

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMSİROLİMUSUN NCI-H1975 AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDE
mTOR PROTEİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Bircan ÖNEL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMSİROLİMUSUN NCI-H1975 AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDE
mTOR PROTEİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Bircan ÖNEL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2013020121030 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMSİROLİMUSUN NCI-H1975 AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDE
mTOR PROTEİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Bircan ÖNEL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 13/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Yrd. Doç. Dr. Esra AYDEMİR

Yrd. Doç. Dr. Nilüfer İMİR

ÖZET

TEMSİROLİMUSUN NCI-H1975 AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDE mTOR PROTEİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Bircan ÖNEL

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Esra AYDEMİR

Ocak 2015, 66 sayfa

Kanser, hücre döngüsü kontrolünde meydana gelen aksaklıklar yüzünden ortaya çıkan ölümcül bir hastalıktır. Normalde ölmesi gereken mutant ya da hasarlı hücreler, çok sayıda mutasyonu biriktirerek hücre döngüsü boyunca ilerleyebilir ve bu sayede kanserleşmeye başlayabilir. Son yıllarda, hücre döngüsü kontrol noktalarını hedef alan etkili anti-kanser ajanların geliştirilmesi dikkat çekmeye başlamıştır.

mTOR, ökaryotik hücrelerin hayatta kalmasını, büyümesini ve çoğalmasını kontrol eden biyosentez süreçlerinin önemli bir bileşenidir. mTOR proteini yapısal olarak mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve kompleks 2 (mTORC2) olmak üzere iki farklı protein kompleksinden oluşmaktadır. mTORC1 hücre döngüsü kontrol noktalarının düzenlenmesinde etkin olduğu için hücre büyümesini rapamisin'e-duyarlı bir şekilde kontrol eder ve Akt ile hücresel enerjinin düzenlenmesi sayesinde aktive olur. Aksine mTORC2, hücre döngüsü kontrolünde rapamisin'e duyarsız bir rol üstlenmektedir. Bu komplekslerin inhibisyonu hücre büyümesinde, çoğalmasında, metabolizmasında, anjiyogenezinde baskılanmaya ve bu nedenle hücre döngüsünün G1 fazında beklemesine yol açmaktadır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) de dâhil olmak üzere bir çok kanser tipinde mTOR aktivitesinde önemli bir artışın olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, klinikte kullanılmak üzere, mTOR aktivitesini seçici olarak baskılayabilen farklı bileşikler geliştirilmektedir.

Rapamisinin bir analogu olarak sentezlenen Temsirolimus (CCI-779) mTOR aktivitesini mTORC1 üzerine etki ederek seçici bir biçimde baskılamaktadır. Temsirolimus'un renal hücre ve nöroendokrin karsinomlarında, meme kanserinde, glioblastomada ve mantle hücreli lenfomada antitümoral etkileri olduğu bilinmektedir.

mTOR proteininin inhibisyonunun hücreyi otofajik ölüme yönlendirdiği bilinmektedir. Otofaji, protein ve organeller gibi hücresel bileşenlerin otofagazomlar içinde hapsedilerek parçalanmak üzere lizozomlara iletildiği bir süreçtir. Hücresel stresin ve besin kıtlığının bulunduğu durumlarda otofaji, hücresel enerjinin, homeostasinin ve makromolekül sentezinin korunmasını sağlayarak hücrenin hayatta kalma şansını arttırmaktadır. Yapılan birçok çalışma; ılımlı ve/veya yavaş gerçekleşen otofajinin hücrenin sağkalım şansını arttırdığını, şiddetli ve/veya hızlı bir biçimde

gerçekleşen otofajinin ise hücreyi ölüme yönlendirdiğini işaret etmektedir. Otofajiyi indüklemek suretiyle hücrelerin ilaca karşı olan hasasiyetini arttırmayı başaran pek çok antikanser ajan bulunmaktadır. Son yıllarda otofaji, antitümöral ilaçlara karşı dirençli hale gelen tümör hücreleri için yeni bir alternatif terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir.

Literatürden elde ettiğimiz tüm bu verilere dayanarak biz de temsirolimus'un küçük hücreli dışı akciğer kanseri için potansiyel bir terapötik yaklaşım olup olmayacağını sorguladık. Çalışmamızda, temsirolimus'un NCI-H1975 hücrelerinde (KHDAK hücresi) sergilediği *in vitro* sitotoksik etkiyi değerlendirdik. Temsirolimus, NCI-H1975 hücrelerinde doza ve zamana bağlı sitotoksik etki sergiledi. İlaç, 72 saat sonunda 0.9 µg/ml'lik dozda kaspaz -3, -8 ve -9 enzimlerinin aktivitelerinde önemli bir artış sağlamak koşulu ile hücrelerin canlılığında %31.4'lük bir azalmaya yol açtı. Temsirolimus NCI-H1975 hücrelerinde mTOR aktivitesinde sadece 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda bir inhibisyona sebep oldu.

ANAHTAR KELİMELER: mTOR, Otofaji, Temsirolimus, NCI-H1975, 293T

JÜRİ: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Yrd. Doç. Dr. Esra AYDEMİR (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Nilüfer İMİR

ABSTRACT

EFFECTS OF TEMSIROLIMUS ON mTOR PROTEIN ACTIVITY IN NCI-H1975 LUNG CANCER CELLS

Bircan ÖNEL

Ms Thesis in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Esra AYDEMİR

January 2015, 66 pages

Cancer is a lethal disease which occurs due to the malfunctions within the cell cycle regulation. The mutated or injured cells which are normally have to die are allowed to progress through the cell cycle with a number of accumulated mutations and thus become cancerous. Recently, the development of effective anti-cancer agents that target the cell cycle checkpoints have received much attention.

mTOR is an important component of biosynthetic process that regulates eukaryotic cell survival, growth and proliferation. mTOR exists as structurally two distinct protein complexes; mTOR complex 1 (mTORC1) and complex 2 (mTORC2). mTORC1 is involved in rapamycin-sensitive control of cell growth by regulating the cell cycle checkpoints and is activated by Akt and regulation of cellular energy. Conversely, mTORC2 acts in rapamycin-insensitive control of cell growth. Inhibition of these protein complexes results in diminished cell growth and proliferation, metabolism and angiogenesis and therefore leads cell cycle block at the G1 phase. Upregulation of mTOR activity is evident in many types of cancers including NSCLC. In this respect, several compounds that selectively inhibit mTOR activity have been developed for clinical use.

As an analogue of rapamycin, Temsirolimus (CCI-779), was synthesized to specifically inhibit mTOR by directly acting on mTORC1. It was reported that temsirolimus exerts antitumoral effects on renal cell carcinoma, breast cancer, glioblastoma, neuroendocrine carcinomas and mantle cell lymphoma.

It is known that inhibition of mTOR protein leads to autophagic cell death. Autophagy is a process in which cellular components such as proteins and organelles are engulfed by autophagosomes, and are transmitted to the lysosomes for degradation. Autophagy can facilitate cell survival by maintaining cellular energy, homeostasis and macromolecular synthesis during cellular stress and nutrient deprivation. Many reports indicated that mild and/or slow autophagy may enhance cell survival while more severe and/or rapid autophagy would induce cell death. There are several anticancer agents which induce autophagy and thereby sensitize cells to drug treatment. Recently

autophagy is considered to be an innovative therapeutic target for tumor cells which are resistant to anti-tumor drugs.

Based on these literatural results, we questioned whether temsirolimus treatment could be a potential therapeutic option for NSCLC. In this study, we evaluated the cytotoxic effects of temsirolimus in NCI-H1975, a type of NSCLC, *in vitro*. Temsirolimus exerted a time and dose dependent cytotoxic activity against NCI-H1975 cells. Temsirolimus at 0.9 µg/ml concentration, yielded % 31.4 inhibition in cell viability at the end of 72 hours by activating caspase -3, -8 and -9 enzymes. Temsirolimus inhibited mTOR activity only at the end of 24 hours in NCI-H1975 cells.

KEYWORDS: mTOR, Autophagy, Temsirolimus, NCI-H1975, 293T

COMMITTEE: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Asst. Prof. Dr. Esra AYDEMİR (Supervisor)

Asst. Prof. Dr. Nilüfer İMİR

ÖNSÖZ

Günümüzde uygulanan küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavileri yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda tedavilerin daha etkili olması ve ömür uzunluğunu arttırabilecek yeni alternatif tedavilerin belirlenebilmesi dikkat çekmeye başlamıştır. Yapılan tüm çalışmalarda olduğu gibi, çalışmamızın temel amacı da bu alternatif tedavilere katkıda bulunabilecek sonuçlar elde etmek olmuştur.

Temsirolimus, hücre döngüsünün G1 fazından S fazına ilerlemesini durdurarak hücre çoğalmasını baskılayan bir hücre döngüsü inhibitörüdür. Temsirolimus, hücre içerisinde birçok metabolik süreçte rol oynayan mTOR proteinini inhibe eder.

Hücrelerde mTOR proteininin baskılanması otofajik hücre ölümüne yol açmaktadır. Son yıllarda, otofaji kanser tedavilerinde apoptoza ek olarak alternatif bir hücre ölümü mekanizması olarak düşünülmektedir. mTOR proteini, hücrelerde hem otofajinin hem de apoptozun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sebeple, mTOR yolağını hedefleyen ajanların kullanılması hücrelerin ölüm mekanizmalarına yönlendirilmesini sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında, temsirolimus'un küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattında mTOR proteini üzerinde inhibitör etki yaratıp yaratmayacağı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bununla beraber ilacın inhibitör etkisinden yararlanıp hücrelerin otofajik hücre ölümüne yönlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, temsirolimus'un bu hücrelerde sergileyeceği olası sitotoksik etki; apoptoz mekanizmasında anahtar roller üstlenen kaspaz-2, -3, -6, -8 ve -9 enzimlerinin aktivitelerindeki değişimlere bakılarak araştırılmıştır.

Çalışmamız sonucunda, temsirolimus'un bilinen antiproliferatif etkisinin yanında NCI-H1975 hücre hattında apoptotik bir ajan olduğu bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu bulgunun, kanser tedavisi için alternatif yollar arayan bilim insanlarının yapacakları yeni çalışmalara ışık tutacağını ummaktayız.

Bana lisans döneminden beri hayalini kurduğum yüksek lisans yapabilme fırsatını sunan, tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmakta oldukça cömert olan sayın hocam, akademik danışmanım Yrd. Doç. Dr. Esra AYDEMİR'e, lisans döneminde bana laboratuvarında çalışma fırsatı sunan ve bu yola ilk adımımı atmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN'a, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisinden ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nilüfer İMİR'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK'e, bildiği herşeyi benimle paylaşan ve beni cesaretlendiren Cansu KİLİT'e, manevi olarak her zaman desteğini hissettiğim ve her durumda yanımda olan beraber çok şey öğrendiğim dostum, meslektaşım Aykut KURUOĞLU'na, çalışmalarımda her zaman yardımcı olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşım, değerli meslektaşım Orhan KOÇAK'a, tez dönemim boyunca her zaman yanımda olup beni hiç yalnız bırakmayan Duygu KURUOĞLU'na ve eğitim hayatım boyunca kendilerinden çok beni düşünen, her ne olursa olsun yanımda olan, her durumda sonsuz anlayış gösteren ve benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Turgay ÖNEL'e ve annem Gülden ÖNEL'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHDAK)	4
2.2. Hücre Ölümü.....	5
2.2.1. Mitotik Katastrof.....	5
2.2.2. Nekroz.....	6
2.2.3. Apoptoz.....	6
2.2.4. Otofaji.....	9
2.3. mTOR Protein Kompleksi.....	14
2.4. Temsirolimus (CCI-779).....	16
3. MATERYAL VE METOT.....	19
3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları	19
3.2. İlacın Hücrelere Uygulanması	19
3.3. WST-1 Hücre Proliferasyon Kiti.....	19
3.4. Kolorimetrik Proteaz (Kaspaz-2, -3, -6, -8, -9) Kiti.....	20
3.5. mTOR (pSer2448) Elisa Kit.....	20
3.6. İstatistiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. Temsirolimus'un NCI-H1975 ve 293T Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Etkiler.....	22
4.2. Temsirolimus'un NCI-H1975 ve 293T hücre hatlarında kaspaz-2, -3, -6, -8 ve -9 aktiviteleri üzerine etkisi.....	29

4.3. Temsirolimus'un NCI-H1975 ve 293T hücre hatlarında mTOR proteini aktivitesi üzerine etkileri.....	30
5. TARTIŞMA.....	31
6. SONUÇ	36
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

kDA	Kilo Dalton
mg	Miligram
ml	Mililitre
µg	Mikrogram
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
nm	Nanometre
g	Yerçekimi Katsayısı
nM	Nano Molar

Kısaltmalar

293T	İnsan Embriyonik Böbrek Epitel Hücre Hattı
4EBP1	eIF-4E Bağlı Protein
A549	Akciğer Kanseri Hücre Hattı
AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
Akt	Protein kinaz B
AP23573	Deforolimus
Apaf1	Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör 1
Asp	Aspartat
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
Atg	Otofaji İlişkili Gen
ATM	Mutant Ateksiya Telangiestasiya
ATP	Adenozin Tri Fosfat
Bad	Bcl-2 İlişkili Ölüm Promotörü
BAG	Moleküler Şaperon Düzenleyici Protein
Bak	Bcl-2 Homoloğu Antagonist Öldürücü
Bax	Bcl-2 İlişkili X Proteini
BCA	Bisinkoninik Asit
Bcl-10	B Hücre Lenfoma/Lösemi 10
Bcl-2	B Hücre Lenfoma 2

Bcl-w	Bcl-2 Benzeri Protein 2
Bcl-x	B-Hücre Lenfoma-Ekstra
Bcl-XL	B-Hücre Lenfoma-Ekstra-Large
Bcl-XS	B-Hücre Lenfoma-Ekstra Small
Beclin1	Otofaji ilişkili gen-6 memeli ortoloğu
BEL-7402	Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattı
BH3	Protein Domaini
Bid	BH3 Etkileşimli Ölüm Domain Agonisti
Bik	Bcl-2 Etkileşimli Ölüm Proteini
Bim	Bcl-2 etkileşimli Ölüm Aracısı
Blk	B Lenfoid Tirozin Kinaz
CARD	Kaspaz Birleştirici Parçalar
CCI-779	Temsirolimus
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CdkI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü
Ced-3	Nematot Ölüm Geni
CO ₂	Karbon dioksit
DAPk	Ölüm İlişkili Protein Kinaz
DED	Ölüm Efektör Domaini
DEVD	Kaspaz-3 Spesifik Amino Asit Dizisi
DISC	Ölüm Uyarıcı Sinyal Kompleksi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPR-1	Ölüm Reseptör Protein-1
DU 145	Prostat Kanseri Hücre Hattı
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EF3	Faktör 3 Bağlayıcı Madde
eIF-4E	Ökaryotik Başlatıcı Faktör
EMEA	Avrupa İlaçlar Ajansı
Fas	Tip II Transmembran Proteini
FAT	FRAP-ATM-TRRAP

FATC	FAT C Terminal Domaini
FBS	Fetal Bovin Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FK506	Takrolimus
FKBP12	Peptidil-prolil sis-trans-izomeraz
FKBP12	FK506 Bağlayıcı Protein
FRAP	Rapamisin İlişkili Protein
FRB	FKBP12 Rapamisin Bağlayıcı
G1	Gap 1
GrB	Granzim B
GSK690693	Akt Protein İnhibitörü
H1299	KHDAK Hücre Hattı
H358	KHDAK Hücre Hattı
HEAT	Huntingtin, EF3, PP2A, TOR Motifi
HepG2	Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattı
HER-2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2
HIF	Hipoksi İndükleyici Faktör
IETD	Kaspaz-8 Spesifik Amino Asit Dizisi
Kaspaz	Sistein Aspartat Spesifik Proteazları
KFERQ	Spesifik Peptit Sekans Motif
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
LC3	Mikrotübül İlişkili Işık Zinciri 3
LEHD	Kaspaz-9 Spesifik Amino Asit Dizisi
MCF-7	Meme Kanseri Hücre Hattı
MCL	Mantle Hücre Lenfoma
MEF	Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri
MG132	Hücre Geçirgenliği Proteozom İnhibitörü
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
mTOR	Memeli Rapamisin Hedefi
mTORC1	Memeli Rapamisin Hedefi Kompleks 1

NCI-H1975	KHDAK Hücre Hattı
NCI-H460	KHDAK Hücre Hattı
p53	Tümör Baskılayıcı Protein
P70S6K	Serin/Treonin Kinaz
PAS	Fagopor Toplama Alanı
PBS	Fosfat Buffer Tuzu
PC3	Prostat Kanseri Hücre Hattı
PDK-I	Sınıf 1 Fosfoinositol 3-kinaz
PE	Fosfotidiletanolamin
PI3K	Fosfoinozitol 3-kinaz
PKC	Protein Kinaz-C
pNA	Peptit Nükleik Asit
PP2A	Protein Fosfataz 2
PRAS40	Prolince Zengin AKT Substratı 40 kDA
pRB	Protein Retinoblastoma
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
QACRG	Pentapeptit Aktif Bölge
RAD001	Everolimus
RAPT1	Rapamisin Hedefi
Ras	Küçük GTPaz Ailesi Üyesi
S	Sentez
S6	Ribozomal protein
S6K	Ribozomal proetin S6 Kinaz
S6KI	Ribozomal proetin S6 Kinaz I
SEM	Standart Hata
SEP	Sirolimus Efektör Proteini
Ser/Thr	Serin/Treonin
Ser2448	mTOR Elisa Kit
SGK1	Serum ve Glukokortikoid Düzenleyici Kinaz-1
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TOR	Rapamisin Hedefi
TRAIL	TNF Bağımlı Apoptozis İndükleyici Ligand

TRRAP	Transformasyon/Transkripsiyon Domain İlişkili Protein
TSC	TüberoZ Skleroz Kompleks
U937	Monosit Hücre Hattı
Ulk1	Serin/Treonin Protein Kinaz
UV	Ultraviyole
VDVAD	Kaspaz-2 Spesifik Amino Asit Dizisi
VEID	Kaspaz-6 Spesifik Amino Asit Dizisi
WST-1	Tetrazolyum Boya
Z-VAD	Kaspaz İnhibitörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin temel özellikleri	4
Şekil 2.2. Apoptozun şematik gösterim.....	8
Şekil 2.3. Otofaji şekilleri	10
Şekil 2.4. Otofagozom ve otolizozomun oluşumu	11
Şekil 2.5. Kanser gelişiminde otofaji	13
Şekil 2.6. mTOR domainlerinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.7. mTOR Yolağı.....	16
Şekil 2.8. Temsirolimus'un açık formülü ve etki mekanizması.....	17
Şekil 4.1. Temsirolimus'un 0.9 µg/ml – 62.5 µg/ml doz aralığında, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, NCI-H1975 hücre hattı üzerine etkisi.....	23
Şekil 4.2. Temsirolimus'un 0.9 µg/ml – 62.5 µg/ml doz aralığında, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 293 T hücre hattı üzerine etkisi	24
Şekil 4.3. Temsirolimus'un 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, NCI-H1975 hücre hattı üzerindeki hücre canlılığına etkisi (%)......	25
Şekil 4.4. Temsirolimus'un 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 293 T hücre hattı üzerindeki hücre canlılığına etkisi (%)......	26
Şekil 4.5. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünmüş, 0.9 µg/ml temsirolimus ile muamele edilen NCI-H1975 hücrelerinin görüntüleri; (A) Kontrol, (B) DMSO Kontrol, (C) 0.9 µg/ml temsirolimus.....	27
Şekil 4.6. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünmüş, 0.9 µg/ml temsirolimus ile muamele edilen 293 T hücrelerinin görüntüleri; (A) Kontrol, (B) DMSO Kontrol, (C) 0.9 µg/ml temsirolimus.....	28
Şekil 4.7. 0.9 µg/ml temsirolimus'un NCI-H1975 hücre hattında kaspaz-3, -8 ve -9 aktiviteleri üzerine etkileri.....	29
Şekil 4.8. 24 saat inkübasyon süresi sonunda, 0.9 µg/ml temsirolimus'un NCI-H1975 hücre hattında mTOR protein aktivitesi üzerine etkisi.....	30

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve sonuç olarak da uzaktaki dokuları istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan, çok basamaklı bir süreçtir (Ruddon 2007). Sağlıklı hücrelerde hücre döngüsünü denetleyen kontrol noktalarında meydana gelen mutasyonlar, hücrelerin kanserleşme sürecindeki temel basamaklardan biridir. Bu sebeple, hücre döngüsü kontrol noktalarını hedef alan yeni ajanların keşfi, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesini engelleyerek, hücreleri ölüm mekanizmalarından birine yönlendirebilir.

DNA'da meydana gelen hasarlar tamir edilemezse hücre apoptoza yönlendirilir. Apoptozis organizmalarda immün sistemin işlevselliği ve normal embriyonik gelişim gibi bazı fizyolojik olaylarda rol alan ve aynı zamanda kanser hücrelerinin eliminasyonu için hedeflenen en önemli ölüm mekanizmasıdır. Apoptozis mekanizmasını aktive etmek için kullanılan pek çok anti-kanser ajanın temel hedefi, bu mekanizmada anahtar rol oynayan ve normal hücrelerde inaktif olarak bulunan kaspaz enzimlerinin aktivitesini arttırmaktır (Reed ve Tomaselli 2000, Elmore 2007).

Otofaji, proteinlerin ve hasarlı organellerin yıkımı gibi homeostatik fonksiyonların gerçekleşmesini sağlayan, evrimsel olarak oldukça korunmuş, fizyolojik bir olgudur (Gözüaçık ve Kimchi 2007); Diğer yandan, sitoplazmanın temel bileşenlerinin yıkımını sağlayarak hücre ölümünü teşvik edebilir (Macintosh ve Ryan 2013). Otofaji, genom hasarını ve kromozomal kararsızlığı önleyerek tümör baskılayıcı bir mekanizma gibi davranır (Kang ve Avery 2008) ve bu nedenle malignant dönüşümü baskılayan bir süreç olduğu düşünülmektedir (Kimmelman 2011). Otofaji özellikle apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda aktive olarak hücrelerin ölümüne de yol açabilir; Bu özelliğiyle, apoptozla ölmesi mümkün olmayan hücrelerde 'hücre ölümü B planı' şeklinde görev yapar (Eiseberg- Lerner vd 2009).

mTOR, hücre çoğalması ve sağkalım sinyallerinden sorumlu bir kinazdır. mTOR, PI3K/Akt/mTOR yolağının bir elemanı olarak aktive olduğunda, hücre döngüsünü düzenler ve apoptozu inhibe eder. Mitojen-indüklü aktivasyon ise, hücre döngüsünün G1 fazından S fazına ilerlemesine yol açmaktadır (Janus vd 2005). mTOR sinyalinin yokluğunda, ribozomal biyosentez inhibe olur ve otofaji aktive edilir (Vignot vd 2005). mTOR sinyal yolağının anormal aktivasyonu, insan kanserlerinde sıklıkla meydana gelir (Schmelzle ve Hall 2000, Gridelli 2008).

Son yıllarda, kanser hücrelerinin geleneksel kanser tedavilerine karşı direnç oluşturmaları ve apoptotik hücre ölümünden kaçabilmeleri, yeni ve daha etkili anti-kanser ilaçların araştırılmasına yol açmıştır. Kanser hücrelerini hedefleyen bu araştırmalar, genellikle hücre çoğalmasının baskılanması ve hücre döngüsü üzerinde

etkili ilaçların üretilmesini amaçlamaktadır. mTOR proteinin baskılanması, bilim dünyasında dikkat çekmeye başlamış moleküler bir hedeftir; Bu protein kompleksinin alt üniteleri üzerine etki eden ilaçların keşfi kanser tedavileri için yeni bir yaklaşım getirmiştir.

Kliniğe giren ilk nesil mTOR inhibitörleri olan rapalog'lar, mTOR proteininin allosterik inhibitörleridir ve mTORC1 için seçicidir (Chiang ve Abraham 2007). Temsirolimus, mTORC1 üzerinde etkili bir hücre döngüsü inhibitörüdür. Renal hücre karsinomlarının tedavisinde kullanılmak üzere 2007 yılında FDA ve EMEA tarafından onaylanmış bir rapalog analogudur (Heavey vd 2014). Temsirolimus'un tek başına veya bilinen çeşitli kemoteröpatik ilaçlarla kombine halde, akciğer, göğüs, yumurtalık, prostat, baş-boyun kanserlerinde, glioblastoma, melanoma ve lösemide, antitümöral etkisi olduğu gösterilmiştir (Gomez-Martin vd 2005). Dahası, temsirolimus'un küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatları üzerinde anti-proliferatif etkisi olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (Janku vd 2010, Janku vd 2011, Reungwetwattana vd 2011).

Hücre döngüsü G1/S kontrol noktasında etkili bir ilaç olan temsirolimus'un, mTOR proteini üzerindeki baskılayıcı etkisinden yararlanarak, adenokarsinoma özelliğindeki hücrelerimizi otofajik hücre ölümüne yönlendirmek çalışmamızın temel amacı olmuştur. Ayrıca, temsirolimus'un NCI-H1975 hücre hattında sergileyebileceği apoptotik etkileri, kaspaz -2, -3, -6, -8 ve -9 enzim aktivitelerindeki değişimin belirlenmesi ile de araştırılmıştır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, temsirolimus'un NCI-H1975 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını ancak mTOR proteinini inhibe etmediğini göstermiştir. Temsirolimus, hücre canlılığında azalmaya yol açan dozda, kaspaz -3, -8 ve -9 enzim aktivitelerinde istatistiksel açıdan önemli olduğu saptanan bir artışa neden olmuştur. Renal kanser hücrelerinde mTOR proteininin baskılanmasını sağlayarak hücrelerde otofajik ölümü tetikleyen bu ilaç, çalışmamızda kullandığımız NCI-H1975 hücrelerinde, beklenenin aksine, hücrelerde apoptoz mekanizmasını tetiklemektedir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

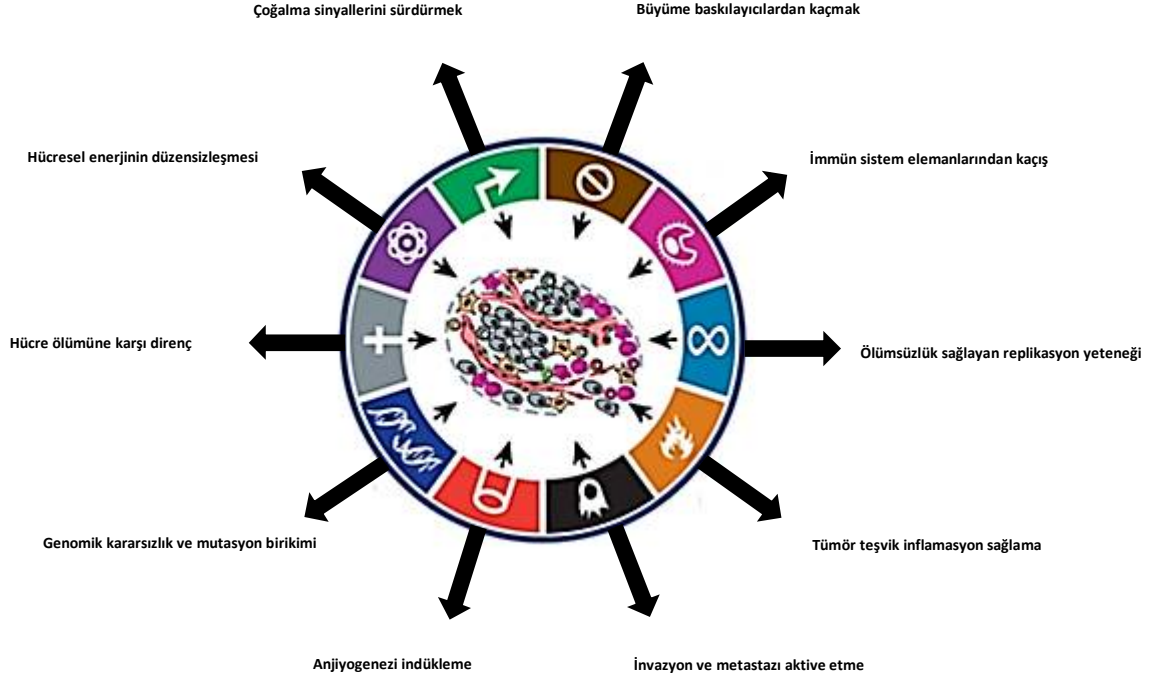
2.1. Kanser

Kanser, hücre döngüsünün kontrolündeki işlev bozuklukları ve mutasyonların birikimi nedeniyle ölmesi gereken hasarlı ve mutant hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerleyerek meydana gelen genetik ve/veya epigenetik değişiklikleri biriktirmesi sonucunda ortaya çıkabilen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Ponder 2001, Foster 2008). Genomda meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak, normal hücrelerde malignant özelliklerin artması sonucunda kanserin oluştuğu bilinmektedir. DNA hasarı, replikasyon hataları ve metabolizmada oluşan zararlı yan ürünler gibi iç etmenler ya da iyonize radyasyon, UV ışınları ve karsinojenler gibi dış etmenler kansere neden olmaktadır (Bertram 2001). Normal hücrelerde meydana gelen DNA hasarı, DNA tamir mekanizmaları tarafından onarılır; onarılamayacak seviyedeki hasarlar ise hücrelerin ölümüne yol açar. Ancak kanser hücrelerinde hasarlı DNA tamir edilemez, hücreler kendilerini ölüme yönlendirecek mekanizmalardan kaçabilir ve bu sayede genomik hasarlı yeni hücreler üretmeye devam edebilir (American Cancer Society 2012).

Tümör baskılayıcı genler ve onkogenler hem tümör oluşumunda hem de var olan tümörün büyümesinde rol oynadıkları için kanserle en çok ilişkilendirilen genlerdir (Fearon 1997). Kanserleşmiş hücrelere bakıldığında mutasyonların çoğunlukla proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelmiş olduğu görülmektedir. Hücre çoğalmasının farklı evrelerinde rol oynayan proto-onkogenler, bir mutasyon sonucu onkogene dönüştüğünde tümör büyümesine yol açar. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise mutant hücrelerde bölünmenin baskılanamamasına neden olduğu için, hücrelerin aşırı çoğalarak tümör oluşturmasını sağlar (Foster 2008).

Tüm kanser hücrelerinde ortak olarak görülen temel özellikler bulunmaktadır. Bu temel özelliklerin her biri, kanserin fizyolojik belirteçleri olarak gösterilmekte ve kanser tedavisi için farklı hedefler olarak kabul edilmektedir (Hanahan ve Weinberg 2011). Bu özellikler:

- 1) Dış kaynaklı büyüme sinyallerine ihtiyaç duymama,
- 2) Büyümeyi durdurucu sinyallere karşı duyarlı olmama,
- 3) Programlı hücre ölümünden kaçabilme,
- 4) Yaşlanmaya direnç gösterme ve sınırsız üreme potansiyeline sahip olma,
- 5) Yeni kan damarları oluşturabilme,
- 6) Farklı dokulara saldırabilme ve bir bölgeden diğerine taşınabilme (metastaz)dir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin temel özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011'den uyarlanmıştır)

2.1.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmış ve dünyada en yaygın görülen kanser türlerinden biri haline gelmiştir (Spiro ve Porter 2002). Tüm dünyada akciğer kanseri erkeklerde kanser olgularının %14'ünü, bayanlarda ise %13'ünü oluşturur ve görülme sıklığı açısından yapılan sıralamada her iki cinsiyet için de ikinci sırada yer almaktadır (Siegel vd 2014).

Akciğer kanseri için tanımlanan risk faktörleri arasında sigara ve tütün içimi, asbest, radon, krom, arsenik, is, katran gibi kimyasallara veya pasif içiciliğe maruz kalma, radyasyon terapisi ile meme veya göğüs kanseri tedavisi, ailesel yatkınlık yer almaktadır (American Cancer Society 2012). Akciğer kanseri özellikle sigara içimi ve yaşlılıkla ilişkilendirilen bir hastalık olarak bilinmesine rağmen, görülme sıklığı daha az olmakla birlikte sigara içmeyen ve genç bireylerde de görülebilir (Clamon 2015). Akciğer kanseri tanısı konulan üç kişiden ikisi altmış beş yaş ve üzerindedir. Tüm vakaların %2'den daha azı kırk beş yaşında veya daha gençtir.

Akciğer kanseri küçük hücreli (nöroendokrin) karsinoma (KHAK) veya küçük hücreli dışı karsinoma (KHDAK) olarak kategorize edilir. KHDAK tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak %85'ini oluşturur (Dela Cruz vd 2011). KHDAK'nin üç ana alt tipi vardır. Bu alt tiplerdeki hücreler, mikroskop altında bakıldığında, büyüklük, şekil

ve kimyasal oluşumlarıyla birbirlerinden tamamen farklıdır. Tüm KHDAK vakalarının yaklaşık %25'i ile % 30'unda görülen pullu hücre karsinoması, akciğerlerin ortasında lokalizedir ve sigara kullanımı ile ilişkilidir. KHDAK vakalarının %10'u ile %15'inde görülen geniş hücre karsinoması ise akciğerin herhangi bir bölümünde ortaya çıkabilir ve hızlı bir şekilde büyüme/yayılma eğilimindedir. KHDAK vakalarının yaklaşık %40'unda görülen adenokarsinoma, genellikle sigara içimi ile ilişkilendirilmesine rağmen, sigara içmeyenlerde de görülebilen en yaygın akciğer kanseri tipidir. Akciğerin dış bölümlerinde bulunur ve diğer tiplere göre daha yavaş büyüme eğilimi sergiler (Langevin vd 2014). Çalışmamızda kullanılan NCI-H1975 (KHDAK, ATCC CRL-5908™) hücre hattı, KHDAK tiplerinden en yaygın olarak görülen adenokarsinom özelliğe sahiptir. Bu hücre hattı ilk primer kültür olarak sigara içmeyen Kafkas bir kadından izole edilmiştir (ATCC).

Günümüzde uygulanan KHDAK tedavileri, uzun dönem sağ kalım oranlarındaki düşüklük nedeni ile yetersiz kalmaktadır. Kemoterapi ve ışın tedavisi gibi geleneksel tedaviler, hastalara bir yılı aşmayan sağkalım süresi sunabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda tedavilerin daha etkili hale getirilmesi, ömür uzunluğunu arttırabilecek yeni alternatif tedavilerin ve biyolojik ajanların geliştirilmesi için yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir (Mendez vd 2011).

2.2 Hücre Ölümü

Hücre ölüm programları doku homeostasisi, gelişimi ve hücrel stres yanıtlarında rol alan mekanizmalardır (Blank ve Shiloh 2007). Hücre ölümünün morfolojik özellikleri, hücrel ölüm tiplerinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılan biyolojik belirteçlerdir (Ziegler ve Groscurth 2004). Hücre ölüm yollarındaki bozukluklar, hücrelerin ölümden kaçmasına ve sonuçta tümörögenezise yol açar (Blank ve Shiloh 2007).

2.2.1. Mitotik Hücre Ölümü (Mitotik Katastrof)

Mitotik katastrof olarak adlandırılan hücre ölümü, hücreler içinde iki ya da daha fazla mikronükleus oluşumu ile kendini gösteren anormal mitozun bir sonucudur (Blank ve Shiloh 2007). Mitotik katastrof hücre döngüsü kontrol noktalarının yetersizliğinden ve hücrede oluşan farklı hasarların birikmesinden kaynaklanır (Castedo vd 2004, Galluzi vd 2007).

Mitotik hücre ölümü için iki temel mekanizma önerilmektedir. Birincisi, çok kutuplu mitoz bölünmeyi takiben mikronükleus oluşumunu tetikleyen kromozomların anormal duplikasyonu olarak tanımlanabilir. Mitotik hücre ölümünün diğer mekanizması ise, DNA'sı hasarlı olan hücrelerle ilişkilidir. Bu hücrelerde mitotik hücre ölümü, CdkI'in düzensiz aktivasyonundan kaynaklanır. Ayrıca hasarı tamir edilememiş

hücrelerin erken mitoz girmeleri mitototik hücre ölümünün diğer bir nedenidir (Blank ve Shiloh 2007).

2.2.2. Nekroz

Hücre ölümünün bu tipi genellikle enfeksiyon, inflamasyon ya da iskemi gibi patofizyolojik olayların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Nekrozun en belirgin özellikleri; hücresel enerjinin tükenmesi, hücre membranının şişmesi ve kopması ile membran lipidlerinin hasarlanması, homeostatik iyon pompaları/kanallarının fonksiyonlarındaki kayıp ve apoptotik olmayan proteazların aktivasyonudur (Blank ve Shiloh 2007). Nekrotik hücrenin parçalanmış membranından hücresel içeriklerin ve öncül inflamatuvar moleküllerin hücreler arası boşluğa salınması inflamasyon yanıtı başlamasına yol açar (Jin ve El-Deiry 2005).

2.2.3. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie'nin yayınlarında hücre ölümünün farklı morfolojik yapısını tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr vd 1972, Paweletz 2001, Kerr 2002, Elmore 2007). Apoptoz, *Caenorhabditis elegans*'tan insana kadar tüm çok hücreli canlılarda görülen, evrimsel olarak çok iyi korunmuş bir mekanizmadır (Cummings vd 2004, Heemst vd 2007). Apoptoz hücre içinde dinamik olarak gerçekleşen bir olaydır ve çok hücreli organizmaların gelişiminde, dokularda hücre popülasyonunun sürdürülmesinde ve düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir süreçtir (Leist ve Jaattela 2001, Gewies 2003). Apoptoz, aynı zamanda fonksiyonu bozulmuş hücrelerin elenmesini sağlayan 'programlı' hücre ölümünün bir şekli olarak da tanımlanabilir. Hücre hacmindeki kayıp, plazma membran kabarcıkları, nükleer yoğunlaşma, kromatin kondensasyonu ve DNA'da endonükleotik parçalanma gibi özellikler apoptotik hücreler için karakterizedir (Hu ve Kavanagh 2003). Apoptoz sırasında hücre membranı asimetrisini kaybeder ve fosfatidilserin uçları hücre yüzeyinden dışarı çıkar. Bu sayede, makrofajlara bu hücrelerin parçalanmasıyla ilgili sinyaller gönderilmiş olur. Oluşan apoptotik cisimcikler fagositik hücrelerce yok edilir. Böylece çevre dokularda inflamasyona yol açmaz (Cohen 1998). Apoptoz, hücre büyüme ve bölünme sinyalleri, hücrede meydana gelen tamiri mümkün olmayan hasarlar, miktarı artan reaktif oksijen türleri gibi hücre içi sinyaller ve sitotoksik ajanlar, bazı kimyasallar, iyonize radyasyon gibi hücre dışı sinyaller ile düzenlenir (Formigli vd 2000, Debnath vd 2005, Elmore 2007).

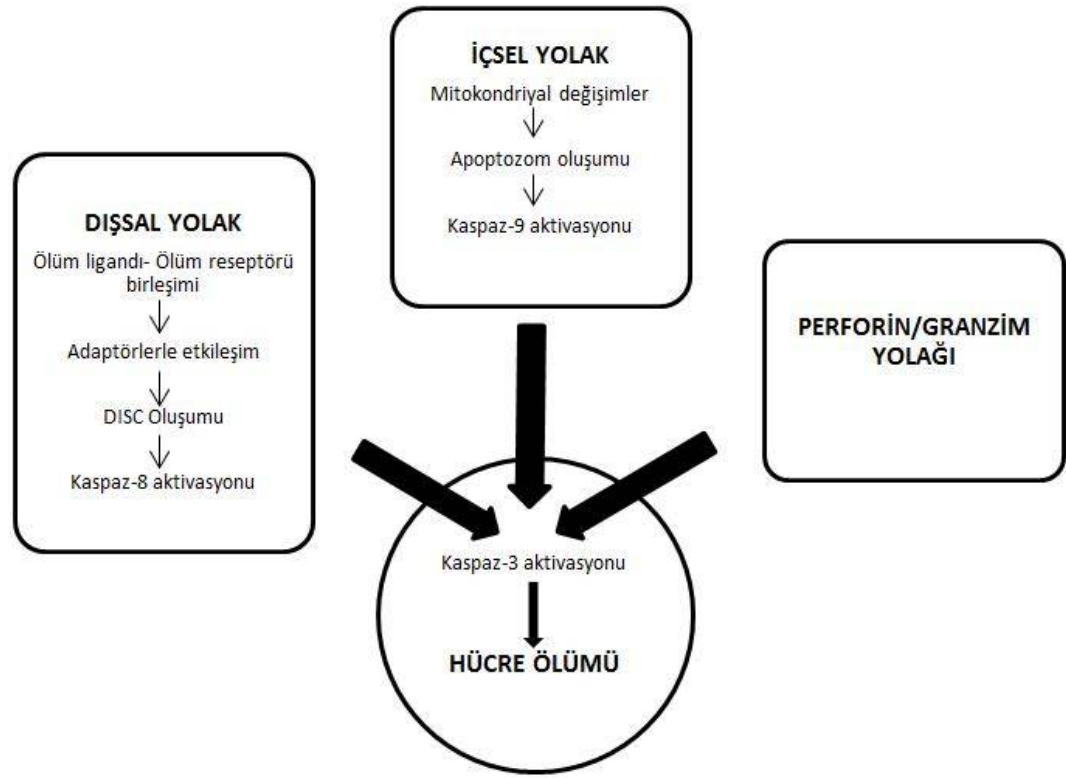
Apoptoz sürecinde meydana gelen olaylar sırasıyla; hücrede tamir edilemeyen hasarlar sonucunda DNA'nın fragmentasyonu, kaspazların aktivasyonu, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin yıkımı, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimciklerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve en sonunda fagositik hücreler tarafından apoptotik cisimciklerin yok edilmesidir (Elmore 2007).

Apoptoz mekanizmasında, dışsal/ölüm reseptörü yolağı ve içsel/mitokondriyal yolak olmak üzere iki temel sinyal yolağı bulunmaktadır (Igney ve Krammer 2002). Bunlara ek olarak perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren apoptotik bir yolak daha olduğu ortaya çıkarılmıştır (Martinvalet vd 2005) (Şekil 2.2). Dışsal, içsel ve granzim B yolakları, aynı başlangıç noktasında ya da kaspaz-3'ün aktivasyonu ile aynı infaz yolağında kesişir (Elmore 2007).

Dışsal yolak Fas, TNF ya da TRAIL gibi hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile başlatılır. Ölüm ligandlarının uyarımı, ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (DISC), kaspaz-8 ve Fas-ilişkili ölüm domaininin varlığı ve reseptörlerin oligomerizasyonu ile sonuçlanır. DISC'te kaspaz-8'in otoaktivasyonu, hücre ölüm programının ilerletici efektörleri olarak fonksiyon gören kaspaz-3, -6 ve -7'nin aktivasyonu ile devam eder (Ashkenazi ve Dixit 1998, Zhaoyu ve Wafik 2005).

İçsel yolak, mitokondride kesişen farklı apoptotik uyarımların aracılığı ile başlatılır. Mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınır. Sitosolik sitokrom c, apoptozom olarak bilinen DISC benzeri kompleksi üretmek için apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf1) ve prokaspaz-9'a bağlanır. Apoptozom içerisinde kaspaz-9 aktifleşir ve kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açar. Böylece kaspaz kaskadı başlatılmış olur (Shi 2002, Zhaoyu ve Wafik 2005). İçsel yolaktaki olayların düzenlenmesi ve kontrolü Bcl-2 protein ailesinin üyeleri sayesinde olur (Cory ve Adams 2002, Elmore 2007). Mitokondriyal membran geçirgenliğinin artması sonucu mitokondriden sitokrom c salınımı Bcl-2 proteinleri sayesinde gerçekleşmektedir (Li vd 1998, Esposti 2002, Elmore 2007). Tümör supressör protein *p53*, Bcl-2 ailesi proteinlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar, ancak kesin mekanizma henüz tamamen açıklanmamıştır (Schuler ve Green 2001, Elmore 2007). Pro-apoptotik veya anti-apoptotik olabilen Bcl-2 ailesinin proteinleri mitokondriyal membran geçirgenliğinde rol oynar. Günümüzde, Bcl-2 ailesinde toplam 25 gen tanımlanmıştır. Bu aileye ait bazı önemli anti-apoptotik proteinler; Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, pro-apoptotik proteinler ise; Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, ve Blk'dır. Bu proteinler, hücrenin apoptoza gidip gidemeyeceğine karar vermesinde kritik bir öneme sahiptir (Li vd 1998, Esposti 2002, Elmore 2007).

Üçüncü bir yolak olarak tanımlanan Granzim B (GrB) yolağı, ilk kez granülositlerde keşfedildiği için Granülosit-enzim kelimelerini birleştirilmesiyle adlandırılmıştır. Granzim B, sitotoksik T hücrelerinden salgılanarak GrB reseptörlerine bağlanır. GrB bir serin proteazdır. Sitoplazma içine alınan GrB, kaspaz kaskadı üzerinden apoptozu başlatır (Darmon vd 1995, Martin vd 1996, Srinivasula vd 1996, Andrade vd 1998).



Şekil 2.2. Apoptozun şematik gösterimi

Kaspazlar, apoptotik sinyal ağında merkezi rol alan, apoptotik hücre ölümünün gerçekleşebilmesi için her durumda aktifleşmesi gereken sistein proteazlardır. Sistein bağımlı aspartata özgül bu proteazlar, *Caenorhabditis elegans*'ın ced-3 geni ile homoloji gösterir (Bratton vd 2000, Gewies 2003). Kaspazlar, pentapeptit QACRG'nin oldukça korunmuş, aktif kısmındaki önemli sistein uçlarına bağlanarak katalitik aktivitelerini gösterirler ve substratlarını özellikle Asp uçlarından keserler (Denault ve Salvesen 2002, Richardson ve Kumar 2002, Gewies 2003). Kaspazların hücre içerisindeki substratları arasında; proapoptotik moleküller, apoptoz düzenleyicileri, yapısal proteinler, hücre DNA tamir proteinleri ve hücre döngüsü ile ilgili proteinler sıralanabilir (Degreterev vd 2003, Zhaoyu ve Wafik 2005).

Bilinen yaklaşık 14 tane memeli kaspazı vardır. Kaspazların pek çok özelliği ortaktır (Stennicke ve Salvesen 2000, Zhaoyu ve Wafik 2005). Kaspazlar, hücre içinde prokaspazlar olarak nitelendirilen inaktif zimojen granüller olarak sentezlenir (Denault ve Salvesen 2002, Gewies 2003).

Fonksiyonlarına bağlı olarak, kaspazlar 3 grupta sınıflandırılabilirler:

1. İnflamatuar kaspazlar: İnflamasyon için gerekli olan kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14'ü içerir.

2. Başlatıcı kaspazlar: Apoptoz mekanizmasını başlatan bu enzimler, reseptör moleküllerle ilişki kuran efektör ölüm (DED) (kaspaz-8 ve -10) ya da alıcı (CARD) (kaspaz -2, -9) prodomainlerine sahiptir.
3. Efektör kaspazlar: Bu yıkıcı sınıf (kaspaz-3, -6, -7) kısa bir prodomain bulundurmasıyla karakterizedir. Tipik olarak çok çeşitli hücrel substratların kesilmesiyle apoptozun infaz aşamasında rol oynar ve kendinden bir önceki kaspaz/kaspazlar tarafından aktive edilerek çalışırlar (Degretev vd 2003, Zhaoyu ve Wafik 2005).

Apoptozun anormal düzenlenmesi kansere yol açabilir. Tümör hücreleri sıklıkla kontrolsüz büyümeye izin veren normal apoptotik sinyallere karşı direnç geliştirir (Ashkenazi ve Dixit 1998). Kanser hücrelerinde apoptoza direnç geliştirilmesine yol açan iki temel mekanizma bulunmaktadır. Birincisi, somatik ya da somatik olmayan mutasyonlar ve proapoptotik moleküllerin ekspresyonundaki kayıp, ikincisi de apoptoz inhibe edici moleküllerin aşırı ekspresyonudur (Freedman vd 2004, Soung vd 2005, Ghavami vd 2009). Ayrıca apoptozun düzenlenmesindeki eksiklik, otoimmün hastalıklar ve/veya viral enfeksiyonların yayılmasına sebep olurken; nörodejenaratif hastalıklar, AIDS ve iskemik hastalıklar ise apoptoz mekanizmasının aşırı derecede aktivasyonu sonucu meydana gelir. (Fadeel 1999, Gewies 2003).

Hücrelerde DNA hasarının belirlenmesinden ve tamir edilememesinden sonra, hücreyi ölüme götüren apoptotik süreç, karsinogenezde mutant hücrelerin çoğalmasının engellemesinde de oldukça önemlidir (Foster 2008). Tümör hücreleri ile mücadelede proapoptotik sinyallerin aktivasyonu ya da antiapoptotik sinyallerin inhibisyonu kanser tedavisi için en kritik hedeflerdir (Freedman vd 2004, Soung vd 2005, Ghavami vd 2009).

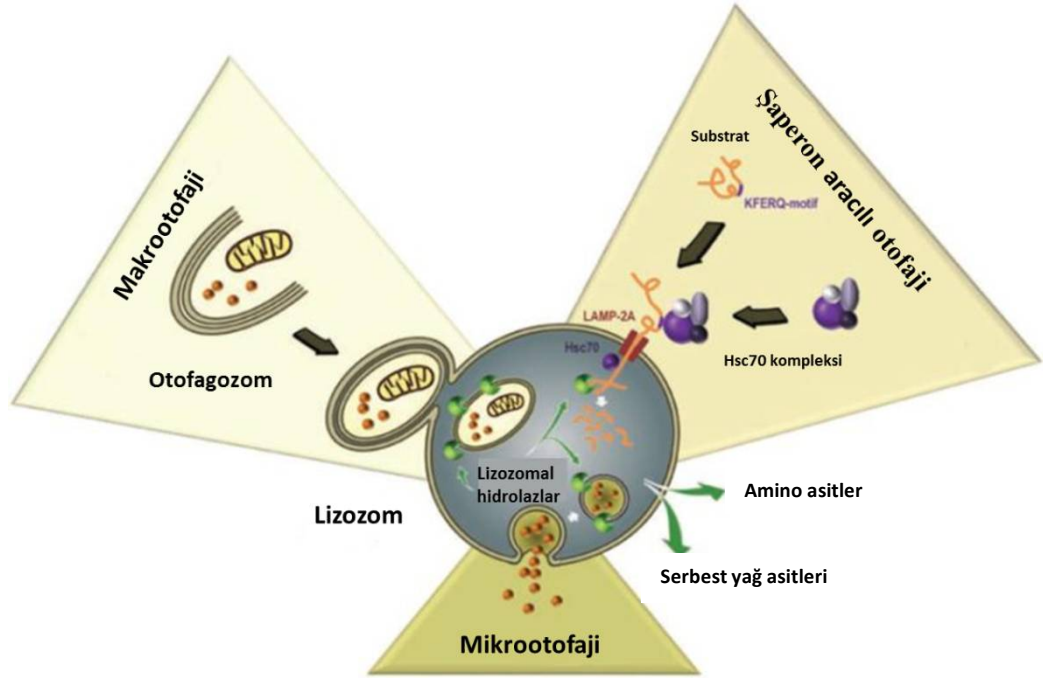
2.2.4. Otofaji

Otofaji, yunancada ‘oto’ (kendi) ve ‘faji’ (yemek) anlamında kullanılan kelimelerden türetilmiş bir terimdir. Evrimsel olarak oldukça korunmuş bir katabolik süreci ifade eden otofaji terimi; fizyolojik süreçlerde, gelişme ve farklılaşma sırasında hücrenin yeniden şekillenmesini, besin kıtlığında aminoasit üretimini ve hasarlı ya da istenmeyen organel ve/veya moleküllerin elenmesini sağlamaktadır (Mizushima vd 2008, Liu vd 2010).

Besin kıtlığında, hücre büyümesinin kontrolünde, yaşlanma karşıtı mekanizmalarda ve doğal bağışıklıkta gereksinim duyulan otofaji mekanizmasının düzenlenmesindeki aksaklıklar, kansere, kardiyomiyopatiye, kas hastalıklarına ve nörodejenaratif hastalıklara sebep olabilmektedir (Levine ve Klionsky 2004).

Otofajinin mikrootofaji, makrootofaji ve şaperon-aracılı otofaji olarak adlandırılan üç temel şekli vardır (Klionsky 2005, Massey vd 2006, Cecconi ve Levine 2008) (Şekil 2.3). Mikrootofaji, lizozom membranının içe çökmesi ile sitoplazmanın

doğrudan sindirilmesi olayıdır. Şaperon aracılı otofaji, KFERQ motifli proteinlerin lizozom zarına seçici biçimde taşınmasını sağlamaktadır. Makrotofaji ise, pek çok hücrede bazal düzeyde oluşur ve uzun ömürlü proteinler ile hasar görmüş organellerin parçalanmasında önemli rol üstlenir.

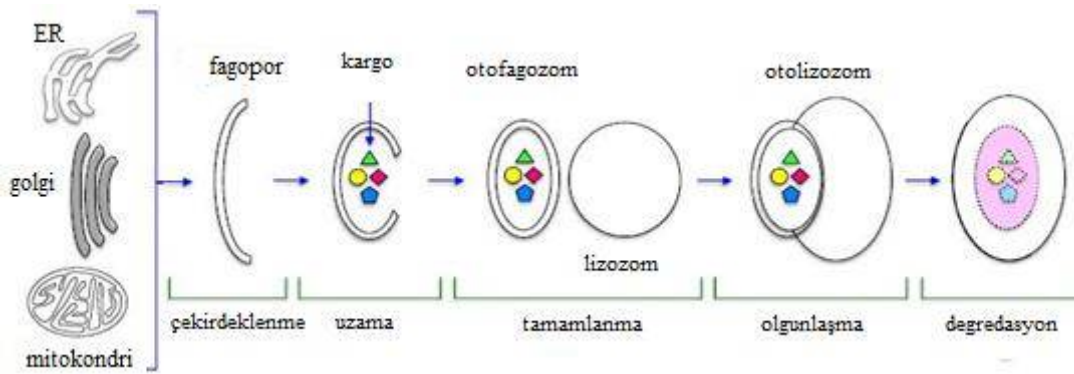


Şekil 2.3. Otofaji şekilleri (Wirawan vd 2012’den uyarlanmıştır)

Otofaji mekanizmasında rol oynayan, kısaca Atg genleri olarak adlandırılan genlerin çoğu, mayada yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde otuzdan fazla Atg geni tanımlanmıştır (Xie ve Klionsky 2007). Atg genleri, otofajinin başlatılması, otofagozomun oluşumu/olgunlaştırılması ve otofagozom içerisinde bulunan makromoleküllerin ve/veya organellerin parçalanması için gerekli olan proteinleri kodlar (Levine ve Yuan 2005).

Otofaji mekanizmasında meydana gelen en önemli olay, otofagozom ve otolizozomun oluşumudur (Aredia vd 2012). Bu oluşum sırasında, otofajik vezikülün biyogenezi için gerekli olan Atg8-fosfotidiletanolamin (Atg8-PE) ve Atg12-Atg5 ubikuitin benzeri konjugasyon sistemleri görev alır. Otofagozom oluşumunun ilk aşaması, çeşitli organeller ve plazma membranından orjinlenen, “otofajik kesecik” ya da bir başka deyişle “izolasyon membranı” olarak adlandırılan çift membranlı yapının oluştuğu çekirdeklenmedir (Öz Arslan vd 2011). Çekirdeklenme aşamasını, ‘otofaji oluşum merkezi’ (PAS) ile ilişkili bir protein kompleksini oluşturan Atg12-Atg5 heterodimerinin oluşumu düzenler (Xie ve Klionsky 2007, Öz Arslan vd 2011, Aredia vd 2012). Çekirdeklenme aşamasından sonra, otofaji oluşum merkezi genişleyerek, hasarlı organelleri veya yanlış katlanmış, uzun ömürlü proteinleri içeren sitosolik bileşenleri kaplar (Mizushima ve Levine 2010, Aredia vd 2012). ATG12, ATG5’e

bağlanırken, LC3-I (mikrotübül- ilişkili protein ışık zinciri 3) olarak adlandırılan maya ATG8'inin ortoloğu, PE (fosfatidiletanolamin) ile birleşir (Chen ve Klionsky 2011, Aredia vd 2012). Bu birleşim LC3-I'nin lipidlenmesini sağlar ve LC3-II oluşur. Ardından, hücre iskeleti ve lizozom membran proteinleri tarafından kontrol edilen olgunlaşma sürecinde, otofagozom, otolizozomu oluşturmak için lizozomla kaynaşır (Xie ve Klionsky 2007, Chen ve Klionsky 2011, Aredia vd 2012). Olgunlaşma sürecini takiben, otolizozomal içeriğin yağlara, şekerlere, proteinlere ve nükleotitlere metabolize edildiği yıkım süreci meydana gelir (Xie ve Klionsky 2007, Burman ve Ktistakis 2010, Chen ve Klionsky 2011, Aredia vd 2012) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Otofagozom ve otolizozomun oluşumu (Aredia vd 2012'den uyarlanmıştır)

Sitoplazma ve organellerin önemli bir kısmını yok eden, ancak belirli bir eşğin üzerinde meydana gelen otofajik aktivite, geri dönüşü olmayan hücresel atrofiye yol açar ve hücresel fonksiyonların tamamen çökmesine sebep olur (Lum vd 2005). Bu fonksiyon kayıpları, hücreleri otofajik hücre ölümüne yönlendirir.

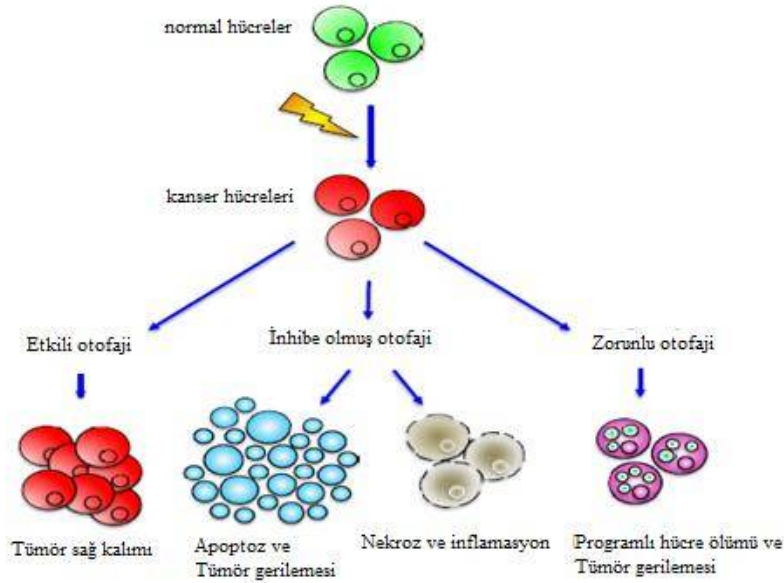
Otofajinin hücre ölümü olarak hedeflenebilecek bir mekanizma olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin östrojen reseptör antagonisti tamoksifen tarafından tetiklenen ölümü (Bursch vd 1996), lösemi hücrelerinin TNF- α 'ya bağlı ölümleri (Jia vd 1997), mide ve gliom hücrelerinin aktive olmuş Ras tarafından öldürülmesi (Chi vd 1999) ve sinir hücrelerinin büyüme faktörü eksikliğinden dolayı ölümleri (Xue vd 1999) otofajik ölüm mekanizmalarına örnek verilebilir. Ayrıca, L929 fare fibroblastları, U937 monosit hücreleri ve makrofajlarda bir kaspaz inhibitörü olan Z-VAD'ın yol açtığı ölümler (Shimizu vd 2004, Yu vd 2004, Xu vd 2006) ve Bax / Bak genleri sessizleştirilmiş fibroblastların etoposid ve staurosporin etkisi altında gözlenen ölümler, otofajik gen ifadelerinin baskılanması sonucu önlenebilmiştir. (Reef vd 2006).

Otofaji, hücrelerde uyarın çeşidine göre, tümör baskılayıcı ya da tümör oluşumunu teşvik edici bir mekanizma olarak işlev görebilir (Şekil 2.5). Tümör baskılayıcı özellikteki otofaji, genomik hasarlı hücrelerde kromozomal kararsızlığın

ortadan kaldırılmasını sağlar (Kang ve Avery 2008). Kanseri hücreleri, LC3-II ve Beclin1 olarak adlandırılan otofaji ilişkili proteinleri düşük seviyelerde ifade ederek, normal hücrelere oranla daha az otofajik aktivite sergilerler. White ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Beclin1'in ifade edilmediği farelerin erken embriyonik dönemde öldükleri gösterilmiştir. Aynı çalışmada, Beclin1 için heterozigot genotipe sahip farelerin yaşamlarına rağmen yabancıl tip farelerle kıyaslandıklarında, dört kat daha fazla spontan tümör oluşturdıkları da gösterilmiştir (Yue vd 2003, White vd 2011). Beclin1 geninin, prostat kanserlerinin %40'ında, göğüs kanserlerinin %50'sinde ve rahim kanserlerinin %75'inde hiç eksprese edilmediği gösterilmiştir. Ayrıca, Beclin1 geninin kolon kanserinde, beyin tümörlerinde ve hepatosellüler karsinomada normalden daha az eksprese edildiği bilinmektedir. Tüm bu veriler, otofaji mekanizmasında meydana gelen hasarın kanser gelişimi ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir.

Otofaji, sınırlı anjiyogenezisin neden olduğu besin kıtlığı ve hipoksi durumlarında, tümör hücrelerinde apoptozun inhibisyonuna sebep olur. Bu durum, tümör hücrelerinin ölüm mekanizmasından kaçarak hayatta kalmalarını sağlar (Hippert vd 2006). Kemoterapide kullanılan ajanlar arasında yer alan histon deasetilaz inhibitörleri, arsenik trioksit, imatinib ve rapamisin, insan kanser hücre hatlarında, otofajiyi indükledikleri gösterilmiştir (Dalby vd 2010). Bunun yanı sıra, radyasyon terapisi ve antiöstrojen hormonal terapi gibi antineoplastik terapiler de otofajiyi indüklemektedir (Hippert vd 2006). Otofaji ve apoptoz arasında en az üç farklı bağlantı olduğu bilinmektedir. Otofaji, apoptoza paralel olarak hücre ölümüne yol açabildiği gibi, apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir ya da apoptoz için bir ön koşul olabilir (Eisenberg-Lerner vd 2009). Otofaji, kendi başına hücre ölümüne sebep olmadan apoptotik hücre ölümüne yardımcı olabilmektedir (Öz Arslan vd 2011). Örneğin; besin kıtlığı sırasında otofaji ile hücre ATP seviyesinin korunması apoptozun önemli bir belirteci olan fosfotidilserinlerin hücre zarının dışına transferini sağlar (Qu vd 2007). Bazı durumlarda otofaji ve apoptoz hücrede birbirine zıt etkiler yapabilmektedir. Otofaji hücre ölümüne karşı bir hayatta kalma mekanizması şeklinde çalışarak, apoptozun durdurulmasına ve ölümün engellenmesine yol açmaktadır (Öz Arslan vd 2011).

Apoptoz ve otofajinin birlikte çalıştığını gösteren pek çok yayın bulunmaktadır. Apoptozu arttırdığı bilinen uyaranlardan etoposet, fare embriyonik fibroblast hücrelerinde (MEF), seramid de meme ve kolon karsinomalarında apoptozla beraber otofaji aktivasyonuna neden olmuştur (Pattingre vd 2009). İmatinib ile tedavi edilen Kaposi sarkomasında ve MG132 adlı proteozom inhibitörü ile muamele edilen PC3 prostat kanser hücrelerinde görülen ölümler de, apoptoz-otofaji işbirliğine verilebilecek örnekler arasında yer almaktadır (Yang vd 2006, Basciani vd 2007, Öz Arslan vd 2011).



Şekil 2.5. Kanser gelişiminde otofaji (Aredia vd 2012’den uyarlanmıştır)

Moleküler düzeyde otofaji yollarının apoptoz sistemi ile etkileşimlerinin olduğunu destekleyen pek çok yayın bulunmaktadır. Örneğin;

- Apoptoz düzenleyici moleküller olan Bcl-2, Bcl-xL, Bax ve Bak proteinleri, otofajik proteinlerden biri olan Beclin1 ile etkileşir ve bu etkileşim sayesinde otofaji sürecinin düzenlenmesi sağlanır (Shimizu vd 2004, Pattingre ve Levine 2006, Blank ve Shiloh 2007).
- Hepatositlerin TNF- α ile tedavisinde, lizozomal proteaz katepsin B’nin proapoptotik BH3-tek aile üyesi Bid’in aktivasyonunu sağlaması ve sitokrom c’nin mitokondriyal salınımını desteklemesi ile apoptoza katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Guicciardi vd 2000, Stoka vd 2001, Blank vd Shiloh 2007).
- P70S6K ve Akt’nin PDK-I (sınıf I PI3-K) tarafından fosforillenmesi, hem otofaji hem de apoptozu inhibe etmektedir (Vanhaesebroeck ve Alessi 2000, Blank ve Shiloh 2007).
- Apoptoz indükleyici ligand TRAIL, memeli asinisinde otofajiye aracılık etmektedir (Mills vd 2004, Blank ve Shiloh 2007).
- Apoptotik mekanizmada meydana gelen DNA fragmentasyonuna sebep olan bazı endonükleazlar lizozomlardan kökenlenir (Kessel vd 2000, Blank ve Shiloh 2007).
- Ölüm ilişkili protein kinazlar olan DAPk ve DPR-1, hem apoptotik tomurcuklanmayı hem de otofajik vakuol oluşumunu indükler (Inbal vd 2002,

Bialik ve Kimchi 2004, Bialik ve Kimchi 2006, Pattingre ve Levine 2006, Blank ve Shiloh 2007).

- g) Hücre içerisinde birçok metabolik süreçte işlev gören mTOR proteini, hem otofajinin hem de apoptozun düzenlenmesinde rol oynar (Proud 2004, Blank ve Shiloh 2007).

2.3. mTOR Protein Kompleksi

Rapamisin ilişkili protein (FRAP), rapamisin hedefi (RAPT1) ya da sirolimus efektör proteini (SEP) olarak da bilinen (Janus vd 2005) memeli rapamisin hedefi (mTOR), 289 kDa'luk bir Ser/Thr kinazdır. *Saccharomyces cerevisiae*'nin TOR1 ve TOR2 protein altbirimlerinin ortoloğudur. TOR, mayalardan memelilere kadar birçok canlıda ifade edilen evrimsel olarak korunmuş bir kinazdır. İnsan, fare ve rat mTOR proteinleri % 95 oranında benzerlik göstermektedir (Huang vd 2003).

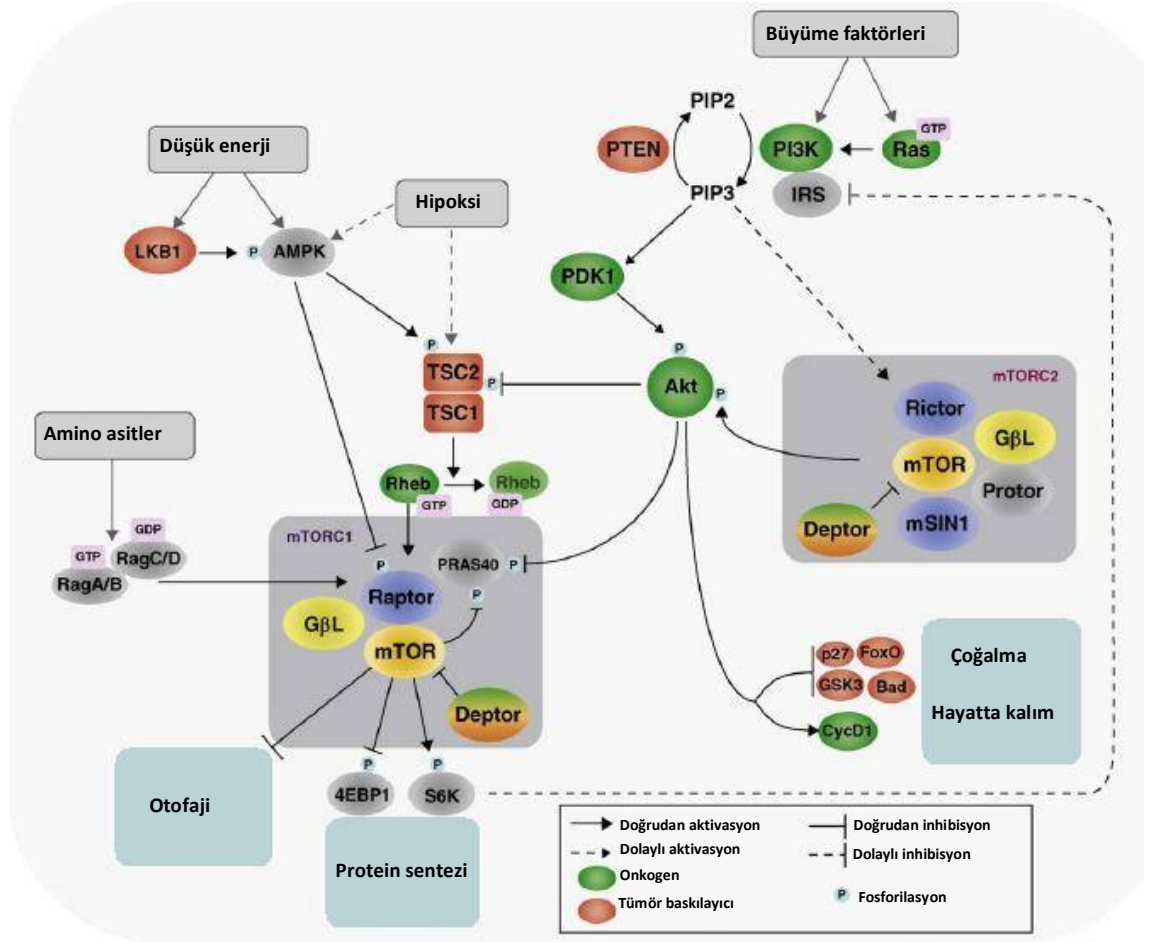
mTOR proteini beş domainden oluşur. Bunlar; katalitik kinaz domaini, FKBP12-rapamisin bağlayıcı (FRB) domain, C-terminal ucunun yanında oto-inhibitor domain, N-terminal ucunun yanında FAT (FRAP-ATM-TRRAP) domaini ve FATC (FAT C-terminal) domainidir. Ayrıca bu protein, 20'den fazla tekrarlı diziye sahip iki adet HEAT (Huntingtin, EF3, PP2A'nın bir alt birimi ve TOR) motifi taşımaktadır (Gingras vd 2001, Huang vd 2003) (Şekil 2.6). Proteinin C-terminalinde yer alan katalitik kinaz domaini, PI3K'nın lipit kinaz domainiyle homologtur. Bu yüzden, mTOR, PI3K-ilişkili kinaz ailesinin bir üyesi olarak kabul edilir. Bu ailenin üyeleri; hücre büyümesi, bölünmesi ve kontrolü, DNA'da meydana gelen hasarların kontrolü, telomer uzunluğunun sabit tutulması ve DNA rekombinasyonu gibi temel moleküler olaylarda rol oynamaktadır (Janus vd 2005). Hücre içerisinde besin kıtlığı olmadığı durumlarda, mTOR yolağı aktive olarak, hücrenin hayatta kalması, büyümesi ve çoğalması için gerekli olan proteinlerin biyosentezi sağlar (Arango vd 2009).



Şekil 2.6. mTOR domainlerinin şematik gösterimi (Huang vd 2003).

mTOR protein kompleksi, mTORC1 ve mTORC2 olarak adlandırılan ve farklı görevler üstlenmiş iki katalitik alt üiteden oluşur. mTORC1 ve mTORC2, farklı hücre fonksiyonları düzenleyen değişik substratları fosforiller. Örneğin; mTORC2, hücre hayatta kalımı ve hücre iskeletinin organizasyonunu kontrol eden, AKT, SGK1 ve PKC'yi fosforiller. Diğer yandan, mTORC1, kap-bağımlı transkripsiyon artışıyla hücre büyümesi ve çoğalmasını eIF-4E bağımlı proteinler ve S6 kinazlar aracılığı ile uyarır (Dowling vd 2010).

mTORC1 alt ünitesi, protein kompleksinin rapamisine duyarlı birimdir (Jung vd 2010) ve mTORC1 sinyali, pek çok sinyal kaskadı tarafından düzenlenir (Dowling vd 2010). Besin bolluğunda, TOR kinaz aktif hale gelir ve hücre büyümesine yol açan, hücre döngüsünün G1'den S fazına geçmesini kontrol eden proteinlerin translasyonunun başlamasına neden olan p70S6K ve eIF-4E'nin aktivasyonunu sağlar (Huang ve Klionsky 2007). Memeli hücrelerinde, S6KI ve 4EBP1'e mTOR sinyalinin iletimi, PI3K/AKT yolağının sinyal iletimine bağlıdır. Aktive olmuş AKT, TSC2'yi fosforiller ve mTOR inhibisyonunu sınırlandırır (Janus vd 2005). Tübero sklerozis kompleks (TSC1/TSC2), mTORC1 sinyalini inhibe etmek için upstream olarak fonksiyon görür. TSC1/TSC2'nin mTORC1 üzerindeki inhibe edici etkisine benzer şekilde, TSC2'nin aşırı ekspresyonu, mTORC1'in hedefleri 4E-BP ve S6K'ların fosforilasyonunu azaltır. 4E-BP ve S6K'ların fosforilasyonları, mTORC1'in bir bileşeni olarak tanımlanmış PRAS40 (proline zengin AKT substratı 40 kDa)'ın aşırı ekspresyonu tarafından da belirgin biçimde azaltılmaktadır. mTORC1 sinyalinin farklı kanser tiplerinde düzensiz olduğu bilinmektedir. Agresif olduğu ve zayıf prognoz gösterdiği bilinen bazı kanser tiplerinde, mTORC1'in downstream hedeflerinin fosforilasyonunun ve/veya ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, mTORC1 antikanser terapiler için önemli bir hedef olarak gösterilmektedir (Dowling vd 2010). Translasyonda önemli bir rolü olduğu bilinen mTORC1 altbiriminin bazı hücrel olaylarda da farklı roller üstlendiği gösterilmiştir. Örneğin, mTORC1 lizozomal mekanizmayla hücrel organelleri ve/veya uzun ömürlü proteinleri yıkarak otofajiyi inhibe eder (Codogno ve Meijer 2005) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. mTOR Yolağı (Efeyan ve Sabatini 2010'dan uyarlanmıştır)

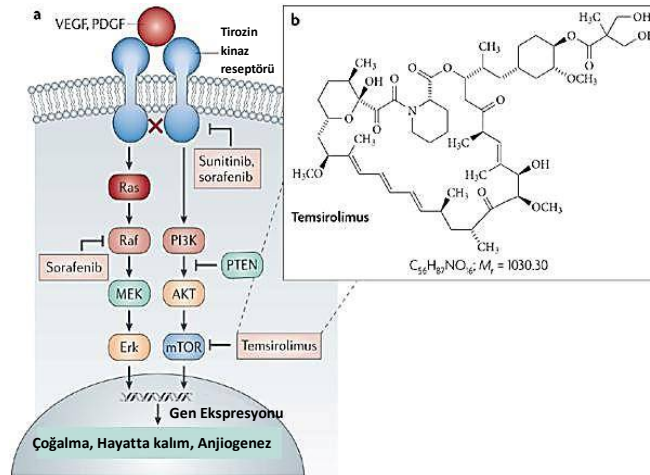
2.2.6. Temsirolimus (CCI-779)

Antikanser ilaç geliştirmek için yürütülen tüm çalışmaların temel amacı kanser hücrelerini seçici bir şekilde öldürebilecek etkili bir ilaç geliştirmektir. Bunu başarmadaki olası yollardan biri, sadece tümör hücreleri için spesifik ve toksik moleküler hedeflerin keşfidir. Bu bağlamda, hücre döngüsü kontrol noktalarını hedef alan yeni ajanların etkilerinin incelenmesi son yıllarda en dikkat çeken araştırma konuları arasında yer almaktadır (Janus vd 2005).

Rapamisin, doğal olarak meydana gelen, mTORC1'in spesifik, allosterik bir inhibitörü olarak davranan makrolit trien bir antibiyotiktir (Dowling vd 2010). Rapamisin, hücreleri G1 fazında yavaşlatmayı veya durdurmayı başaran bir sitostatik ajandır (Huang vd 2003). Rapamisin, hücre içi reseptörü FK506-bağlayıcı proteine (FKBP12) ve ardından oluşan bu kompleks mTOR'a bağlanır. Bu üçlü kompleksin oluşumundan sonra, mTOR'un p70S6K ve 4EBP'ye karşı kinaz aktivitesi zayıflar (Hui vd 2009).

Rapamisin'in sınırlı farmakolojik özellikleri, analoglarının sentezlenmesine sebep olmuştur (Fasolo ve Sessa 2008, Brachmann vd 2009). Rapamisin'in hem hücre çoğalması hem de büyümesini baskılama yeteneği (mTORC1 inhibisyonu yoluyla), rapamisin ve analoglarının potansiyel antikanser ajanlar olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Faivre vd 2006, Petroulakis vd 2006, Dowling vd 2010). Günümüzde 'rapaloglar' olarak bilinen bu türevler [CCI-779 (temsirolimus), RAD001 (everolimus), AP23573 (deforolimus)], klinik kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Fasolo ve Sessa 2008, Brachmann vd 2009). Bu çalışmalarda, rapamisinin (sirolimusun); temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001), deforolimus (AP23573) gibi analoglarının tek başlarına ya da bilinen kemoteröpatik ajanlarla kombine halinde kullanılmalarının otofajik hücre ölümünü arttırdığı gösterilmiştir (Vignot vd 2005).

Rapamisin'in çözülebilir ester formu, temsirolimus, başlangıçta antifungal bir ilaç olarak, sonrasında antikanser aktivitesinin fark edilmesiyle immünosupresif bir ajan olarak kullanılan doğal bir üründür (Rini 2008). Temsirolimus suda rapamisinden daha iyi çözünür (Hui vd 2009). Temsirolimus, rapamisine ek olarak C-40-O pozisyonunda dihidroksimetil propionik asit ester grubu içerdiğinden dolayı, damar içi uygulamadan sonra hızlıca hidrolize edilir (Liu vd 2009) (Şekil 2.8). Hücre döngüsü inhibitörü-779 (CCI-779) adı ile de bilinen temsirolimus 1990'larda tanımlanmış ve sonraki yıllarda antikanser özellikleri araştırılmaya başlanmıştır (Peralba vd 2003, Rini 2008). Temsirolimus, Wyeth Ayerst'deki araştırmacılar tarafından tümör çoğalmasını geciktirici bir sitostatik ajan olarak tanımlanmıştır (Vignot vd 2005).



Şekil 2.8. Temsirolimus'un açık formülü ve etki mekanizması (Rini vd 2007'den uyarlanmıştır)

Temsirolimus, ilerlemiş böbrek hücre karsinoması tedavisinde kullanılmak için onaylanmıştır. Bu ajan, hücre içi protein FKBP-12 ile bir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks hücre döngüsünün kontrolünde ve anjiyogeneizde gerekli proteinleri downregüle edici mTOR sinyalini inhibe eder (Hay ve Sonenberg 2004, Del Bufalo

2006, Abraham 2007). mTOR'un farmakolojik inhibisyonu, hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişini azaltır (Pene vd 2002, Vignot vd 2005).

Temsirolimus'un, akciğer, göğüs, yumurtalık, prostat, baş-boyun kanserlerinde, glioblastoma, melanoma ve lösemide, tek başına veya bilinen çeşitli kemoteröpatik ilaçlarla kombine tedavilerinin antitümör etkisi olduğu gösterilmiştir (Gomez-Martin vd 2005). PC-3 ve DU 145 (prostat kanser hücreleri) hücre hatlarında büyümeyi baskıladığı, bazı meme kanseri hücre hatlarında ise antianjiogenik etkisi olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, NCI-H460 ve A549 hücre hatları üzerinde ilacın tek başına ve mTOR protein yolağıyla bağlantılı olan Akt proteini inhibitörü GSK690693 ile kombinasyonunun, hücrelerde antitümör etki yarattığı gösterilmiştir (Jeong vd 2012).

Temsirolimus ile tedavi edilmiş meme karsinoma, endometrial karsinoma ve mantle hücreli lenfoma hastalarının tümör histolojilerindeki moleküler anormallikleri incelemek adına yapılan klinik çalışmalarda, ilacın çeşitli yolaklarda etkin olduğu ortaya çıkarılmıştır (Dancey 2006). Meme kanseri hastalarında temsirolimus'a verilen yanıtta PTEN mutasyonu ve/veya HER-2 aşırı ekspresyonu göze çarpmaktadır. MCL'li hastalarda temsirolimus'un aktivitesi siklin D1'in hiperekspresyonu ile ilişkilidir. Temsirolimus siklin D'nin translasyonunu inhibe eder ve hem mRNA hem de protein seviyesinde siklin D1'in turnover'ını hızlandırmaktadır. Siklin D1'in baskılanması, pRB fosforilasyonu ve G1'in ilerlemesi için gerekli olan aktif cdk4/siklin D1 kompleksinin ekspresyonunda azalma ile sonuçlanır. Hem glioblastoma hem de endometrial karsinoma sıklıkla PTEN'den yoksundur. PTEN kaybı PI3K yolağında bir sinyal artışı meydana getirmektedir ve bu durum temsirolimus'a duyarlılığı arttırmaktadır (Muisse-Helmericks vd 1998, Takuwa vd 1999, Decker vd 2003). Ancak, endometrial kanser hastalarından elde edilen bu bulgulara karşı glioblastoma hastalarında ilacın sergilediği etkiler PTEN'den farklı mekanizmaların da mTOR inhibitörlerinin hedefleri olabileceğini göstermektedir (Decker vd 2003).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

Çalışmamız kapsamında ATCC'den temin edilen NCI-H1975 hücre hattı (küçük hücreli dışı akciğer kanser hücresi, ATCC CRL-5908) deney grubu, 293T hücre hattı (böbrek epitel hücre hattı, ATCC CRL-11268) ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Hücre hatlarının her ikisi de %10 FBS (Fetal Bovin Serum) ve %2 glutamin ile desteklenmiş DMEM besiyerinde çoğaltılarak, %5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübe edildi. Hücreler, ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1: 3 ya da 1: 6 oranında olacak şekilde pasajlandı. Kullanılmayan hücreler %95 besiyeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan solüsyon içerisinde -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2. İlacın Hücrelere Uygulanması

Temsirolimus %1 DMSO içerisinde çözüldü ve hazırlanan 1mg/ml'lik ana stoklar alikotlanarak -20°C'lik derin dondurucuda saklandı. Deneylerin tümünde %1'lik DMSO'nun da hücre canlılığı üzerine etkisi araştırıldı. Hücreler stoktan açılarak küçük petri kaplarında çoğaltıldı ve petri kapları %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik süre ardından besiyerleri uzaklaştırılıp Temsirolimus'un 1mg/ml'den başlayarak 0.9 µg/ml'ye kadar %1'lik FBS içeren besiyerinde yarı yarıya dilüsyon ile hazırlanmış dozları, hücrelere uygulandı. İlaç uygulamasının hemen ardından tek bir sıra kuyucuktaki hücre canlılığı saptandı (Sıfırncı zaman). Her biri kendi içinde 6 kez olmak üzere toplamda üç farklı deney seti hazırlandı ve elde edilen değerlerin ortalamasına bakılarak, ilaç için uygulama doz aralığı 0.9 µg/ml – 62.5 µg/ml olarak belirlendi. 24, 48 ve 72 saat olarak belirlenen inkübasyon süreleri sonrasında hücrelerin canlılığı aşağıda belirtilen hücre canlılık testi ile değerlendirildi.

3.3. WST-1 Hücre Proliferasyon Kiti

WST-1 hücre proliferasyon kiti (Rosche, Kat. No: 11 644 807 001) kullanılarak ilacın sitotoksik etkisi araştırıldı. WST-1 testi, canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin WST-1'i parçalayarak çözülebilir formazan tuzları oluşturması esası ile ölçmektedir (Liu vd 2012).

Hücreler stoktan açılarak küçük petri kaplarında çoğaltıldı ve petri kapları %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik süre ardından besiyerleri uzaklaştırıldı. İlaç için en yüksek doz olarak belirlenen 62.5 µg/ml'den başlayarak, %1'lik FBS içeren besiyerinde hazırlanan ilaçlar, her birine 200 µl olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve ardından 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerince %5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

Her bir inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki besi yerleri çekilip 90 µl serumsuz besiyeri üzerine 10 µl WST-1 solüsyonu eklendi ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda plakların absorbans değerleri spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi.

3.4. Kolorimetrik proteaz (Kaspaz 2,-3,-6,-8,-9) Kiti

Kolorimetrik proteaz (Kaspaz 2,-3,-6,-8,-9) kiti (İnvitrogen, Kat. No:KHZ1001) kullanılarak apoptoz mekanizmasında yer alan önemli bazı kaspaz aktivitelerinde değişim olup olmadığı saptandı. Kit içerisinde her bir kaspaz için, p-nitroanilin ile işaretlenmiş, spesifik substratlar; VDVAD (kaspaz-2), DEVD (kaspaz-3), VEID (kaspaz-6), IETD (kaspaz-8) ve LEHD (kaspaz-9) bulunmaktadır. Kaspaz enziminin aktivitesine bağlı olarak kendi substratını kesmesi sonucu kromofor özellikteki pNA kısmı serbest kalır ve serbestleşen pNA'nın miktarı spektrofotometrik olarak belirlenebilmektedir (Thornberry ve Lazebnik 1998).

Kaspaz enzim aktivitesi ölçümü için hücreler, kitte önerildiği üzere 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 5 ml'lik besiyerlerinde küçük petrilere bölündü. Temsirolimus için sitotoksik olduğu belirlenen 0.9 µg/ml'lik doz, %1'lik FBS (Fetal Bovin Serum) içeren besi yerinde hazırlanıp, her biri ikişer tekrarlı olan petrillerdeki hücrelere, petri başına beşer ml uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde 37°C'de %5 CO₂'li atmosferde inkübasyona bırakıldı.

Her bir inkübasyon süresi sonunda petrillerdeki hücrelerin besi yerleri uzaklaştırılıp, hücreler, üzerlerine üçer ml PBS eklenerek kazıyıcı yardımıyla hassas bir biçimde kaldırıldı. Toplanan hücreler ependorflara aktararak alikotlandı ve sıvı azot içerisinde dondurularak -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Tüm inkübasyon süreleri sonunda toplanan hücrelere buz içerisinde bekletilen lizis tamponundan 200 µl eklendi ve beş dakika buz/alkol karışımında ardından beş dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üç kez tekrarlanan bu işlem sonrasında hücreler $10.000 \times g$ 'de bir dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar alınarak yeni ependorflara aktarıldı. Elde edilen süpernatantlardaki protein miktarlarını belirlemek için Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Kat. No: 23225) kullanıldı. Bovine serum albumin 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml'lik konsantrasyonlarda hazırlanarak standart protein olarak kullanıldı. Spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda örneklerin absorbansları ölçüldü ve yapılan hesaplamalarla içerdikleri protein miktarları belirlendi. Her bir örnek, 50 µl'de 200 µg/ml protein olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı. Kaspaz kolorimetrik proteaz kiti (İnvitrogen, Kat. No:KHZ1001) protokolü izlenerek kaspaz -2,-3,-6,-8,-9 aktiviteleri belirlendi.

3.5. mTOR (pSer2448) Elisa Kit

Temsirolimus'un 0.9 µg/ml'lik dozunun, hücrelerdeki mTOR proteinin aktivitesi üzerine sergilediği etki, mTOR (pSer2448) Elisa Kit (Kat: ab168538) kullanılarak tayin

edildi. Proteinin aktivite tayini, Ser2448'den fosforillenmiş mTOR proteininin miktarının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Wang vd 2008).

mTOR protein aktivitesi ölçümü için hücreler, kitle önerildiği üzere 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde 5 ml'lik besiyerlerinde küçük petrilere bölündü. Temsirolimus'un 0.9 µg/ml'lik dozu, %1'lik FBS (Fetal Bovin Serum) içeren besi yerinde hazırlanıp, her biri ikişer tekrarlı olmak üzere bölünmüş olan petrillerdeki hücrelere, petri başına beşer ml olacak şekilde uygulandı. Hücreler 24, 48 ve 72 saatlik zaman dilimlerinde 37°C'de %5 CO₂'li atmosferde inkübasyona bırakıldı.

Her bir inkübasyon süresi sonunda petrillerdeki hücrelerin besi yerleri uzaklaştırılıp, hücreler, üzerlerine üçer ml PBS eklenerek kazıyıcı yardımıyla hassas bir biçimde kaldırıldı. Toplanan hücreler ependorflara aktararak alikotlandı ve sıvı azot içerisinde dondurularak, -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Tüm inkübasyon süreleri sonunda toplanan hücrelere proteaz inhibitör kokteyli içeren mTOR ekstraksiyon tamponundan birer ml eklendi. Ardından hücreler 13000 x g'de yirmi altı dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar yeni ependorflara aktarıldı. Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Kat. No: 23225) kullanılarak protein miktarları belirlenen her bir örnek, 50 µl'de 200 µg/ml protein olacak şekilde sulandırıldı ve mTOR (pSer2448) Elisa Kit (Kat: ab168538) protokolü izlenerek mTOR proteinin aktivitesi belirlendi.

3.6. İstatistiksel Analiz

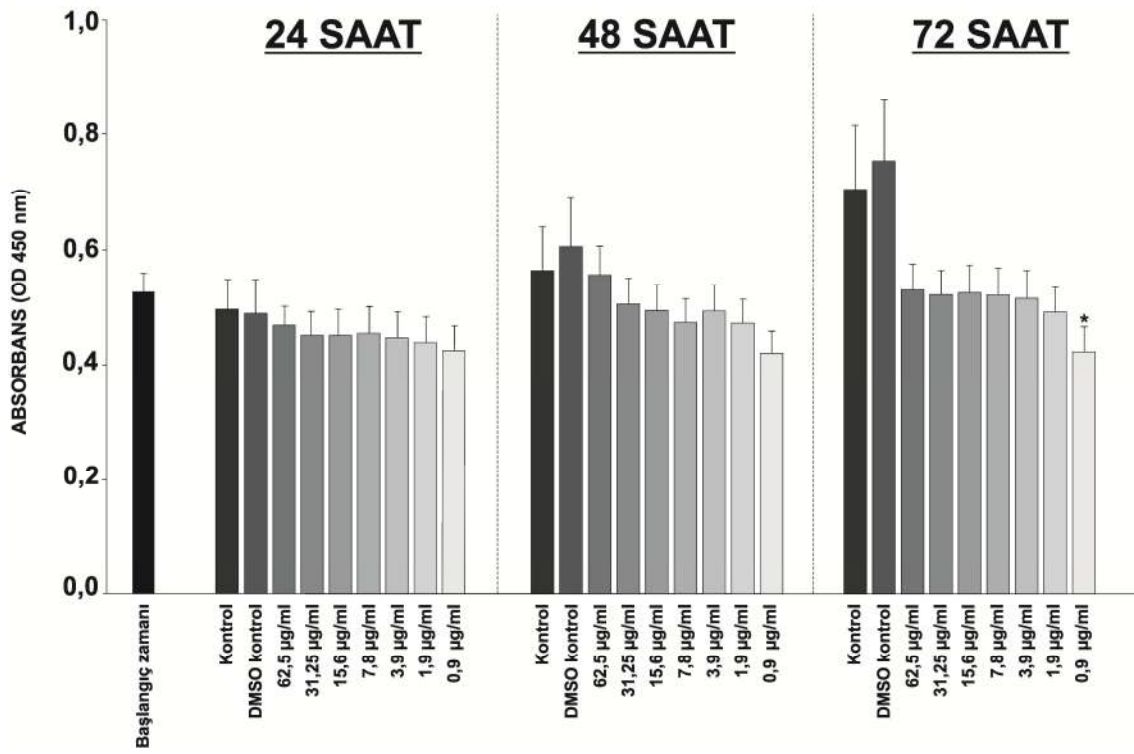
Deney sonuçlarından elde edilen verilerde, kontrol grubu ve deney grubu arasındaki farklılık Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve ardından Dunnet Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak değerlendirildi. Enzim aktiviteleri ile ilgili deneylerden elde edilen veriler ise Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve tüm grupların birbiri ile karşılaştırılmasını sağlayan Tukey Testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm veriler ortalama $\pm$ SEM değerleri halinde, Sigma Plot 10.0 programı kullanılarak grafik haline getirildi.

4. BULGULAR

4.1. Temsirolimus'un NCI-H1975 ve 293T Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Etkiler

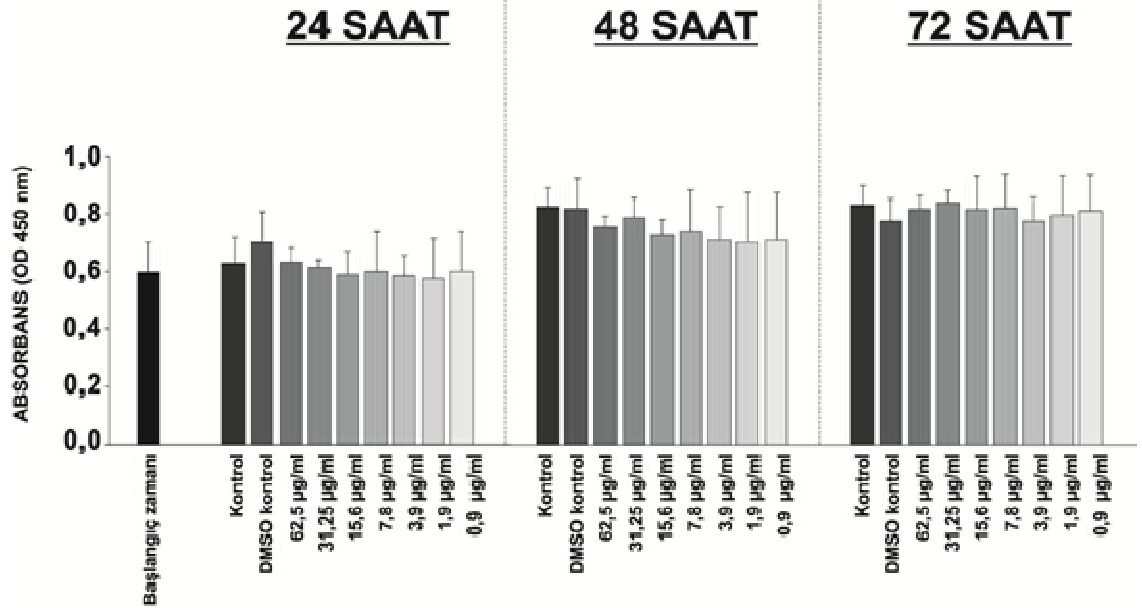
Temsirolimus %1'lik FBS içeren besiyerinde 1mg/ml'den başlayarak 0.9 µg/ml'ye kadar yarı yarıya dilüsyon ile hazırlanmış dozlarda, 96 kuyucuklu steril plaklara 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünen hücrelere uygulandı. Kendi içerisinde altı tekrar ve birbirinden bağımsız üç deney seti halinde gerçekleştirilen bu doz tarama çalışmalarında, temsirolimus NCI-H1975 hücre hattı üzerinde her bir inkübasyon süresi için farklı dozlarda sitotoksik etkiler sergiledi. Ancak sitotoksik olduğu belirlenen, 0,9 µg/ml dışındaki, tüm dozlarda kontrol olarak kullanılan 293 T hücreleri üzerine de benzer sitotoksik etkiler sergilediği saptandı. Amacımız temsirolimus'un sadece NCI-H1975 hücreleri üzerinde seçici sitotoksik etki sergilediği dozu bulabilmek olduğu için; doz aralığı önce 250, ardından 62.5 µg/ml'den başlanarak 0.9 µg/ml'ye kadar incek şekilde yenilendi. Deneyler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için kendi içerisinde altı tekrar ve birbirinden bağımsız üç deney seti halinde yinelenildi. Yapılan çalışmalar sonunda temsirolimus'un, NCI-H1975 hücre hattında seçici sitotoksik etkiyi sadece 0.9 - 62.5 µg/ml'lik doz aralığında sergilediği sonucuna ulaşıldı. Daha sonra yapılan denemelerde, temsirolimus'un her iki hücre hattında sergileyebileceği sitotoksik etkiler bu doz aralığında araştırıldı. Ayrıca, temsirolimus'un çözücüsü olarak kullanılan %1'lik DMSO, hiçbir inkübasyon süresinin sonunda hücreler üzerinde sitotoksik bir etki yaratmadı.

24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda; 0.9 µg/ml - 62.5µg/ml doz aralığında denenen temsirolimus, NCI-H1975 hücre hattı üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermedi. Ancak, 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda denenen en düşük doz olan 0.9 µg/ml'de, diğer inkübasyon süreleriyle karşılaştırıldığında, hücre canlılığının azaldığı ve sıfırcı zamanda elde edilen değerin altına düştüğü gözlemlendi (*, $p < 0.05$). Temsirolimus'un NCI-H1975 hücre hattı üzerindeki etkisi grafiklendirilerek Şekil 4.1'de gösterildi.



Şekil 4.1. Temsirolimus'un 0.9 µg/ml - 62.5 µg/ml doz aralığında, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, NCI-H1975 hücre hattı üzerine etkisi

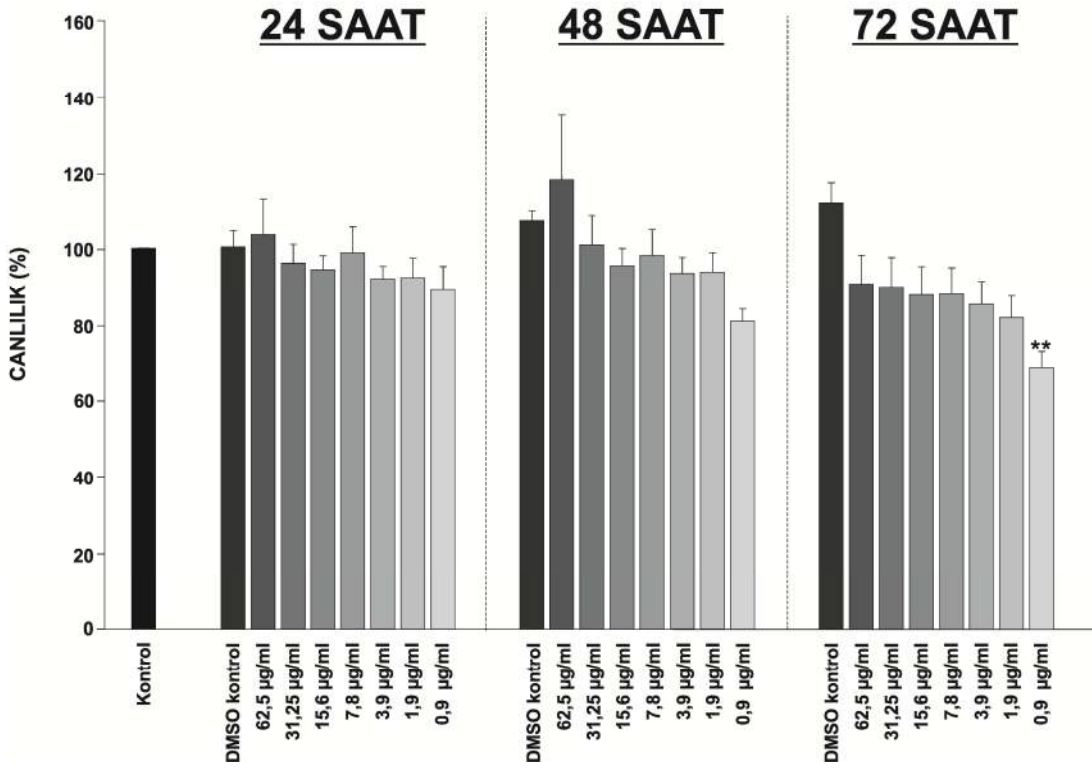
Temsirolimus, 0.9 µg/ml - 62.5 µg/ml doz aralığında, denenen hiçbir inkübasyon süresinin sonunda 293 T hücre hattının üzerinde sitotoksik etki göstermedi. Temsirolimus'un 293 T hücre hattı üzerindeki etkisi grafiklendirilerek Şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2. Temsirolimus'un 0.9 µg/ml - 62.5 µg/ml doz aralığında, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 293 T hücre hattı üzerine etkisi

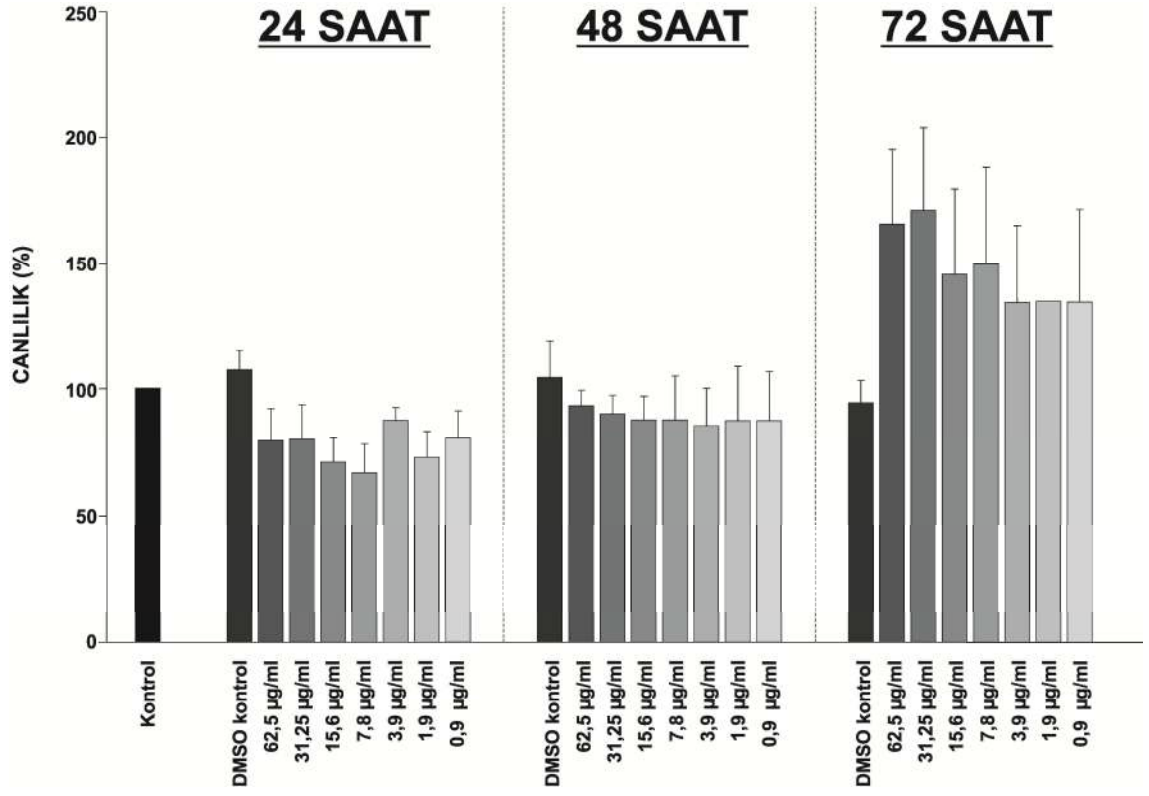
Temsirolimus'un 72 saatlik inkübasyon süresinde NCI-H1975 hücresi üzerinde sitotoksik olan ancak 293 T hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etki yaratmadığı belirlenen 0.9 µg/ml'lik konsantrasyonu etkin doz olarak saptandı ve bundan sonraki deneylerde kullanılmak üzere belirlendi. Sitotoksikite testinden elde edilen absorbans değerleri kullanılarak her iki hücre hattı için de hücre canlılıkları belirtilen formül kullanılarak hesaplandı (Shang vd 2009): $\text{Hücre canlılığı}(\%) = \left[\frac{\text{OD450 temsirolimus}}{\text{OD450 kontrol}} \times 100 \right]$.

Hesaplamalar sonucu elde edilen değerlerin her biri kendi kontrol grubu ile kıyaslanarak grafiklendirildi (Şekil 4.3). 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri boyunca, temsirolimus'un 0.9 µg/ml - 62.5 µg/ml aralığında hazırlanan dozlarıyla muamele edilen NCI-H1975 hücre hattında, ilacın hiçbir dozu 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış ya da artışa sebep olmadı. Ancak, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, ilacın 0.9 µg/ml'lik dozunun hücre canlılığında %31.4'lük bir azalışa sebep olduğu bulundu (**, $p < 0.01$).

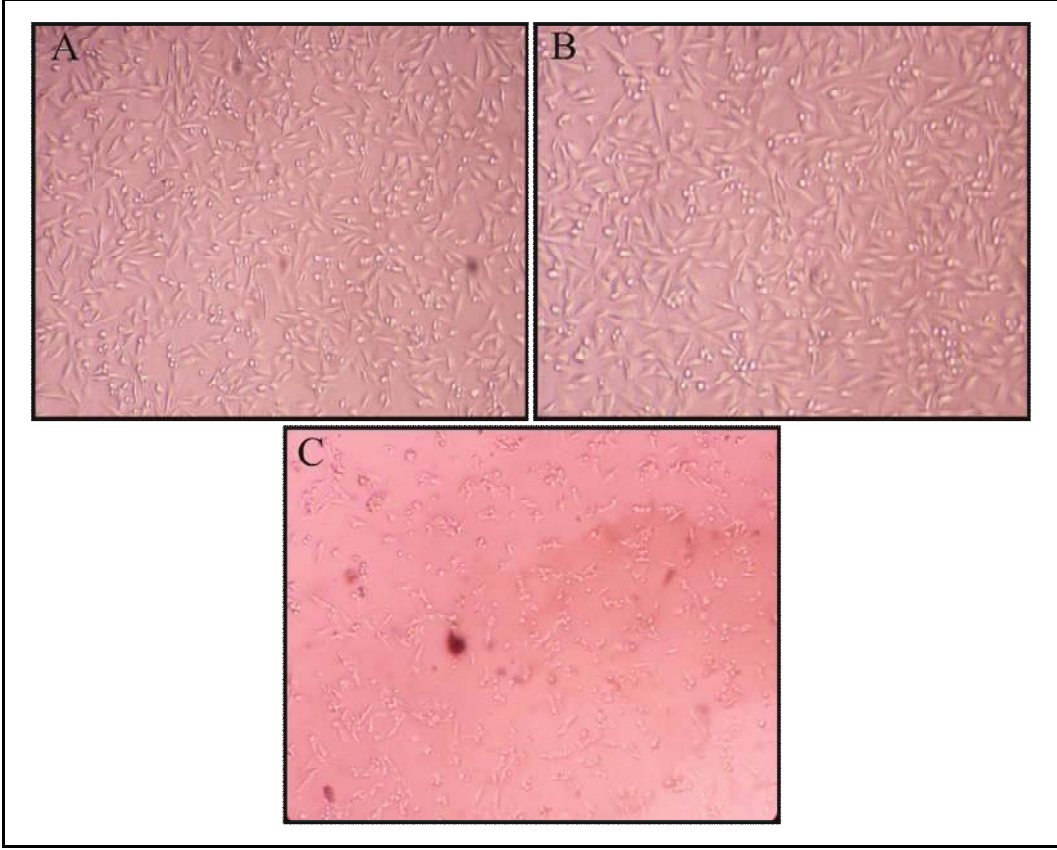


Şekil 4.3. Temsirolimus'un 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, NCI-H1975 hücre hattı üzerindeki hücre canlılığına etkisi (%)

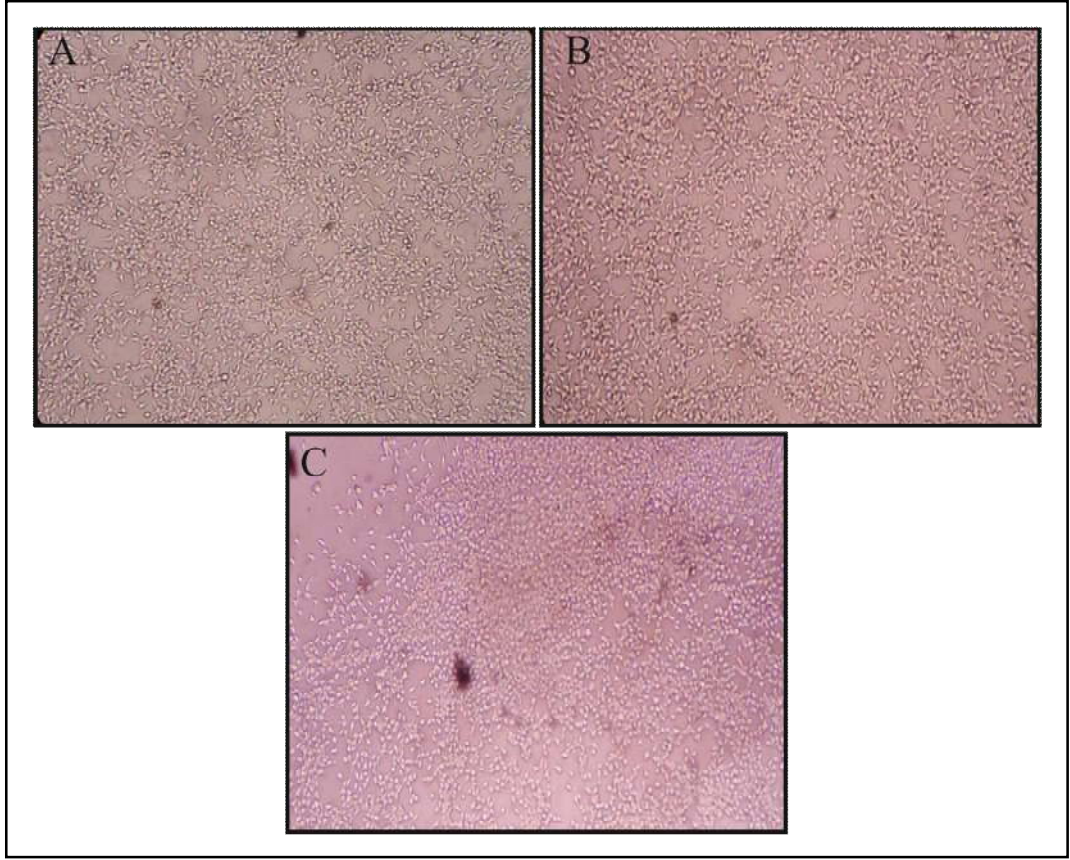
Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucu, temsirolimus'un 0.9 µg/ml - 62.5 µg/ml doz aralığında, 293T hücre hattında, belirlenen tüm inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa sebep olmadığı saptandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Temsirolimus'un 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 293 T hücre hattı üzerindeki hücre canlılığına etkisi (%)



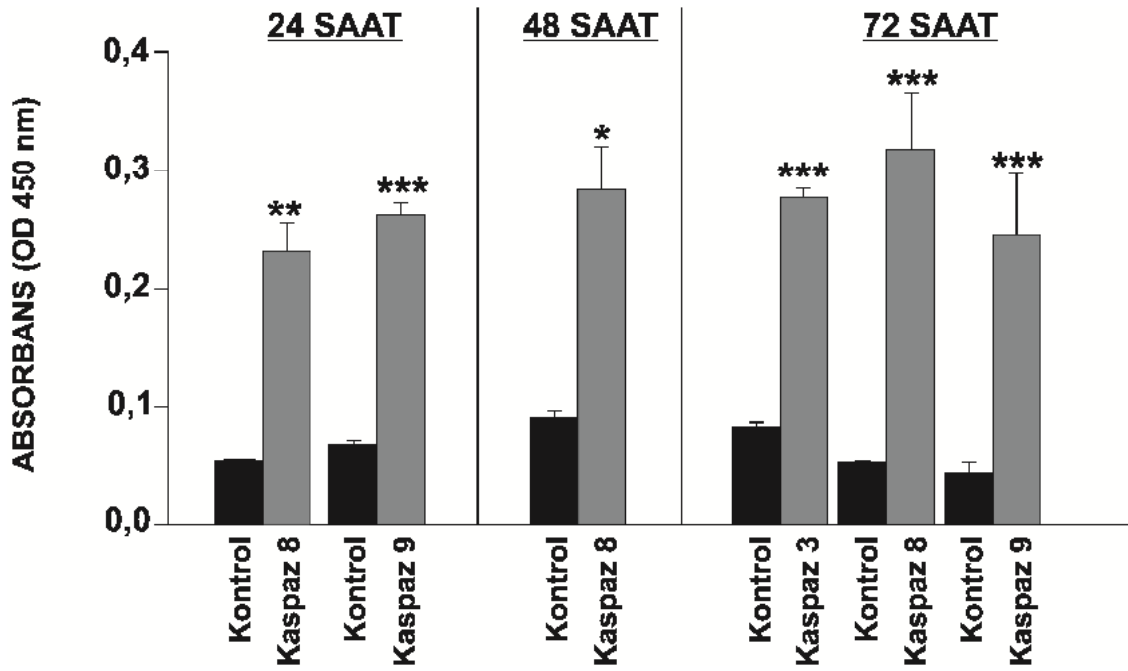
Şekil 4.5. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünmüş, $0.9 \mu\text{g/ml}$ temsirolimus ile muamele edilen NCI-H1975 hücrelerinin görüntüleri; **(A)** Kontrol, **(B)** DMSO Kontrol, **(C)** $0.9 \mu\text{g/ml}$ temsirolimus. (Labomed inverted doku kültürü mikroskobu (Seri no: TCM 400) kullanılarak, Sony fotoğraf makinesi (Seri no: DSC-W610) ile çekilmiştir.)



Şekil 4.6. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünmüş, $0.9 \mu\text{g/ml}$ temsirolimus ile muamele edilen 293 T hücrelerinin görüntüleri; **(A)** Kontrol, **(B)** DMSO Kontrol, **(C)** $0.9 \mu\text{g/ml}$ temsirolimus. (Labomed inverted doku kültürü mikroskobu (Seri no: TCM 400) kullanılarak, Sony fotoğraf makinesi (Seri no: DSC-W610) ile çekilmiştir.)

4.2. Temsirolimus'un NCI-H1975 ve 293 T hücre hatlarında kaspaz -2, -3, -6, -8 ve -9 aktiviteleri üzerine etkisi

24 saat inkübasyon süresi sonunda, 0.9 µg/ml temsirolimus uygulanan NCI-H1975 hücre hattında, kaspaz -2, -3 ve -6 aktivitesinde istatistiksel bir artış saptanmadı ($p > 0.05$). Ancak, kaspaz -8 ve -9 aktivitesinde sırasıyla; 3.8 kat (**, $p < 0.01$) ve 3.9 kat (***, $p < 0.001$) artış gözlemlendi. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, 0.9 µg/ml temsirolimus uygulanan hücrelerde kaspaz-2, -3, -6 ve -9 aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli olan bir artış saptanmadı ($p > 0.05$). Ancak aynı inkübasyon süresi sonunda, kaspaz-8 aktivitesinde 2.82 kat (*, $p < 0.05$) artış gözlemlendi. 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, 0.9 µg/ml temsirolimus uygulanan hücrelerde kaspaz-2 ve -6 aktivitelerinde artış saptanmazken, kaspaz-3, -8 ve -9 aktivitesinde sırasıyla; 3.43, 5.01 ve 5.67 kat (***, $p < 0.001$) artış olduğu hesaplandı. Temsirolimus'un kaspaz aktiviteleri üzerine etkisi, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, her biri kendi içerisinde ve her kaspaz kendi kontrolüyle kıyaslanarak grafiklendi (Şekil 4.7).

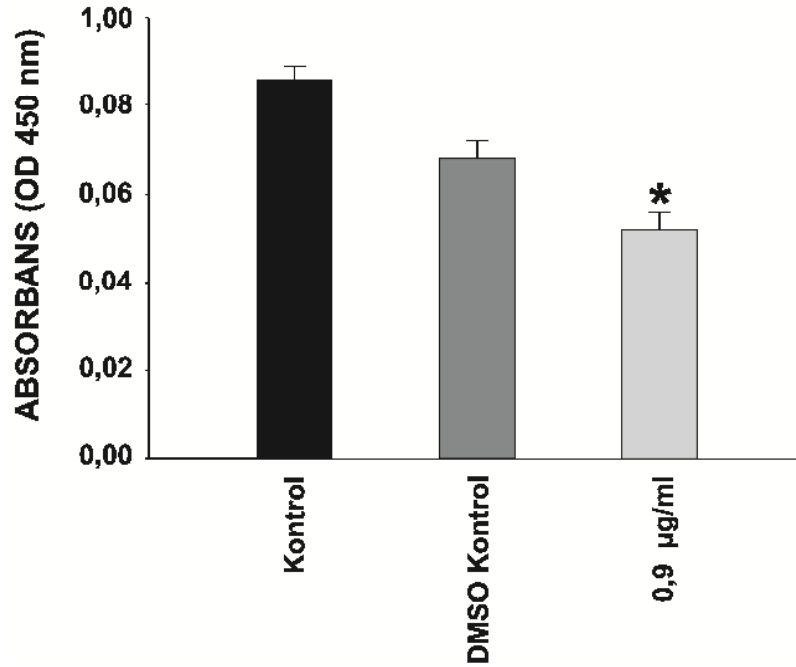


Şekil 4.7. 0.9 µg/ml temsirolimus'un NCI-H1975 hücre hattında kaspaz -3, -8 ve -9 aktiviteleri üzerine etkileri

Temsirolimus'un 0.9 µg/ml'lik dozu, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 293 T hücre hattında kaspaz -2, -3, -6, -8 ve -9 aktivitelerini değiştirmediği saptandı ($p > 0.05$). Her iki hücre hattında da kontrol olarak kullanılan %1 DMSO'nun, da hücrelerde hiçbir kaspaz aktivitesinde değişiklik yaratmadiğı saptandı ($p > 0.05$).

4.3. Temsirolimus'un NCI-H1975 ve 293 T hücre hatlarında mTOR protein aktivitesi üzerine etkileri

24 saat inkübasyon süresi sonunda, 0.9 µg/ml temsirolimus ile muamele edilen NCI-H1975 hücrelerinde, mTOR protein aktivitesinde istatistiksel bir azalış saptandı (*, $p < 0.05$). Ancak, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, mTOR protein aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi. 24 saat inkübasyon süresi sonundaki azalış aşağıdaki grafikte gösterildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. 24 saat inkübasyon süresi sonunda, 0.9 µg/ml temsirolimus'un NCI-H1975 hücre hattında mTOR protein aktivitesi üzerine etkisi

0.9 µg/ml temsirolimus, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 293 T hücre hattında, mTOR protein aktivitesini değiştirmedir. Her iki hücre hattında da kontrol olarak kullanılan %1' lik DMSO, hücrelerdeki mTOR protein aktivitesi üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadır.

5. TARTIŞMA

Günümüzde en yaygın kanser tiplerinden biri olan akciğer kanseri, histolojik oluşumları bakımından farklı iki alt tipe sahiptir. Bunlardan birincisi, akciğer kanseri tanısı konulan hastalarda görülme sıklığı %15 olan küçük hücreli akciğer kanseri iken, ikincisi, tüm vakaların % 85'inde gözlenen küçük hücreli dışı akciğer kanseridir (Travis vd 2004, Pikor vd 2013). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri; adenokarsinoma, skuamöz hücre karsinoması ve geniş hücre karsinoması olmak üzere üç temel alt tipe ayrılır (Travis vd 2004). Çalışmamızda, akciğer kanseri tipleri arasında en yaygın olduğu bilinen, küçük hücreli dışı akciğer kanseri kategorisinde yer alan ve adenokarsinom alt tipi özelliği sergileyen NCI-H1975 hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattının seçilme nedeni temsirolimus'un farklı akciğer kanseri hücreleri üzerinde sergilediği sitotoksik etkileri araştıran çalışmalar bulunurken, ilacın bu hücre hattındaki etkileri daha önce hiç araştırılmamıştır.

İlk olarak, immün baskılayıcı özellikleri keşfedilen rapamisin ve analogları; everolimus, ridaforolimus, temsirolimus, mTOR proteininin allosterik inhibitörleridir (Guertin ve Sabatini 2009, Yang vd 2011). mTOR proteininin tümör gelişiminde ve onkogeneze önemli roller üstlendiğinin anlaşılmasıyla beraber rapalog'ların alternatif birer anti-kanser ajan olabilecekleri düşünülmeye başlanmıştır. mTOR'un baskılanması, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde de potansiyel bir anti-kanser terapi olarak düşünülmektedir (Gridelli vd 2008, Heavey vd 2014). İlerlemiş böbrek hücre karsinomlarının tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmış bir rapalog analogu olan temsirolimus (Zaytseva vd 2012), mTOR proteinini hedef alan hücre döngüsü inhibitörüdür (NHSC 2010). Temsirolimus, hücre içi protein FKBP12'ye bağlanarak mTOR'u inhibe eder (Wujcik 2014) ve hücre döngüsünün G1 fazından S fazına ilerlemesini önler (Kwitkowski vd 2010).

Çalışmamızda ilacın, farklı hücreler üzerinde sergilediği *in vitro* sitotoksik yanıtlar göz önüne alınarak, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatlarından biri olan NCI-H1975 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılmasına karar verilmiştir. 1000, 500 ve 250 µg/ml'lik konsantrasyonlarda hazırlanan ve uygulanan temsirolimus, hem NCI-H1975 hem de 293 T hücrelerinde önemli sitotoksik etkiler yaratmıştır. Kanser tedavisinde kullanılan ajanın seçici anti-kanser etki sergilemesi başka bir ifade ile yalnızca kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki yaratırken normal hücrelere herhangi öldürücü bir etki yaratmaması ilacın kullanılabilirliğini belirleyen temel özelliktir. Bu nedenle temsirolimus, NCI-H1975 hücrelerinde istatistiksel olarak çok anlamlı olduğu saptanmış sitotoksik etkiler sergilese de normal hücrelerin canlılığını da önemli ölçüde azalttığı için, yukarıda belirtilen dozlarda kullanılamamıştır. Doz taramasına devam edilmiş ve ilacın seçici sitotoksik etkiler yarattığı belirlenen 0.9 µg/ml - 62.5 µg/ml doz aralığında denenmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Temsirolimus'un 0.9 µg/ml - 62.5 µg/ml doz aralığında 24 ve 48 saatlik

inkübasyon süreleri sonunda, hücre canlılığı üzerine etki göstermediği ancak 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda en düşük doz olan 0.9 µg/ml’de hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Tüm deneyler boyunca kontrol hücre grubu olarak kullanılan 293T hücre hattında ilaç, bu aralıkta denenen tüm dozlarda ve hiçbir inkübasyon süresi için, hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etki sergilememiştir.

Etkili dozu saptandıktan sonra, temsirolimus’un NCI-H1975 hücrelerinde hangi ölüm mekanizmasını aktive ederek söz konusu sitotoksik etkiyi sağladığı araştırılmıştır. İlk olarak ilacın hücrelerde otofajik ölümü aktive edip etmediği test edilmiştir çünkü temsirolimus’un farklı hücrelerde otofaji ile bağlantılı olduğu bilinen mTOR proteinini baskıladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

mTOR, evrimsel olarak korunmuş bir serin/treonin kinazdır. Proteinlerin, yağların ve organellerin biyosentezini içeren anabolik süreçleri teşvik ederek ve otofaji gibi katabolik süreçleri baskılayarak hücre büyümesi ve çoğalmasını uyarır (Fumarola vd 2014). Tümör baskılayıcı PTEN’in kaybı, PI3K ve Akt’de meydana gelen mutasyonlar veya büyüme reseptörlerinin aşırı ifade edilmesi mTOR yolağının onkojenik aktivasyonuna sebep olur (LoPiccolo 2008). mTOR sinyal yolağının onkojenik aktivasyonu, kanser hücresinin büyümesine, çoğalmasına ve hayatta kalmasına katkıda bulunur. Bu sebeple, son yıllarda onkojenik mTOR yolağı elemanlarının hedeflenmesi etkili bir anti-kanser stratejisi olarak dikkat çekmektedir (Xu vd 2014). Hücrede, mTOR proteinin baskılanması otofajik hücre ölümüne sebep olur.

Çalışmamız kapsamında, ilacın NCI-H1975 hücre hattında, mTOR proteininin aktivitesi üzerine sergileyeceği inhibitör etkisi araştırılmıştır. Hücreler, etkili doz olarak belirlenen 0.9 µg/ml temsirolimus ile muamele edilmiş, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, hücrelerdeki mTOR proteininin aktivitesi ölçülmüştür. mTOR proteininin aktivitesinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda bir azalış gözlenirken, temsirolimus, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda protein aktivitesinde bir değişime sebep olmamıştır. Eş zamanlı olarak 0.9 µg/ml temsirolimus uygulanan 293T hücre hattında, tüm inkübasyon süreleri sonunda, mTOR proteininin aktivitesinde bir değişim gözlenmemiştir. Temsirolimus’un en fazla sitotoksik etki yarattığı inkübasyon süresi olan 72 saatin sonunda, bu hücrelerdeki mTOR protein aktivitesini değiştirmemesi, ilacın otofajik ölümü tetikleyemeyeceğini düşündürmektedir.

Kanser hücrelerinin monoklonal özelliği göz önüne alındığında, etkinliği test edilen herhangi bir ilacın farklı kanser hücrelerinde birbirinden tamamen bağımsız etkiler sergilemesi şaşılabacak bir sonuç değildir. Bu bağlamda, hali hazırda böbrek kanseri tedavisinde otofajik ölümü tetikleme özelliğinden yararlanılarak kullanılan temsirolimus, küçük hücreli dışı akciğer kanserini modelleyen NCI-H1975 hücrelerinde böyle bir etki sergilememiştir. Elde ettiğimiz bu veri, daha önce hiç denenmediği için oldukça önemli ve daha ayrıntılı incelenebilir niteliktedir.

Çalışmamızda temsirolimus'un NCI-H1975 hücre hattında, bilinenin aksine, mTOR proteinini etkili bir şekilde baskılamadığı ancak hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur. Bu bulgulardan yola çıkarak, temsirolimus'un hücre canlılığında sebep olduğu azalışın apoptoz indüklü olup olmadığı da araştırılmıştır.

Apoptoz; gelişmiş organizmalarda içsel ve dışsal yolaklar olarak adlandırılan iki farklı yolla aktive olabilen, organizmada artık gereksinim duyulmayan ve/veya fonksiyonları bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden programlı bir şekilde ölümüdür (Parrish vd 2013). Apoptotik hücre ölümünün en önemli belirteçleri olan kaspazlar hücre tarafından alınan içsel ve ya dışsal sinyallere bağlı olarak koordineli bir şekilde aktive olur (Heemst vd 2007). İçsel yolak, mitokondriyal elektron transport zincirinin bir elemanı olan sitokrom c'nin mitokondriden sitosole salınımı ile başlar. Sitokrom c'nin salınımı hücre içi stres yaratarak Apaf-1 oligomerizasyonunu tetikler. Apaf-1, prokaspaz-9 ile birleşerek kaspaz-9'u aktive eder. Aktifleşen kaspaz-9, efektör kaspazları keserek geri dönüşümsüz bir şekilde apoptotik sürecin başlamasına yol açar. Dışsal yolak, prokaspaz-8 ve 10'un ölüm efektörü domainleri aracılığıyla ölüm başlatıcı sinyal kompleksiyle etkileşimleri sayesinde başlatılır. Bu etkileşim sonucu başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazların aktivasyonunu sağlar ve hücrede apoptotik süreç başlamış olur (Creagh 2014). Hücrenin ölüm emrini veren, efektör kaspazlardan biri olan kaspaz-3 enzimidir. Kaspaz-3 enziminin ekspresyonundaki artış hücrenin mutlak suretle apoptoza uğramasına neden olur (Heemst vd 2007) ve bu nedenle apoptoz ile ilgili yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir parametredir.

Hücrelere uygulanan temsirolimus'un 0.9 µg/ml'lik dozunun, mTOR proteininin aktivitesinde etkili bir azalmaya yol açmamasına rağmen, hücre canlılığında sebep olduğu önemli azalış göz önüne alınarak, temsirolimus'un bilinen antiproliferatif etkisinin yanında analoğu olduğu rapamisin gibi apoptotik bir etkisinin olup olmadığı apoptoz mekanizmasında temel rol oynayan kaspaz enzimlerinin aktivitesine bakılarak tayin edilmiştir.

Temsirolimus'un, NCI-1975 hücre hattında sergileyebileceği olası apoptotik etki, kaspaz -2, -3, -6, -8 ve -9 enzimlerinin aktivitelerindeki değişimin kolorimetrik olarak ölçülmesi ile belirlenmiştir. 0.9 µg/ml temsirolimus ile muamele edilen NCI-H1975 hücreleri, 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi ve tüm inkübasyon süreleri sonunda, kaspaz enzimlerinin aktiviteleri ölçüldü. 0.9 µg/ml temsirolimus uygulaması, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, kontrol grubuna oranla kaspaz-8 enzim aktivitesinde 3.8, kaspaz-9 enzim aktivitesinde 3.9 kat; 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, kaspaz-8 enzim aktivitesinde 2.82 kat; 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda da kaspaz-3 enzim aktivitesinde 3.43, kaspaz-8 enzim aktivitesinde 5.01 ve kaspaz-9 enzim aktivitesinde 5.67 kat artışa neden olmuştur. Tüm bu verilerin yanı sıra, 0.9 µg/ml temsirolimus uygulaması, 293T hücre hattında beklenildiği gibi kaspaz enzimlerinin aktiviteleri üzerinde hiçbir etki göstermemiştir.

Temsirolimus'un farklı inkübasyon sürelerinde farklı kaspaz aktiviteleri üzerinde değişikliğe neden olması, bize bu ilacın zamana bağlı olarak apoptoz mekanizmasındaki farklı yolları aktive edebileceğini düşündürmektedir. İlacın özellikle tüm inkübasyon süreleri sonunda kaspaz-8 aktivitesinde değişiklik yaratması, apoptoz mekanizmasının dışsal yolak sayesinde tetiklenebileceğini işaret etmektedir. İleride yapılacak olan çalışmalarla, temsirolimus'un apoptozun dışsal yolağını aktive edip etmediği, TNF- α , TRAIL gibi önemli belirteçler üzerinde yarattığı etkilerin ortaya konması ile değerlendirilebilir. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, özellikle kaspaz-9 ve -3 enzimlerindeki önemli artış ilahtan elde edilen sitotoksik etkinin apoptoz mekanizmasını aktiflemek suretiyle ortaya çıktığını ve hücrelerin geri dönüşümsüz olarak apoptotik hücre ölümüne yönlendirildiğini gösteren önemli bir kanıttır. Kaspaz enzimlerindeki bu önemli artış, temsirolimus'un NCI-H1975 hücrelerinde metabolik bir stres yaratarak apoptoz mekanizmasının başlatıldığını ve hücreleri bu mekanizma ile öldürdüğünün altını çizmektedir.

Yapılan literatür taramaları sonrasında, temsirolimus'un apoptotik bir etkisi olduğunu gösteren herhangi bir yayınla karşılaşılmamıştır. Ancak, Zhang ve arkadaşlarının BEL-7402 ve HepG2 hücre hatlarını kullanarak yaptıkları çalışmada, rapamisinin hepatoselüler karsinoma hücrelerinde apoptozu uyararak hücre büyümesini baskıladığı gösterilmiştir. Çalışmada, 50 nmol/L konsantrasyonundaki rapamisinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Aynı konsantrasyondaki rapamisin uygulamasının hücre hatları üzerinde apoptotik bir etki yaratıp yaratmadığı, apoptoz mekanizmasının en önemli elemanlarından biri olan kaspaz-3 aktivitesine bakılarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, rapamisinin hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonunu arttırarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Zhang vd 2007). Temsirolimus'un bir rapamisin analogu olduğu göz önüne alındığında, araştırmacıların elde ettiğine benzer bir sonuç elde etmemiz ilacın olası apoptotik etkilerinin farklı kanser hücrelerinde daha ayrıntılı bir biçimde araştırılması gerekliliğini gözler önüne sermektedir.

KHDAK'nde, rapamisin, p53 mutant hücre hatlarında p53 bağımsız yolların aktivasyonunu sağlayarak (Miyake vd 2012) ya da hipoksik koşullar altında survivinin HIF aracılı ekspresyonu (Chen vd 2012) ile apoptozu indükleyebilmektedir. Ancak, rapamisinin anti-kanser özelliği genellikle sitostatik etkisiyle ilişkilidir (Fumarola vd 2014). Rapamisin gibi analogları da hücre döngüsünün ilerlemesini durdurarak sitostatik etki göstermektedirler (Yang vd 2011). PTEN yoksun glioblastoma, prostat, meme, pankreas, akciğer ve kolon kanseri hücre hatlarında rapalog'lar antiproliferatif aktivite sergilemektedir (Rowinsky 2004, Janus vd 2005). Bir rapamisin analogu olan temsirolimus; meme kanseri (Chan vd 2005), glioma (Galanis vd 2005), endometriyal kanser (Oza vd 2006) ve mantle hücre lenfomasında (Witzig vd 2005) sahip olduğu antianjiyogenik ve antiproliferatif özelliklerine bağlı olarak (Guba vd 2002, Del Bufalo vd 2006), antitümöral aktivite sergilemektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında, nanomolar konsantrasyonlarda kullanılan temsirolimus'un, antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Shor vd 2008). Temsirolimus'un, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatları olan A549, H1299 ve H358'de sırasıyla, 0.76 nM, 0.75 nM ve 0.64 nM'lık konsantrasyonlarda hücre çoğalmasını baskıladığı görülmüştür (Ohara vd 2011). Bu veriler, temsirolimus'un NCI-H1975 hücre hattında da antiproliferatif etkisi olabileceğini düşünmemize neden olmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarla, ilacın hücre döngüsü üzerinde sergileyeceği etkiler belirlenebilir ve ilacın bu hücre hattındaki antiproliferatif özelliği ortaya çıkarılabilir.

Bu çalışma sonucunda, temsirolimus'un mevcut yayınlarda bahsedilen antiproliferatif etkisinin yanında, NCI-H1975 hücre hattında, kaspaz aktivitelerinde yol açtığı artışa bağlı olarak apoptotik bir etkisinin olduğu bulunmuştur. Çalışmamız, temsirolimus'un NCI-H1975 hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak apoptotik etki sergilediğini gösteren ilk *in vitro* çalışmadır. Elde ettiğimiz veriler, renal karsinoma tedavisinde otofajik ölümü tetikleyen bir ajan olduğu için sıklıkla tercih edilen bu rapalog analogunun, küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde apoptozu teşvik edici özelliğinden yararlanılarak kullanılabileceğini gösteren ilk bulgulardır.

6. SONUÇ

Tüm bu verilerle birlikte;

1. Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre canlılığı test sonuçlarına göre; NCI-H1975 hücre hattında temsirolimus 0.9 µg/ml'lik dozda 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığında azalmaya sebep olmuştur.

2. Temsirolimus'un mTOR proteininin aktivitesini inhibe ettiği birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak çalışmamızda, NCI-H1975 hücre hattında, temsirolimus mTOR proteininin aktivitesini sadece 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda inhibe etmiştir. Diğer inkübasyon sürelerinde bir değişime sebep olmamıştır.

3. Çalışmamızda, mTOR proteininin aktivitesinin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda baskılanmasına rağmen hücre canlılığındaki en önemli azalmanın 72 saatlik inkübasyon süre sonunda ortaya çıkması, bu azalmanın mTOR proteininin aktivitesinden bağımsız olarak ortaya çıktığını göstermektedir.

4. Temsirolimus'un mTOR proteinini etkin bir şekilde inhibe etmemesine rağmen, hücre canlılığında azalışa sebep olması, ilacın apoptotik bir etkisinin olduğunu düşündürmüştür.

5. Temsirolimus'un apoptotik bir ajan olup olmadığı kaspaz enzimlerinin aktivitesine bakılarak tayin edilmiştir.

6. Çalışmamız, temsirolimus'un bilinen antiproliferatif etkilerinin yanı sıra, kaspaz enzim aktivitelerini arttırarak apoptotik etkisinin de olduğunu ortaya çıkarmıştır.

KAYNAKLAR

- ABRAHAM, J. 2007. Temsirolimus for advanced renal cell carcinoma. *Commun. Oncol.*, 4: 476-479.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. 2012. Lung Cancer (Non-Small Cell). Ga: American Cancer Society, Atlanta.
- ANDRADE, F., ROY, S., NICHOLSON, D., THORNBERRY, N., ROSEN, A., CASCIOLA-ROSEN, L. 1998. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity*, 8: 451-460.
- ARANGO, B.A., CASTRELLON, A.B., SANTOS, E.S., RAEZ, L.E. 2009. Second-line therapy for non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 10(2): 91-98.
- AREDIA, F., GUAMAN ORTIZ, L. M., GIANSAANTI, V., SCOVASSI, A. I. 2012. Autophagy and cancer. *Cells*, 1: 520-534.
- ASHKENAZI, A., DIXIT, V.M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-1308.
- BASCIANI, S., VONA, R., MATARRESE, P., ASCIONE, B., MARIANI, S., CAUDA, R., MALORNI, W., STRAFACE, E., LUCIA, M.B. 2007. Imatinib interferes with survival of multi drug resistant Kaposi's sarcoma cells. *FEBS Lett.*, 581: 5897-5903.
- BERTRAM, J. S. 2001. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21: 167-223.
- BIALIK, S., KIMCHI, A. 2004. DAP-kinase as a target for drug design in cancer and diseases associated with accelerated cell death. *Semin. Cancer Biol.*, 14: 283-294.
- BIALIK, S., KIMCHI, A. 2006. The death-associated protein kinases: Structure, function, and beyond. *Annu. Rev. Biochem.*, 75: 189-210.
- BLANK, M., SHILOH, Y. 2007. Programs for cell death. *Cell Cycle*, 6(6): 686-695.
- BRACHMANN, S., FRITSCH, C., MAIRA, S.M., GARCIA-ECHEVERRIA, C. 2009. PI3K and mTOR inhibitors-a new generation of targeted anticancer agents. *Current Opinion in Cell Biology*, 21: 194-198.

- BRATTON, S.B., MacFARLANE, M., CAIN, K., COHEN, G.M. 2000. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.*, 256(1): 27-33.
- BURMAN, C., KTISTAKIS, N.T. 2010. Autophagosome formation in mammalian cells. *Semin. Immunopathol.*, 32: 397-413.
- BURSCH, W., ELLINGER, A., KIENZL, H., TOROK, L., PANDEY, S., SIKORSKA, M., WALKER, R., HERMANN, R.S. 1996. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*, 17: 1595-1607.
- CASTEDO, M., PERFETTINI, J., ROUMIER, T., ANDREAU, K., MEDEMA, R., KROEMER, G. 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23: 2825-2837.
- CECCONI, F., LEVINE, B. 2008. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death developmental. *Cell*, 15(3): 344-357.
- CHAN, S., SCHEULEN, M.E., JOHNSTON, S., MROSS, K., CARDOSO, F., DITTRICH, C., EIERMANN, W., HESS, D., MORANT, R., SEMIGLAZOV, V., BORNER, M., SALZBERG, M., OSTAPENKO, V., ILLIGER, H.J., BEHRINGER, D., BARDY-BOUXIN, N., BONI, J., KONG, S., CINCOTTA, M., MOORE, L. 2005 Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23: 5314-5322.
- CHEN, Y., KLIONSKY, D.J. 2011. The regulation of autophagy-unanswered questions. *J. Cell Sci.*, 124: 161-170.
- CHEN, B., YUPING, S., NI, J. 2012. Rapamycin decreases survivin expression to induce NSCLC cell apoptosis under hypoxia through inhibiting HIF-1 α induction. *Mol. Biol. Rep.*, 39: 185-191.
- CHI, S., KITANAKA, C., NOGUCHI, K., MOCHIZUKI, T., NAGASHIMA, Y., SHIROUZU, M., FUJITA, H., YOSHIDA, M., CHEN, W., ASAI, A., HIMENO, M., YOKOYAMA, S., KUCHINO, Y. 1999. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene*, 18: 2281-2290.

- CHIANG, G.G., ABRAHAM, R.T. 2005. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J. Biol. Chem.*, 280: 25485-25490.
- CLAMON, G. 2015. Chemoprevention and Screening for Lung Cancer: Changing Our Focus to Former Smokers. *Clinical Lung Cancer*, 16(1): 1-5.
- CODOGNO, P., MEIJER, A.J. 2005. Autophagy and signalling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12(2): 1509-1518.
- COHEN, J.J. 1998. Apoptosis, To be or not to be. *Postgraduate Syllabus*, 1: 1-19.
- CORY, S., ADAMS, J.M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 647-656.
- CREAGH, E.M. 2014. Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends in Immunology*, 35(12): 631-640.
- CUMMINGS, J., WARD, T.H., RANSON, M., DIVE, C. 2004. Apoptosis pathway-targeted drugs-from the bench to the clinic. *Reviews on Cancer*, 1705: 53-66.
- DALBY, K. N., TEKEDERELI, I., LOPEZ-BERESTEIN, G., OZPOLAT, B. 2010. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy*, 6(3): 322-329.
- DANCEY, J. 2006. Therapeutic targets: mTOR and related pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 5(9): 1065-1073.
- DARMON, A.J., NICHOLSON, D.W., BLEACKLEY, R.C. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*, 377: 446-448.
- DEBNATH, J., BAEHRECKE, E.H., KROEMER, G. 2005. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*, 1: 66-74.
- DECKER, T., HIPPE, S., RINGSHAUSEN, I., BEGNER, C., OELSNER, M., SCHNELLER, F., PESCHEL, C. 2003. Rapamycin-induced G1arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and survivin. *Blood*, 101: 278-285.
- DEGRETEV, A., BOYCE, M., YUAN, J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*, 22: 8543-8567.

- DEL BUFALO, D., CIUFFREDA, L., TRISCIUOGGIO, D., TRISCIUOGGIO, D., DESIDERI, M., COGNETTI, F., ZUPI, G., MILELLA, M. 2006. Antiangiogenic potential of the mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer Res.*, 66: 5549-5554.
- DELA CRUZ, C.S., TANOVE, L.T., MATTHEY, R.A. 2011. Lung Cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin. Chest. Med.*, 32: 605-644.
- DENAULT, J.B., SALVESEN, G.S. 2002. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.*, 102(12): 4489-5000.
- DOWLING, R.J.O., TOPISIROVIC, I., FONSECA, B.D., SONENBERG, N. 2010. Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 433-439.
- EFEYAN, A., SABATINI, D.M. 2010. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22(2): 169-176.
- EISEBERG-LERNER, A., BIALIK, S., SIMON, H.U., KIMCHI, A. 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.*, 16(7): 966-975.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 35(4): 495-516.
- ESPOSTI, M.D. 2002. The roles of Bid. *Apoptosis*, 7: 433-440.
- FADEEL, B., GLEISS, B., HOGSTRAND, K., CHAMDRA, J., WIEDMER, T., SIMS, P.J., HENTER, J.I., ORRENIUS, S., SAMALI, A. 1999. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266(2): 504-511.
- FAIVRE, S., KROEMER, G., RAYMOND, E. 2006. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5: 671-688.
- FASOLO, A., SESSA, C. 2008. mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 17: 1717-1734.
- FEARON, E.R. 1997. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 278: 1043-1050.

- FORMIGLI, L., PAPUCCI, L., TANI, A., SCHIAVONE, N., TEMPESTINI, A., ORLANDINI, G.E., CAPACCIOLI, S., ORLANDINI, S.Z. 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell Physiol.*, 182: 41-49.
- FOSTER, I. 2008. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14: 144-149.
- FREEDMAN, M.L., PENNEY, K.L., STRAM, D.O., LE MARCHAND, L., HIRSCHHORN, J.N., KOLONEL, L.N., ALTSHULER, D., HENDERSON, B.E., HAIMAN, C.A. 2004. Common variation in BRCA2 and breast cancer risk: a haplotype-based analysis in the Multiethnic Cohort. *Hum. Mol. Genet.*, 13: 2431–2441.
- FUMAROLA, C.A., BONELLI, M.A., PETRONINI, P.G., ALFIERI, R.R. 2014. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochemical Pharmacology*, 90: 197-207.
- GALANIS, E., BUCKNER, J.C., MAURER, M.J., KREISBERG, J.I., BALLMAN, K., BONI, J., PERALBA, J.M., JENKINS, R.B., DAKHIL, S.R., MORTON, R.F., JAECKLE, K.A., SCHEITHAUER, B.W., DANCEY, J., HIDALGO, M., WALSH, D.J. 2005. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J. Clin. Oncol.*, 23: 5294-5304.
- GALLUZZI, L., MAIURI, M.C., VITALE, I., ZISCHKA, H., CASTEDO, M., ZITVOGEL, L., KROEMER, G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14: 1237-1266.
- GEWIES, A. 2003. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1: 1-26.
- GHAVAMI, S., HASHEMI, M., ANDE, S.R., YEGANEH, B., XIAO, W., ESHRAGHI, M., BUS, C. J., KADKHODA, K., WIECHEC, E., HALAYKO, A. J., LOS, M. 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.*, 46: 497-510.
- GINGRAS, A.C., RAUGHT, B., SONENBERG, N. 2001. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.*, 15: 807-826.
- GOMEZ-MARTIN, C., RUBIO-VIQUEIRA, B., HIDALGO, M. 2005. Current status of mammalian target of rapamycin inhibitors in lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 7(1): 13-18.

- GÖZÜAÇIK, D., KIMCHI, A. Autophagy and cell death. *Current Topics in Developmental Biology*, 78: 217-245.
- GRIDELLI, C., MAIONE, P., ROSSI, A. 2008. The potential role of mTOR Inhibitors in non-small cell lung cancer. *The Oncologist*, 13: 139-147.
- GUBA, M., VON BREITENBUCH, P., STEINBAUER, M., KOEHL, G., FLEGEL, S., HORNUNG, M., BRUNS, J.M., ZUELKE, C., FARKAS, S., ANTHUBER, M., JAUCH, K.W., GEISLER, E.K. 2002. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: Involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.*, 8: 128-135.
- GUERTIN, D.A., SABATINI, D.M. 2009. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci. Signal*, 2: 24.
- GUICCIARDI, M.E., DEUSSING, J., MIYOSHI, H., BRONK, S.F., SVINGEN, P.A., PETERS, C., KAUFMANN, S.H., GORES, G.J. 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.*, 106: 1127-1137.
- HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674.
- HAY, N., SONENBERG, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.*, 18: 1926-1945.
- HEEMST, D., REIJER, P.M., WESTENDORP, R.G.J. 2007. Ageing or cancer: A review On the role of caretakers and gatekeepers. *European Journal of Cancer*, 43: 2144-2152.
- HEAVEY, S., O'BRYNE, K., GATELY, K. 2014. Strategies for co-targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in NSCLC. *Cancer Treatment Reviews*, 40: 445-456.
- HIPPERT, M.M., O'TOOLE, P.S., THORBURN, A. 2006. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res.*, 66: 9349-9351.
- HU, W., KAVANAGH, J.J. 2003. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol.*, 4: 721-729.
- HUANG, S., BJORNSTI, M.A., HOUGHTON, P.J. 2003. Rapamycins: Mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biology & Therapy*, 2(3): 222-232.

- HUANG, J., KLIONSKY, D. J. 2007. Autophagy and human disease. *Cell Cycle*, 6(15): 1837-1849.
- HUI, I.C., TUNG, E.K., SZE, K.M., CHING, Y., NG, I.O. 2009. Rapamycin and CCI-779 inhibit the mammalian target of rapamycin signalling in hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 10: 65-75.
- IGNEY, F.H., KRAMMER, P.H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 277-288.
- INBAL, B., BIALIK, S., SABANAY, I., SHANI, G., KIMCHI, A. 2002. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J. Cell Biol.*, 157: 455-468.
- JANKU, F., STEWART, D.J., KURZROCK, R. 2010. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer: is it becoming a reality? *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 7: 401-414.
- JANKU, F., GARRIDO-LAGUNA, I., PETRUZELKA, L.B., STEWART, D.J., KURZROCK, R. 2011. Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 6: 1601-1612.
- JANUS, A., ROBAK, T., SMOLEWSKI, P. 2005. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumourigenesis and targeted antitumour therapy. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10: 479-498.
- JIA, L., DOORMASHKIN, R.R., ALLEN, P.D., GRAY, A.B., NEWLAND, A.C., KELSEY, S.M. 1997. Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br. J. Haematol.*, 98: 673-685.
- JIN, Z., EL-DEIRY, W.S. 2005. Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4(2): 139-163.
- JEONG, E., CHOI, H.S., LEE, T., KIM, H., KIM, C.H. 2012. Dual inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and role of autophagy in non-small cell lung cancer cells. *Tuberc. Respir. Dis.*, 72: 343-351.
- JUNG, C.H., RO, S., CAO, J., OTTO, N.M., KIM, D. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, 584: 1287-1295.

- KANG, C., AVERY, L. 2008. To be or not to be, the level of autophagy is the question. *Autophagy*, 4 (1): 82-84.
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.
- KERR, J.F. 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182: 471-474.
- KESSEL, D., LUO, Y., MATHIEU, P., REINERS, Jr. J.J. 2000. Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochem. Photobiol.*, 71: 196-200.
- KIMMELMAN, A.C. 2011. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev.*, 25(19): 1999-2010.
- KLIONSKY, D.J. 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.*, 118: 7-18.
- KWITKOWSKI, V., PROWELL, T.M., IBRAHIM, A., FARRELL, A.T., JUSTICE, R., MITCHELL, S.S., SRIDHARA, R., PAZDUR, R. 2010. FDA Approval Summary: Temsirolimus as Treatment for Advanced Renal Cell Carcinoma. *The Oncologist*, 15: 428-435.
- LANGEVIN, S.M., KRATZKE, R.A., KELSEY, K.T. 2014. Epigenetics of lung cancer. *Translational Research*, 165(1): 74-90.
- LEIST, M., JAATTELA, M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2(8): 589-598.
- LEVINE, B., KLIONSKY, D.J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell*, 6: 463-477.
- LEVINE, B., YUAN, J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.*, 115: 2679-2688.
- LI, H., ZHU, H., XU, C.J., YUAN, J. 1998. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94: 491-501.

- LIU, Q., THOREEN, C., WANG, J., SABATINI, D., GRAY, N.S. 2009. mTOR mediated anti-cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 6(2): 47-55.
- LIU, B., CHENG, Y., LIU, Q., BAO, J., YANG, J. 2010. Autophagic pathways as new targets for cancer drug development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31: 1154-1164.
- LIU, W., ONDA, M., KIM, C., XIANG, L., WELDON, J. E., LEE, B., PASTAN, I. 2012. A recombinant immunotoxin engineering for increased stability by adding a disulfide bond has decreased immunogenicity. *Protein Engineering, Design & Selection*, 25(1): 1-6.
- LOPICCOLO, J., BLUMENTHAL, G.M., BERNSTEIN, W.B., DENNIS, P.A. 2008. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: Effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates*, 11: 32-50.
- LU, F., ZHANG, H.T. 2011. DNA methylation and non small cell lung cancer. *Anat. Rec.*, 294: 1787-1795.
- LUM, J.J., BAUER, D.E., KONG, M., HARRIS, M.H., LI, C., LINDSTEN, T., THOMPSON, C.B. 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120: 237-248.
- MACINTOSH, R.L., RYAN, K.M. 2013. Autophagy in tumour cell death. *Seminars in Cancer Biology*, 23: 344-351.
- MARTIN, S.J., AMARANTE-MENDES, G.P., SHI, L., CHUANG, T.H., CASIANO, C.A., O'BRIEN, G.A., FITZGERALD, P., TAN, E.M., BOKOCH, G.M., GREENBERG, A.H., GREEN, D.R. 1996. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J.*, 15: 2407-2416.
- MARTINVALET, D., ZHU, P., LIEBERMAN, J. 2005. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 22: 355-370.
- MASSEY, A.C., ZHANG, C., CUERVO, A.M. 2006. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 73: 205-235.
- MENDEZ, M., CUSTADIO, A., PROVENCIO, M. 2011. New molecular targeted therapies for advanced non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.*, 3(1): 30-56.

- MILLS, K.R., REGINATO, M., DEBNATH, J., QUEENAN, B., BRUGGE, J.S. 2004. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 3438-3443.
- MIYAKE, N., CHIKUMI, H., TAKATA, M., NAKAMOTO, M., IGISHI, T., SHIMIZU, E. 2012. Rapamycin induces p53-independent apoptosis through the mitochondrial pathway in non-small cell lung cancer cells. *Oncol. Rep.*, 28: 848-854.
- MIZUSHIMA, N., LEVINE, B., CUERVO, A.M., KLIONSKY, D.J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451: 1069-1075.
- MIZUSHIMA, N., LEVINE, B. 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Curr. Opin. Cell Bio.*, 22: 177-180.
- MUISE-HELMERICKS, R.C., GRIMES, H.L., BELLACOSA, A., MALSTROM, S.E., TSICHLIS, P.N., ROSEN, N. 1998. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 273: 29864-29872.
- OHARA, T., TAKAOKA, M., TOYOOKA, M., TOMONO, Y., NISHIKAWA, T., SHIRAKAWA, Y., YAMATSUJI, T., TANAKA, N., FUJIWARA, T., NAOMOTO, Y. 2011. Inhibition of mTOR by temsirolimus contributes to prolonged survival of mice with pleural dissemination of non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.*, 102(7): 1344-1349.
- OZA, A.M., ELIT, L., BIAGI, J., CHAPMAN, W., TSAO, M., HEDLEY, D., HANSEN, C., DANCEY, J., EISENHAUER, E. 2006. Molecular correlates associated with a phase II study of temsirolimus (CCI-779) in patients with metastatic or recurrent endometrial cancer. *J. Clin. Oncol.*, 24: 3003.
- ÖZ ARSLAN, D., KORKMAZ, G., GÖZÜAÇIK, D. 2011. Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(4): 184-194.
- PARRISH, A.B., FREEL, C.D., KORNBLUTH, S. 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5(6): 8672-8696.

- PATTINGRE, S., LEVINE, B. 2006. Bcl-2 inhibition of autophagy: A new route to cancer? *Cancer Res.*, 66: 2885-2888.
- PATTINGRE, S., BAUVY, C., CARPENTIER, S., LEVADE, T., LEVINE, B., CODOGNO, P. 2009. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J. Biol. Chem.*, 284(5): 2719-2728.
- PAWELETZ, N. 2001. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2: 72-75.
- PENE, F., CLAESSENS, Y.E., MULLER, O., VIGUIE, F., MAYEUX, P., DREYFUS, F., LACOMBE, C., BOUSCARY, D. 2002. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene*, 21: 6587-6597.
- PERALBA, J.M., DE GRAFFENRIED, L., FRIEDRICHS, W., FULCHER, L., GRUNWALD, V., WEISS, G., HIDALGO, M. 2003. Pharmacodynamic evaluation of CCI-779, an inhibitor of mTOR, in cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 9: 2887-2892.
- PETROULAKIS, E., MAMANE, Y., LE BACQUER, O., SHAHBAZIAN, D., SONENBERG, N. 2006. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br. J. Cancer*, 94: 195-199.
- PIKOR, L.A., RAMNARINE, V.R., LAMA, S., LAM, W.L. 2013. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*, 82: 179-189.
- PONDER, B.A.J. 2001. Cancer genetics. *Nature*, 411: 336-341.
- PROUD, C.G. 2004. The multifaceted role of mTOR in cellular stress responses. *DNA Repair (Amst)*, 3: 927-934.
- QU, X., ZOU, Z., SUN, Q., LUBY-PHELPS, K., CHENG, P., HOGAN, R.N., GILPIN, C., LEVINE, B. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell*, 128: 931-946.
- REED, J.C., TOMASELLI, K.J. 2000. Drug discovery opportunities from apoptosis research. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11: 586-592.

- REEF, S., ZALCKVAR E., SHIFMAN, O., BIALIK, S., SABANAY, H., OREN, M., KIMCHI, A. 2006. A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol. Cell*, 22: 463-475.
- REUNGWETWATTANA, T., WEROHA, S.J., MOLINA, J.R. 2011. Oncogenic pathways, molecularly targeted therapies, and highlighted clinical trials in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Clin. Lung Cancer*, 13(4): 252-266.
- RICHARDSON, H., KUMAR, S. 2002. Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *J. Immunol. Methods*, 265(1-2): 21-38.
- RINI, B., KAR, S., KIRKPATRICK, P. 2007. Temsirolimus. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6: 599-600.
- RINI, B.I. 2008. Temsirolimus, an Inhibitor of Mammalian Target of Rapamycin. *Clin. Cancer Res.*, 14: 1286-1290.
- ROWINSKY, E.K. 2004. Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR). *Curr. Opin. Oncol.*, 16: 564-575.
- RUDDON, R.W. 2007. Cancer Biology. Oxford University Press, New York, 4 pp.
- SCHMELZLE, T., HALL, M.N. 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103: 253-262.
- SCHULER, M., GREEN, D.R. 2001. Mechanisms of *p53*-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 29: 684-688.
- SHANG , D., LIU,Y., LIU, Q., ZHANG , F., FENG , L., LV , W., TIAN , Y. 2009. Synergy of 5-aza-20-deoxycytidine (DAC) and paclitaxel in both androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines. *Cancer Lett.*, 278: 82-87.
- SHI, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell*, 9: 459-470.
- SHIMIZU, S., KANASEKI, T., MIZUSHIMA, N., MIZUTA, T., ARAKAWA-KOBAYASHI, S., THOMPSON, C.B., TSUJIMOTO, Y. 2004. Role of *Bcl-2* family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.*, 6: 1221-1228.
- SHOR, B., ZHANG, W.G., TORAL-BARZA, L., LUCAS, J., ABRAHAM, R.T., YU, K. 2008. A New Pharmacologic Action of CCI-779 Involves FKBP12-

Independent Inhibition of mTOR Kinase Activity and Profound Repression of Global Protein Synthesis. *Cancer Res.*, 68(8): 2934-2943.

SIEGEL, R., MA, J., ZOU, Z., JEMAL, A. 2014. Cancer statistics, 2014. *A Cancer Journal For Clinicians*. 64: 9-29.

SOUNG, Y.H., LEE, J.W., KIM, S.Y., JANG, J., PARK, Y.G., PARK, W.S., NAM, S.W., LEE, J.Y., YOO, N.J., LEE, S.H. 2005. Caspase-8 gene is inactivated by somatic mutations in gastric carcinomas. *Cancer Res.*, 65: 815-821.

SPIRO, S.G., PORTER, J.C. 2002. Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging on nonsurgical treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166: 1166-1196.

SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., FERNANDES-ALNEMRI, T., LITWACK, G., ALNEMRI, E.S. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 14486-14491.

STENNICKE, H.R., SALVESEN, G.S. 2000. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477: 299-306.

STOKA, V., TURK, B., SCHENDEL, S.L., KIM, T.H., CIRMAN, T., SNIPAS, S.J., ELLERBY, L.M., BREDESEN, D., FREEZE, H., ABRAHAMSON, M., BROMME, D., KRAJEWSKI, S., REED, J.C., YIN, X.M., TURK, V., SALVESEN, G.S. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis: Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J. Biol. Chem.*, 276: 3149-3157.

TAKUWA, N., FUKUI, Y., TAKUWA, Y. 1999. Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signalling in growth factor-stimulated NIH-3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 1346-1358.

THORNBERRY, N.A., LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: Enemies within. *Science*, 281: 1312-1316.

TRAVIS, W.D., BRAMBILLA, E., MULLER-HERMELINK, H.K., HARRIS, C.C. 2004. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. *World Health Organization Classification of Tumours*, Lyon.

VANHAESEBROECK, B., ALESSI, D.R. 2000. The PI3K-PDK1 connection: More than just a road to PKB. *Biochem. J.*, 346(3): 561-576.

- VIGNOT, S., FAIVRE, S., AGUIRRE, D., RAYMOND, E. 2005. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Annals. of Oncology*, 16: 525-537.
- WANG, B., XIAO, Z., CHEN, B., HAN, J., GAO, Y., ZHANG, J., ZHA, W., WANG, X., DAI, J. 2008. Nogo-66 promotes the differentiation of neural progenitors into Astroglial Lineage Cells through mTOR-STAT3 pathway. *PLoS. One*, 3(3): 1-9.
- WHITE, E.J., MARTIN, V., LIU, J., KLEIN, S.R., PIYA, S., GOMEZ-MANZANO, C., FUEYO, J., JIANG, H. 2011. Autophagy regulation in cancer development and therapy. *Am. J. Cancer Res.*, 1(3): 362-372.
- WIRAWAN, E., BERGHE, T.V., LIPPENS, S., AGOSTINIS, P., VANDENABEELE, P. 2012. Autophagy: for better or for worse. *Cell Research*, 22: 43-61.
- WITZIG, T.E., GEYER, S.M., GHOBRIAL, I., INWARDS, D.J., FONSECA, R., KURTIN, P., ANSELL, S.M., LUYUN, R., FLYNN, P.J., MORTON, R.F., DAKHIL, S.R., GROSS, H., KAUFMANN, S.H. 2005. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 23: 5347-5356.
- WUJCIK, D. 2014. Science and mechanism of action of targeted therapies in cancer treatment. *Seminars in Oncology Nursing*, 30(3): 139-146.
- XIE, Z., KLIONSKY, D. J. 2007. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.*, 9: 1102-1109.
- XU, Y., KIM, S.O., LI, Y., HAN, J. 2006. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J. Biol. Chem.*, 281: 19179-19187.
- XU, K., LIUB, P., WEI, W. 2014. mTOR signaling in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1846: 638-654.
- XUE, L., FLETCHER, G.C., TOLKOVSKY, A.M. 1999. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell Neurosci.*, 14: 180-198.
- YANG, W., MONROE, J., ZHANG, Y., GEORGE, D., BREMER, E., LI, H. 2006. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer Lett.*, 243: 217-227.
- YANG, S., XIAO, X., MENG, X., LESLIE, K.K. 2011. A Mechanism for Synergy with Combined mTOR and PI3 Kinase Inhibitors. *PLoS. ONE*, 6(10): 26343-26355.

- YU, L., ALVA, A., SU, H., DUTT, P., FREUNDT, E., WELSH, S., BAEHRECKE, E.H., LENARDO, M.J. 2004. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 304: 1500-1502.
- YUE, Z., JIN, S., YANG, C., LEVINE, A.J., HEINTZ, N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 15077-15082.
- ZAYTSEVA, Y.Y., VALENTINO, J.D., GULHATI, P., EVERS, B.M. 2012. mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Letters*, 319: 1-7.
- ZHANG, H., BAJRASZEWSKI, N., WU, E., WANG, H., MOSEMAN, A.P., DABORA, S.L., GRIFFIN, J.D., KWIATKOWSKI, D.J. 2007. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J. Clin. Invest.*, 117: 730-738.
- ZHAOYU J., WAFIK, S.E. 2005. Overview of Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4(2): 139-163.
- ZIEGLER, U., GROSCURTH, P. 2004. Morphological Features of Cell Death. *News Physiol. Sci.*, 19: 124-128.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Uyruğu: T.C.
Doğum Yeri: Şarköy/TEKİRDAĞ
Doğum Tarihi: 07.03.1989

Eğitim

- 2012 ~ 2015 Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı
(Yük. Lisans)
- 2007 ~ 2011 Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
- 2003 ~ 2007 Şarköy Yabancı Dil Ağırlıklı Lise
- 1995 ~ 2003 Evrenosbey İlköğretim Okulu

Katıldığı Akademik Organizasyonlar

- 2010- 17. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi
- 2014- 22. Ulusal Biyoloji Kongresi