
174. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al., A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif. *Nature*, 1990. 346(6281): 240-244.

175. Nowling TK, Johnson LR, Wiebe MS, and Rizzino A, Identification of the transactivation domain of the transcription factor Sox-2 and an associated co-activator. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(6): 3810-3818.
176. Hu QK, Zhang LR, Wen JH, Wang SL, Li MY, Feng RP, et al., The Egf Receptor-Sox2-Egf Receptor Feedback Loop Positively Regulates the Self-Renewal of Neural Precursor Cells. *Stem Cells*, 2010. 28(2): 279-286.
177. Ishii Y, Rex M, Scotting PJ, and Yasugi S, Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: Regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Dev Dynam*, 1998. 213(4): 464-475.
178. Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Wert SE, Keiser AR, Smith AN, et al., Sox2 Is Required for Maintenance and Differentiation of Bronchiolar Clara, Ciliated, and Goblet Cells. *PLoS One*, 2009. 4(12).
179. Takahashi K and Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): 663-676.
180. Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Muller F, et al., Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC cancer*, 2011. 11.
181. Gangemi RMR, Griffero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, et al., SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity. *Stem Cells*, 2009. 27(1): 40-48.
182. Bae KM, Su Z, Frye C, McClellan S, Allan RW, Andrejewski JT, et al., Expression of Pluripotent Stem Cell Reprogramming Factors by Prostate Tumor Initiating Cells. *J Urology*, 2010. 183(5): 2045-2053.
183. Xu XL, Xing BC, Han HB, Zhao W, Hu MH, Xu ZL, et al., The properties of tumor-initiating cells from a hepatocellular carcinoma patient's primary and recurrent tumor. *Carcinogenesis*, 2010. 31(2): 167-174.

184. Wang JL, Rao S, Chu JL, Shen XH, Levasseur DN, Theunissen TW, et al., A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 2006. 444(7117): 364-368.
185. Kim J, Chu JL, Shen XH, Wang JL, and Orkin SH, An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells (vol 132, pg 1049, 2008). *Cell*, 2008. 133(7): 1290-1290.
186. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. 131(5): 861-872.
187. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo HG, Ince TA, et al., Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008. 451(7175): 141-U1.
188. Soria JC, Mok TS, Cappuzzo F, and Janne PA, EGFR-mutated oncogene-addicted non-small cell lung cancer: current trends and future prospects. *Cancer treatment reviews*, 2012. 38(5): 416-30.
189. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, and Collins VP, Amplified and Rearranged Epidermal Growth-Factor Receptor Genes in Human Glioblastomas Reveal Deletions of Sequences Encoding Portions of the N-Terminal and or C-Terminal Tails. *P Natl Acad Sci USA*, 1992. 89(10): 4309-4313.
190. Mendelsohn J and Baselga J, The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*, 2000. 19(56): 6550-6565.
191. Ji HB, Li DN, Chen L, Shimamura T, Kobayashi S, Mcnamara K, et al., The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer cell*, 2006. 9(6): 485-495.
192. Zhang XW, Gureasko J, Shen K, Cole PA, and Kuriyan J, An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 2006. 125(6): 1137-1149.
193. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al., Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *New Engl J Med*, 2009. 361(10): 947-957.

194. Riely GJ, Pao W, Pham DK, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, et al., Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clinical Cancer Research*, 2006. 12(3): 839-844.
195. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al., Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 2001. 293(5531): 876-880.
196. Clark J, Cools J, and Gilliland DG, EGFR inhibition in non-small cell lung cancer: Resistance, once again, rears its ugly head. *Plos Med*, 2005. 2(3): 195-197.
197. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, et al., The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *P Natl Acad Sci USA*, 2008. 105(6): 2070-2075.
198. Godin-Heymann N, Bryant I, Rivera MN, Ulkus L, Bell DW, Riese DJ, et al., Oncogenic activity of epidermal growth factor receptor kinase mutant alleles is enhanced by the T790M drug resistance mutation. *Cancer Research*, 2007. 67(15): 7319-7326.
199. Hurbin A, Wislez M, Busser B, Antoine M, Tenaud C, Rabbe N, et al., Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma. *Journal of Pathology*, 2011. 225(1): 83-95.
200. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al., Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 2007. 448(7153): 561-6.
201. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, and Janne PA, The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*, 2010. 46(10): 1773-80.
202. Bria E, Milella M, Cuppone F, Novello S, Ceribelli A, Vaccaro V, et al., Outcome of advanced NSCLC patients harboring sensitizing EGFR mutations randomized to EGFR tyrosine kinase inhibitors or chemotherapy as first-line treatment: a meta-analysis. *Annals of Oncology*, 2011. 22(10): 2277-2285.

203. Spicer JF and Rudman SM, EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): the emerging role of the dual irreversible EGFR/HER2 inhibitor BIBW 2992. *Targeted Oncology*, 2010. 5(4): 245-255.
204. Cortot AB, Repellin CE, Shimamura T, Capelletti M, Zejnullahu K, Ercan D, et al., Resistance to Irreversible EGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors through a Multistep Mechanism Involving the IGF1R Pathway. *Cancer Res*, 2013. 73(2): 834-43.
205. Sequist LV, Besse B, Lynch TJ, Miller VA, Wong KK, Gitlitz B, et al., Neratinib, an Irreversible Pan-ErbB Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor: Results of a Phase II Trial in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2010. 28(18): 3076-3083.
206. Miller VA, Hirsch V, Cadranel J, Chen Y, Park K, Kim S, et al., Subgroup Analysis of LUX-Lung 1: A Randomized Phase III Trial of Afatinib (BIBW 2992) + Best Supportive Care (BSC) versus Placebo plus BSC in Patients with NSCLC Failing 1-2 Lines of Chemotherapy and Erlotinib or Gefitinib. *Journal of Thoracic Oncology*, 2010. 5(12): S557-S558.
207. Mok T, Spigel DR, Park K, Socinski MA, Tung SY, Kim DW, et al., Efficacy and Safety of Pf299804 as First-Line Treatment (Tx) of Patients (Pts) with Advanced (Adv) Nsclc Selected for Activating Mutation (Mu) of Epidermal Growth Factor Receptor (Egfr). *Annals of Oncology*, 2010. 21: 8-8.
208. Zhou WJ, Ercan D, Chen L, Yun CH, Li DN, Capelletti M, et al., Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature*, 2009. 462(7276): 1070-1074.
209. Chen G, Kronenberger P, Teugels E, Umelo IA, and De Greve J, Effect of siRNAs targeting the EGFR T790M mutation in a non-small cell lung cancer cell line resistant to EGFR tyrosine kinase inhibitors and combination with various agents. *Biochemical and biophysical research communications*, 2012.
210. Spigel D, Ervin T, Ramlau R, Daniel D, Goldschmidt J, Krzakowski M, et al., Randomized Multicenter Double-Blind Placebo-Controlled Phase II Study Evaluating Metmab, an Antibody to Met Receptor, in Combination with Erlotinib, in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Annals of Oncology*, 2010. 21: 7-7.

211. Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, et al., Met kinase inhibitor E7050 reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced tyrosine kinase inhibitor resistance in EGFR mutant lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(6): 1663-71.
212. Li J, Hao X, Wang Y, Zhang X, and Shi Y, [Clinical response to gefitinib retreatment of lung adenocarcinoma patients who benefited from an initial gefitinib therapy: a retrospective analysis]. *Zhongguo fei ai za zhi = Chinese journal of lung cancer*, 2012. 15(1): 44-8.
213. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al., Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*, 2011. 3(75): 75ra26.
214. Dean M, Fojo T, and Bates S, Tumour stem cells and drug resistance. *Nature reviews. Cancer*, 2005. 5(4): 275-84.
215. Singh A and Settleman J, EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 2010. 29(34): 4741-51.
216. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al., The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature medicine*, 2001. 7(9): 1028-34.
217. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al., Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 2005. 121(6): 823-35.
218. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al., Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(38): 16281-6.
219. Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, Tin VP, Cheng LC, Sihoe AD, et al., Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One*, 2010. 5(11): e14062.

220. Sullivan JP, Spinola M, Dodge M, Raso MG, Behrens C, Gao B, et al., Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cells dependent on notch signaling. *Cancer Res*, 2010. 70(23): 9937-48.
221. Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, et al., The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell stem cell*, 2009. 4(6): 525-34.
222. Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, and Freeman G, Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Experimental and molecular pathology*, 1975. 22(1): 142-50.
223. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, and Stripp BR, In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 2004. 286(4): L643-9.
224. Giangreco A, Reynolds SD, and Stripp BR, Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol*, 2002. 161(1): 173-82.
225. Wang XY, Keefe KM, Jensen-Taubman SM, Yang D, Yan K, and Linnoila RI, Novel method for isolation of murine clara cell secretory protein-expressing cells with traces of stemness. *PLoS One*, 2012. 7(8): e43008.
226. Liu T, Xu F, Du X, Lai D, Zhao Y, Huang Q, et al., Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. *Mol Cell Biochem*, 2010. 340(1-2): 265-73.
227. Hagerstrand D, He X, Bradic Lindh M, Hoefs S, Hesselager G, Ostman A, et al., Identification of a SOX2-dependent subset of tumor- and sphere-forming glioblastoma cells with a distinct tyrosine kinase inhibitor sensitivity profile. *Neuro Oncol*, 2011. 13(11): 1178-91.
228. Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Loipetzberger A, Damhofer H, Zoidl K, et al., Hedgehog-EGFR cooperation response genes

determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. *EMBO molecular medicine*, 2012. 4(3): 218-33.

229. Schnidar H, Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Kasper M, Hauser-Kronberger C, et al., Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with Hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Res*, 2009. 69(4): 1284-92.
230. Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Wert SE, Keiser AR, Smith AN, et al., Sox2 is required for maintenance and differentiation of bronchiolar Clara, ciliated, and goblet cells. *PLoS One*, 2009. 4(12): e8248.
231. Curtis SJ, Sinkevicius KW, Li D, Lau AN, Roach RR, Zamponi R, et al., Primary tumor genotype is an important determinant in identification of lung cancer propagating cells. *Cell stem cell*, 2010. 7(1): 127-33.
232. Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Asanuma H, Inoue R, Nishida S, et al., Prognostic impact of the expression of ALDH1 and SOX2 in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Mod Pathol*, 2013. 26(1): 117-24.
233. Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Muller F, et al., Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC cancer*, 2011. 11: 42.
234. Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W, et al., The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem*, 2008. 283(26): 17969-78.
235. Han X, Fang X, Lou X, Hua D, Ding W, Foltz G, et al., Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PLoS One*, 2012. 7(8): e41335.
236. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al., SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet*, 2009. 41(11): 1238-42.

237. Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembele D, et al., SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS One*, 2010. 5(1): e8960.
238. Lu Y, Futtner C, Rock JR, Xu X, Whitworth W, Hogan BL, et al., Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS One*, 2010. 5(6): e11022.
239. Nakatsugawa M, Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Murase M, et al., SOX2 is overexpressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumorigenicity. *Lab Invest*, 2011. 91(12): 1796-804.
240. Xiang R, Liao D, Cheng T, Zhou H, Shi Q, Chuang TS, et al., Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer. *Br J Cancer*, 2011. 104(9): 1410-7.
241. Chen S, Xu Y, Chen Y, Li X, Mou W, Wang L, et al., SOX2 gene regulates the transcriptional network of oncogenes and affects tumorigenesis of human lung cancer cells. *PLoS One*, 2012. 7(5): e36326.
242. Xu X, Rock JR, Lu Y, Futtner C, Schwab B, Guinney J, et al., Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(13): 4910-5.
243. Cai YR, Zhang HQ, Qu Y, Mu J, Zhao D, Zhou LJ, et al., Expression of MET and SOX2 genes in non-small cell lung carcinoma with EGFR mutation. *Oncology reports*, 2011. 26(4): 877-85.
244. Singh S, Trevino J, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiook S, et al., EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Molecular cancer*, 2012. 11.
245. Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, Hilger RA, Thomale J, O'flaherty JD, et al., Generation and characterisation of Cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. *PLoS One*, 2013. 8(1): e54193.

246. Nishi M, Sakai Y, Akutsu H, Nagashima Y, Quinn G, Masui S, et al., Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*, 2013.
247. Dong LX, Sun LL, Zhang X, Pan L, Lian LJ, Chen Z, et al., Negative regulation of mTOR activity by LKB1-AMPK signaling in non-small cell lung cancer cells. *Acta pharmacologica Sinica*, 2013. 34(2): 314-8.
248. Vazquez-Martin A, Vellon L, Quiros PM, Cufi S, De Galarreta ER, Oliveras-Ferraro C, et al., Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) provides a metabolic barrier to reprogramming somatic cells into stem cells. *Cell Cycle*, 2012. 11(5): 974-989.
249. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, et al., A Gene-Mapping to the Sex-Determining Region of the Mouse Y-Chromosome Is a Member of a Novel Family of Embryonically Expressed Genes. *Nature*, 1990. 346(6281): 245-250.
250. Kondo T and Raff M, Chromatin remodeling and histone modification in the conversion of oligodendrocyte precursors to neural stem cells. *Genes & development*, 2004. 18(23): 2963-2972.
251. Graham V, Khudyakov J, Ellis P, and Pevny L, SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 2003. 39(5): 749-765.
252. Wagner B, Natarajan A, Grunau S, Kroismayr R, Wagner EF, and Sibilio M, Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *Embo Journal*, 2006. 25(4): 752-762.
253. Jeong CH, Cho YY, Kim MO, Kim SH, Cho EJ, Lee SY, et al., Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2010. 28(12): 2141-50.
254. Tsuruzoe S, Ishihara K, Uchimura Y, Watanabe S, Sekita Y, Aoto T, et al., Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochemical and biophysical research communications*, 2006. 351(4): 920-6.

255. Baltus GA, Kowalski MP, Zhai H, Tutter AV, Quinn D, Wall D, et al., Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2009. 27(9): 2175-84.
256. Van Hoof D, Munoz J, Braam SR, Pinkse MW, Linding R, Heck AJ, et al., Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell stem cell*, 2009. 5(2): 214-26.
257. Miyoshi N, Ishii H, Nagai K, Hoshino H, Mimori K, Tanaka F, et al., Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(1): 40-5.
258. Takahashi K and Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): 663-76.
259. Gure AO, Stockert E, Scanlan MJ, Keresztes RS, Jager D, Altorki NK, et al., Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(8): 4198-203.
260. Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS, et al., Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet*, 2012. 44(10): 1111-6.
261. Sanada Y, Yoshida K, Ohara M, Oeda M, Konishi K, and Tsutani Y, Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic intraductal components. *Pancreas*, 2006. 32(2): 164-70.
262. Sattler HP, Lensch R, Rohde V, Zimmer E, Meese E, Bonkhoff H, et al., Novel amplification unit at chromosome 3q25-q27 in human prostate cancer. *The Prostate*, 2000. 45(3): 207-15.
263. Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G, Rodriguez-Gil Y, Martinez MA, Hernandez L, et al., Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod Pathol*, 2007. 20(4): 474-81.

264. Ishii Y, Rex M, Scotting PJ, and Yasugi S, Region-specific expression of chicken Sox2 in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 1998. 213(4): 464-75.
265. Engelman JA, Janne PA, Mermel C, Pearlberg J, Mukohara T, Fleet C, et al., ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(10): 3788-93.
266. Dowling RJO, Topisirovic I, Fonseca BD, and Sonenberg N, Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. *Bba-Proteins Proteom*, 2010. 1804(3): 433-439.
267. Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, Lifshits E, Borrás AM, Gale CM, et al., Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *The Journal of clinical investigation*, 2006. 116(10): 2695-706.
268. Sheridan C, Castellano E, Murillo M, and Downward J, Exploration of the Role of Ras-PI3K Interaction in Lung Tumor Maintenance. *European Journal of Cancer*, 2012. 48: 108-108.
269. Ercan D, Xu C, Yanagita M, Monast CS, Pratilas CA, Montero J, et al., Reactivation of ERK signaling causes resistance to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov*, 2012. 2(10): 934-47.
270. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al., Preexistence and Clonal Selection of MET Amplification in EGFR Mutant NSCLC. *Cancer cell*, 2010. 17(1): 77-88.
271. Yamada T, Matsumoto K, Wang W, Li Q, Nishioka Y, Sekido Y, et al., Hepatocyte Growth Factor Reduces Susceptibility to an Irreversible Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor in EGFR-T790M Mutant Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2010. 16(1): 174-183.
272. Jin G, Kim MJ, Jeon HS, Choi JE, Kim DS, Lee EB, et al., PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*, 2010. 69(3): 279-283.

273. Marsit CJ, Zheng SC, Aldape K, Hinds PW, Nelson HH, Wiencke JK, et al., PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Human Pathology*, 2005. 36(7): 768-776.
274. Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, Lifshits E, Borras AM, Gale CM, et al., Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 2006. 116(10): 2695-2706.
275. Guo A, Villen J, Kornhauser J, Lee KA, Stokes MP, Rikova K, et al., Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *P Natl Acad Sci USA*, 2008. 105(2): 692-697.
276. La Monica S, Galetti M, Alfieri RR, Cavazzoni A, Ardizzoni A, Tiseo M, et al., Everolimus restores gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cell lines. *Biochemical pharmacology*, 2009. 78(5): 460-468.
277. Li DN, Shimamura T, Ji HB, Chen L, Haringsma HJ, Mcnamara K, et al., Bronchial and peripheral murine lung carcinomas induced by T790M-L858R mutant EGFR respond to HKI-272 and rapamycin combination therapy. *Cancer cell*, 2007. 12(1): 81-93.
278. Soria JC, Shepherd FA, Douillard JY, Wolf J, Giaccone G, Crino L, et al., Efficacy of everolimus (RAD001) in patients with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy alone or with chemotherapy and EGFR inhibitors. *Ann Oncol*, 2009. 20(10): 1674-81.
279. Brachmann SM, Kleylein-Sohn J, Gaulis S, Kauffmann A, Blommers MJ, Kazic-Legueux M, et al., Characterization of the mechanism of action of the pan class I PI3K inhibitor NVP-BKM120 across a broad range of concentrations. *Molecular cancer therapeutics*, 2012. 11(8): 1747-57.
280. Faber AC, Li D, Song Y, Liang MC, Yeap BY, Bronson RT, et al., Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(46): 19503-8.

281. Gong HC, Wang S, Mayer G, Chen G, Leesman G, Singh S, et al., Signatures of drug sensitivity in nonsmall cell lung cancer. *International journal of proteomics*, 2011. 2011: 215496.
282. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Ebi H, Sano T, Nanjo S, et al., EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented by in combination with HDAC inhibition. *Cancer Res*, 2013.

10. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, beni her koşulda destekleyen, değerli zamanını cömertçe kullanan, bilgi ve deneyimi ile yol gösteren, sevgi ve hoşgörüsü ile daima yanımda olan değerli hocam, sayın Prof. Dr. Abdullah Ekmekçi'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimlerini bana özveri ve iyi niyetleri ile aktaran, hayat enerjileri ile örnek olan, her zaman desteklerini hissettiğim çok değerli hocalarım, sayın Prof. Dr. Sevda MENEVŞE'ye ve sayın Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dünyanın en önemli kanser araştırma merkezlerinden birine beni davet edip, bilimsel düşünce anlayışımı genişleten, maddi ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen sayın Dr. Phillip Dennis'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bu merkezde bilgi ve deneyimleriyle beni kendilerine hayran bırakan sayın Dr. Joell Gills'e ve sayın Dr. Christine Hollander'a yardımları için çok teşekkür ederim.

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD'nda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm değerli öğretim elemanlarımıza ve bölüm arkadaşlarıma, yardımları ve paylaşımları için teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sevgi, ilgi ve desteklerini her zaman hissettiğim, bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan ve bir parçası olmaktan gurur duyduğum aile üyelerim babam Şakir Rıza DOĞAN,

annem Şükran DOĞAN ve kardeşim Tuğçe DOĞAN'a en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı, 2002 yılında kanser nedeniyle kaybettiğim, sevgisi, hoşgörüsü ve yardımseverliği ile örnek aldığım anneanem Ümmügül BENHÜR'e ithaf eder, özlem ve minnetle anarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: İrem

Soyadı: Doğan

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 1980

Eğitimi:

2007- Doktora, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD

2004-2007 Yüksek Lisans, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD

1999-2003 Lisans, Gazi Üniversitesi-Fen Edebiyat Fakültesi-Biyoloji AD

1995-1998 Deneme Lisesi

1993-1995 Özel Arı Koleji

1991-1993 Özel Aydeniz Lisesi

1986-1991 Telsizler İlköğretim Okulu

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

MOKAD

TEMA Vakfı

Bilimsel Etkinlikleri:

Burslar ve ödüller:

Tübitak-2214- Yurt dışı araştırma bursu (doktora öğrencileri için) - 1 yıl

The EMBO Meeting 2012-Travel Grant

Projeleri:

Türk Toplumunda Aurora-A gen polimorfizmleri ve akciğer kanseri arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Akciğer kanseri hücre hattında Trastuzumab'ın apoptozis ve survivin ifadesi üzerine etkileri

Akciğer kanser kök hücreleri ve Notch sinyal yolağı

Glioblastoma kanser kök hücreleri ve bu hücrelerin kemoterapi direnci

B16F10 Malign melanoma hücrelerinde ve bu hücrelerin aktarıldığı

C57BL6 farelerinde Flavopiridol'ün apoptoz sinyal yollarına etkisi