AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN AKT İNHİBİSYONUNUN ANTİ-TÜMÖR AKTİVİTESİNDE RHOB MOLEKÜLÜNÜN REGÜLATİF ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Nurullah AKGÜN
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zekai HALICI

Doktora Tezi-2022

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN AKT İNHİBİSYONUNUN ANTİ-TÜMÖR AKTİVİTESİNDE RHOB MOLEKÜLÜNÜN REGÜLATİF ROLÜNÜN İNCELENMESİ

Nurullah AKGÜN

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zekai HALICI

ERZURUM
2022

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **I**

TEŞEKKÜR ..... **IV**

ÖZET ..... **V**

ABSTRACT ..... **VI**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **VII**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **X**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **XI**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **6**

2.1. Kanser ve Türleri 6

2.1.1. Akciğer Kanseri 7

2.1.1.1. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi 8

2.1.1.2. Akciğer Kanserinde Histopatolojik Sınıflandırma 9

2.1.1.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri 9

2.1.1.2.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri 10

2.2. Akciğer Kanseri Oluşumunda Etkili Hücre-içi Mekanizmalar 10

2.2.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağı 10

2.3. Akt İnhibitörleri 11

2.3.1 Perifosin 12

2.4. RhoB 13

2.4.1. RhoB Up-Regülatörleri 14

2.5. Apoptoz ve Mekanizmaları 15

2.5.1. Ekstrinsik Yolak 16

2.5.2. İntrinsik Yolak 17

3. MATERYAL VE METOT 19

3.1. Materyal 19

3.1.1. Hücre Kültürü Uygulamaları 19

3.1.1.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattı (A549) 19

3.1.1.2. Hücre Sayımı ve Ekimi 19

3.1.1.3. siRNA Aracılığıyla RhoB'nin Susturulması 20

3.1.1.4. Perifosin ve Deksametazon Doz Hesaplaması 21

3.1.1.5. Kullanılan Alet ve Cihazlar 23

3.2. Metot 23

3.2.1. Deney Protokolü ve Detayları 23

3.2.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) ile Proliferasyon Ölçümü 24

3.2.3. Moleküler Analizler 26

3.2.3.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 26

3.2.3.1.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu 26

3.2.3.1.2. Protein Analizi 26

3.2.4. Biyokimyasal Analizler 28

3.2.4.1. Akım Sitometrisi ile Apoptoz Testi 28

3.2.5. İstatistiksel Analiz 29

4. BULGULAR 30

4.1. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) Bulguları 30

4.1.1. Deksametazon Doz Belirleme Çalışması 30

4.1.2. Hücre Proliferasyon Bulguları 31

4.2. Moleküler Bulgular 32

4.2.1. ELISA Bulguları 32

4.3. Biyokimyasal Bulgular 35

4.3.1. Akım Sitometri ile Apoptoz Analiz Bulguları 35

5. TARTIŞMA 38

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 43

KAYNAKLAR 44

EKLER 59

EK-1. ÖZGEÇMİŞ 59

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU 60

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU 61

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında bana yol gösteren, kişisel gelişimime büyük katkı sağlayan, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, öğrencisi olduğum her anın gururunu ömür boyu yaşayacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zekai HALICI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince teorik ve pratik konularda bana yol gösteren, kendisini tanıma fırsatı bulduğum için çok şanslı hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Elif ÇADIRCI'ya ve onun nezdinde Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalının saygıdeğer öğretim üyeleri ve asistanlarına teşekkürlerimi sunarım. Beni Farmakoloji alanına yönlendiren, akademik düzeyde laboratuvar çalışmalarımın temel eğitimini aldığım hocam Sayın Prof. Dr. Martin BERGER'e, tez dönemim boyunca sağladığı katkılardan dolayı hocam Sayın Doç. Dr. Şaziye Sezin YÜCELİK'e, Sayın Prof. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca doktora eğitimim boyunca laboratuvarı paylaşmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Taha TAVACI, Cihad ÖZÇELİK ve Hamza HALICI'ya, tez projemi TDK-2021-8900 numarasıyla destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Akademik gelişimim için beni sürekli destekleyen ve motive eden, akademisyen kimliğiyle kariyer planlamama büyük etkisi olan babama, karşılaştığım zorluklarda hep yanımda olan, bu uzun yolda beni hiç yalnız bırakmayan sevgili eşime ve tüm aileme şükranlarımı iletirim.

Nurullah AKGÜN

ÖZET

Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılan Akt İnhibisyonunun Anti-tümör Aktivitesinde RhoB Molekülünün Regülatif Rolünün İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında (A549) sağlanan Akt inhibisyonunun anti-tümör etkinliğinde RhoB molekülünün regülatif rolünün varlığını araştırmaktır.

Materyal ve Metod: Çalışmamızın tüm aşamalarında A549 hücreleri kullanıldı. Belirlenen tedavi gruplarında Akt inhibitörü perifosin; A549 hücrelerine, siRNA aracılığıyla RhoB susturulmuş A549 hücrelerine ve deksametazon aracılığıyla RhoB up-regüle edilmiş A549 hücrelerine ayrı ayrı uygulandı. Hücre proliferasyonları xCELLigence® Gerçek Zamanlı Hücre Analizi ile tespit edildi. RhoB, pAkt ve Bcl2l11 molekülleri ELISA yöntemi ile analiz edildi. Akım sitometrisi ile apoptoz oranları belirlendi.

Bulgular: 72 saatlik deney sonucuna göre siRNA aracılığıyla RhoB susturulmuş hücrelere Akt inhibitörü uygulanan grup, kontrol ve diğer tedavi gruplarına göre en fazla anti-proliferatif etki gösteren grup oldu. RhoB up-regülasyonunun Akt inhibitörünün anti-proliferatif etkinliğini azalttığı da gözlemlendi. Moleküler analizlere göre siRNA aracılığıyla RhoB susturulmuş hücrelere Akt inhibitörü uygulanan grupta, pAkt seviyesi diğer gruplara göre anlamlı şekilde düşmüş olarak tespit edildi. Ayrıca siRNA-RhoB ile RhoB molekülünün başarılı bir şekilde susturulduğu ve deksametazonun RhoB molekülünü up-regüle ettiği tespit edildi. Apoptotik bir protein olan Bcl2l11 seviyesinde ise siRNA aracılığıyla RhoB susturulmuş hücrelere Akt inhibitörü uygulanan grupta, diğer tedavi gruplarına göre anlamlı bir artış tespit edildi. Akım sitometrisi sonuçlarına göre siRNA aracılığıyla RhoB susturulmuş hücrelere Akt inhibitörü uygulanan gruptaki apoptoz yüzdesi, sadece RhoB baskılanmış ve sadece Akt inhibitörü uygulanan gruplara göre anlamlı şekilde daha yüksek tespit edildi.

Sonuç: RhoB molekülünün küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde Akt inhibisyonunun anti-tümör etkinliği üzerinde negatif yönlü bir regülatör olduğu hem proliferasyon testlerinde hem de apoptoz testlerinde tespit edildi. Bu regülasyonun mekanizmasını aydınlatmak için yapılan moleküler analizlerde hücre içinde pAkt seviyesi üzerinde RhoB'nin doğrudan etkisi olduğu belirlendi. Akt inhibitörünün fosforillenmiş Akt'yi inhibe etme yeteneğinin, RhoB up-regülasyonuyla azalırken, RhoB'nin baskılanmasıyla arttığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, apoptoz, Bcl2l11, PI3K/Akt yolağı, RhoB, xCELLigence

ABSTRACT

Investigation of the Regulative Role of RhoB Molecule on Anti-tumor Activity of Akt Inhibition Use in Lung Cancer Treatment

Aim: The aim of this study is to investigate the regulatory role of RhoB molecule in the anti-tumor activity of Akt inhibition in non-small cell lung cancer cell line (A549).

Material and Method: A549 cells were used in all stages of our study. Akt inhibitor perifosine in the specified treatment groups; It was administered separately to A549 cells alone, to RhoB silenced A549 cells via siRNA and to RhoB up-regulated A549 cells via dexamethasone. Cell proliferations were detected by xCELLigence® Real-Time Cell Analysis. RhoB, pAkt and Bcl2l11 molecules were analyzed by ELISA method. Apoptosis rates were determined by flow cytometry.

Results: According to the results of the 72-hour experiment, the group in which Akt inhibitor was applied to the RhoB-silenced cells via siRNA was the group that showed the most anti-proliferative effect compared to the control and other treatment groups. RhoB up-regulation was also observed to reduce the anti-proliferative activity of the Akt inhibitor. According to the molecular analyzes, the pAkt level was found to be significantly lower in the group in which Akt inhibitor was applied to the RhoB-silenced cells via siRNA, compared to the other groups. It was also found that siRNA-RhoB were successfully silenced RhoB molecule and dexamethasone up-regulated RhoB molecule. There was a significant increase in the level of Bcl2l11, an apoptotic protein, in the group treated with Akt inhibitor to RhoB-silenced cells via siRNA, compared to other treatment groups. According to the results of flow cytometry, the percentage of apoptosis in the group in which Akt inhibitor was applied to the RhoB-silenced cells via siRNA was found to be significantly higher than in the RhoB-suppressed group and Akt-inhibitor alone applied group.

Conclusion: It was determined in both proliferation tests and apoptosis tests that the RhoB molecule was a negative regulator of the anti-tumor activity of Akt inhibition in non-small cell lung cancer. In molecular analyzes carried out to elucidate the mechanism of this regulation, it was determined that RhoB had a direct effect on the level of pAkt in the cell. It was observed that the ability of the Akt inhibitor to inhibit phosphorylated Akt decreased with RhoB up-regulation and increased with suppression of RhoB.

Keywords: Apoptosis, Bcl2l11, lung cancer, PI3K/Akt pathway, RhoB, xCELLigence

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	**:**	Santigrat derece
µ	**:**	Mikro
Akt	**:**	Protein kinaz B
ALK	**:**	Anaplastik lenfoma kinaz
Apaf-1	**:**	Apoptoz proteaz aktive edici faktör-1
APL	**:**	Alkilfosfolipid
ATCC	**:**	American Type Culture Collection
AZD5363	**:**	Akt inhibitörü
BAD	**:**	Bcl-2-ilişkili ölüm promotörü
BAK1	**:**	Bcl-2 antagonisti 1
BAX	**:**	Bcl-2 bağlantılı X proteini
BH3	**:**	Bcl-2 ailesine ait protein
CARD	**:**	Caspase activation and recruitment domain
CDc42Hs	**:**	Hücre bölünmesi kontrol protein 42 homoloğu
CO_2	**:**	Karbondioksit
DISC	**:**	Ölüm indüklü sinyal kompleksi
DNA	**:**	Deoksiribo Nükleik Asit
DR	**:**	Ölüm reseptörü
DSÖ	**:**	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	**:**	Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR	**:**	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	**:**	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	**:**	Fetal sığır serumu
FITC	**:**	Fluorescein isothiocyanate

g	**:**	Gram
G594	**:**	Akt inhibitörü
H89	**:**	Protein kinaz A inhibitörü
GTPaz	**:**	Guanozin trifosfat hidrolize edici enzim ailesi
HER2	**:**	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IC50	**:**	İnhibisyon konsantrasyonu 50
IKKα	**:**	Nükleer faktör kappa B'nin düzenleyicisi
JNK	**:**	C-Jun N-Terminal kinaz
kDA	**:**	Kilodalton
KRAS	**:**	Kirsten rat sarcoma virus
M	**:**	Molar
MAPK	**:**	Mitojenle aktive olan protein kinaz
ml	**:**	Mililitre
mM	**:**	Milimolar
nM	**:**	Nanomolar
PBS	**:**	Fosfat tamponlu salin tuzu
PH	**:**	Plekstrin homoloji
PI	**:**	Propidyum iyodür
PI3K	**:**	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PIK3CA	**:**	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat 3-kinaz Katalitik sub-unit alfa
PIP	**:**	Fostatidil inozitol bifosfat
PKA	**:**	Protein kinaz A
PTEN	**:**	Fosfataz ve tensin homoloğu
Rac	**:**	Ras ilişkili C3 botulinum toksin substratı
RAS	**:**	Protoonkogen

Rho	**:**	Ras homolog
rpm	**:**	Dakikadaki dönüş sayısı
RPMI	**:**	Roswell Park Memorial Enstitüsü Besiyeri
RTCA	**:**	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
RTK	**:**	Reseptör tirozin kinaz
SD	**:**	Standart sapma
siRNA	**:**	Small interfering RNA
T-All	**:**	T hücreli akut lenfoblastik lösemi
TC10	**:**	Rho ailesi üyesi sinyal proteini
TGF- β	**:**	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TKI	**:**	Tirozin kinaz inhibitörü
TP53	**:**	Tümör protein 53
TRAIL	**:**	Tümör nekroz faktörü-ilişkili apoptoz-indükleme ligandı
UV	**:**	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 2.1. 2020 yılına ait dünya genelindeki yeni kanser vakalarının yüzdelik dağılım grafiği. 7

Şekil 2.2. PI3K/Akt sinyal yolağı ile ERK ilişkisi 11

Şekil 2.3. Akt aktivasyonuna neden olan olaylar ve perifosinin potansiyel inhibitör mekanizmaları 13

Şekil 2.4. Kaspaz aracılı apoptoz mekanizmaları 16

Şekil 4.1. Deksametazonun 1 nM, 10nM, 100 nM konsantrasyonlarındaki gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA) grafiği (A) ve 72 saat sonundaki hücre indeksleri 30

Şekil 4.2. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi yöntemiyle elde edilen proliferasyon grafiği (A) ve 72 saat sonundaki hücre indeksleri (B). 32

Şekil 4.3. ELISA'da ölçülen pAkt (A), RhoB (B), Bcl2l11 (C) seviyelerindeki değişim. 34

Şekil 4.4. 72 saat sonunda ölçülen Annexin V/PI apoptoz seviyeleri. 36

Şekil 4.5. 72 saat sonunda ölçülen apoptoz oranları ve değişen hücre canlılığı 37

Şekil 5.1. RhoB'nin Akt inhibisyonu üzerindeki regülatif rolünün sinyal mekanizmaları üzerinden şematik gösterimi 41

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 3.1. siRNA-RhoB Sekansları 20

Tablo 3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar 23

Tablo 3.3. Ön Çalışma Grupları 24

Tablo 3.4. Deney Grupları 25

Tablo 3.5. ELISA Standart Solüsyonun Seyreltme Oranları 27

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, dünya çapında erkeklerde kansere bağlı ölümlerin en büyük nedeni olmakla birlikte kadınlarda kansere bağlı ölümlerin ikinci en büyük nedenidir.[1] Akciğer kanseri; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri olmak üzere iki ana histolojik alt tipe ayrılmıştır.[2] Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, akciğer kanseri teşhislerinin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır[3]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin 5 yıllık sağkalım oranı, tüm evrelerde yaklaşık %15 olmakla birlikte; bu oran erken teşhis ile yükselmektedir.[4]

Akciğer kanseri moleküler olarak heterojen bir hastalıktır ve biyolojisini anlamak, etkili tedavilerin geliştirilmesi için çok önemlidir. Çoğu maligniteye benzer şekilde, akciğer kanseri, farklı moleküler özelliklere sahip hücre alt popülasyonlarından oluşur ve aynı zamanda intratümöral heterojenite ile sonuçlanır.[5] Hastalar için klinik sonuçları anlamlı bir şekilde iyileştirmek giderek daha karmaşık tedavilere ihtiyaç duyulmasına sebep olmaktadır. Bu alandaki ilerleme, son 20 yılda çeşitli hedefe yönelik tedavilerin ortaya çıkması ve ileri evre bazı akciğer kanseri hasta popülasyonlarında immünoterapinin etkili bir şekilde uygulanmasıyla önemli ve umut verici olmuştur. Yine de hedefe yönelik tedavilerden yararlanan popülasyonu genişletmek için yeni gen değişikliklerinin tanımlanması, bunların önlenmesine veya üstesinden gelinmesine olanak vermek için hedefe yönelik tedaviye direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılması gerekmektedir.[6]

Akciğer kanseri tedavisi için birçok yöntem ve ilaç geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir. Kemoterapötik ilaçlar sağladıkları faydaların yanı sıra kanser hücreleri dışında normal hücreler için de toksik özellik göstermektedir.[7] Hücrelerin normal fonksiyonlarında değişikliklere yol açmakta ve sıklıkla yorgunluk, anemi ve saç dökülmesi gibi yan etkiler göstermektedir.[8] Ayrıca hastalar monoterapiye direnç

kazanabileceğinden, kemoterapötik ilaç kombinasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır.[9] Akciğer kanserinin erken evreleri için diğer seçenekler cerrahi ve radyasyon olmasına rağmen bu tedavi seçeneklerinin tümörün etrafındaki mikroskobik kanser hücreleri üzerinde daha düşük bir etkinliği olması gibi dezavantajları bulunur.

Akciğer kanseri tedavisi hedefe yönelik tedaviye olan ilgiyi artırdığından, sistemik kemoterapi akciğer kanseri için hala standart tedavi olmaya devam etmektedir.[9] Fakat özellikle ileri evre akciğer kanserinde kemoterapiye karşı hızlı direnç gelişimi klinikte başarı oranını sınırlandırmaktadır.[10] Son dönemlerde akciğer kanseri için tedavi paradigması hedefe yönelik tedaviye kaymıştır. Bu tedavi türü, hücre yüzeyi reseptörleri veya hücre içi moleküler hedefler olarak bilinen kanser hücrelerinin spesifik özelliklerini hedef alır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) inhibitörleri (erlotinib ve gefitinib) veya anaplastik lenfoma kinaz (ALK) inhibitörleri (crizotinib ve alectinib) gibi akciğer kanseri için birçok hedefe yönelik tedavi mevcuttur. Bunların yanı sıra fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolu, akciğer kanseri dahil birçok kanser türünde anormal şekilde aktive edilir ve bu yolun ilaç inhibitörleriyle hedeflenmesi, hem solid hem de hematolojik tümörler için daha etkili antikanser tedavi ile sonuçlanabilmektedir.[11, 12]

Özellikle konumuzla ilgili olarak PI3K/Akt yolu, hücresel stres sırasında hayatta kalmanın kilit bir düzenleyicisidir.[13] Tümörler, özünde stresli bir ortamda (sınırlı besin ve oksijen kaynağı ve düşük pH ile karakterize) bulunduğundan, bu yolun kanserdeki rolü çok önemli görünmektedir.[14] PI3K/Akt sinyal yolağı, karsinojenezde önemli bir rol oynar ve farklı insan kanseri türlerinde yapısal olarak aktive olduğu tespit edilmiştir.[15] Anormal şekilde aktive edildiğinde, aşağı sinyal moleküllerini aktive edebilir, böylece mide kanseri ve akciğer kanseri gibi çeşitli malign tümörlerin oluşumunu ve gelişimini destekler.[16-18] PI3K/Akt yolunun aktivasyonu, hücre büyümesi ve hayatta kalma

kontrolünün derin bir şekilde bozulmasına neden olur, bu da sonuçta rekabetçi bir büyüme avantajına, metastatik yönelime, anjiyogeneze ve terapi direncine yol açar. Bu nedenle, bu karmaşık yol, antikanser ajanlarının geliştirilmesi için en çekici hedeflerden biri olarak dikkate alınmıştır.[19, 20] Ancak Akt inhibitörleri keşifte ve klinik geliştirmede geride kalmıştır.[21] Çok sayıda çalışma, ilaç geliştirme için iyi onaylanmış bir hedef olarak Akt'nin rolünü desteklemesine rağmen, modern ilaç keşif tekniklerine ve Akt işlevleri ve aktivasyonu ile ilgili artan bilgilere rağmen, onkolojik kullanım için henüz hiçbir Akt inhibitörü onaylanmamıştır.[22] PI3K/Akt'nin regülatör mekanizmalarının derinlemesine anlaşılması, temel regülatörlerin hedeflenmesi yoluyla yeni kanser terapötik hedefleri ve fırsatları sunabilir.[23] Bunların içinde de son yıllarda Rho-GTPaz sınıfı RhoB molekülünün farklı kanser tiplerinde onkojen mi yoksa tümör baskılayıcı mı olduğu tartışmaları,[24] bizlere RhoB'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde Akt inhibisyonu üzerindeki regülatif etkisini düşündürmektedir.

Rho proteinleri, Ras üst ailesine ait olan ve çok çeşitli sinyal yollarında işlev gören küçük moleküllerdir (~21 kDa).[25] Hücre iskeletini düzenlemedeki rolleriyle en iyi bilinen RhoA, RhoB, RhoC, RhoG, RhoE, Rac1, Rac2, Cdc42Hs ve TC10 dahil olmak üzere toplam 20 hücre içi sinyal molekülünden oluşan bir ailedir.[26] RhoA, RhoB ve RhoC proteinleri yaklaşık %85 amino asit özdeşliği bulunmasına rağmen her biri benzersiz biyolojik roller üstlenmektedir.[27] Hücre altı lokalizasyonlarındaki farklılıklar büyük olasılıkla ayrı efektör etkileşimlerine ve dolayısıyla birbirinden farklı işlevlere yol açar. RhoA ve RhoC'nin neredeyse tüm kanser türlerinde pro-tümorijenik olduğu birçok çalışmada net olarak gösterilmiştir.[28-31] Bununla birlikte, RhoB, özellikle tümörijenez ve kanser ilerlemesi bağlamında, yakın aile üyeleri arasında en az çalışmanın yapıldığı moleküldür.[32] RhoA ve RhoC'den farklı birkaç benzersiz post-translasyonel modifikasyonu nedeniyle, RhoB'nin Rho-GTPaz sınıfının en çeşitli

proteini olduğu ileri sürülmektedir. Büyük olasılıkla bu durum kanserdeki ikili rolüne katkıda bulunan bir faktördür.[33]

RhoB, aktin organizasyonunu ve vezikül trafiğini düzenleyen esas olarak endozomal küçük bir GTPaz üyesi moleküldür[28]. RhoB'nin ayrıca endotel hücrelerinde Akt'nin fosforilasyonunu etkilediği ve potansiyel olarak endotelyal hücre sağkalımını düzenlediği gösterilmiştir.[34] Başka çalışmalarda hücre proliferasyonu, hayatta kalma, istila ve metastaz üzerindeki inhibitör etkiler yoluyla kanseri baskılayıcı rolü için ortaya çıkan kanıtlar sunulmuştur.[35, 36] Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise hastaların primer tümöründe düşük RhoB ekspresyonu seviyeleri, EGFR-TKI tedavisine iyi bir yanıtla korele iken, yüksek RhoB seviyelerinde bu yanıt zayıf olarak belirlenmiştir.[37] Ayrıca, aynı çalışmada rekombinant adenoviral transfeksiyon yoluyla RhoB ekspresyonundaki kademeli bir artışın, EGFR mutasyonlu bir akciğer kanseri hücre hattında erlotinib IC50 değerlerini kademeli olarak artırdığı tespit edilmiştir. Fare modellerinde ise Akt inhibitörü olan G594 ile Akt'nin inhibisyonu, erlotinib'e karşı RhoB'nin neden olduğu direnci tersine çevirdiği belirlenmiştir. Ortaya çıkan kanıtlar, RhoB'nin tümörijenik fonksiyonları desteklemedeki potansiyel rollerini açığa çıkarmaya devam etmektedir. Örneğin, RhoB ekspresyonu, normal T hücreleri ile karşılaştırıldığında T-akut lenfoblastik lösemi (T-All) hücrelerinde daha fazla eksprese edilmektedir.[38]

Bu paradoksal gözlemler, RhoB'nin kanserdeki işlevlerinin yüksek oranda içeriğe bağlı ve hücre tipine özgü olduğunu göstermektedir. RhoB'nin tümörün başlamasına karşı tümör ilerlemesi ve saldırganlık bağlamında iki farklı ve birbirine zıt roller oynadığı da gösterilmiştir.[24] Bu bağlamda RhoB'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri özelinde Akt inhibisyonunun anti-tümör etkinliğine etkisi soru işaretleri taşımaktadır.

Bu çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattında (A549) RhoB'nin deksametazon aracılığıyla up-regüle edilmesi[39] veya siRNA aracılığıyla susturulması durumlarında Akt inhibitörü perifosinin anti-tümör etkinliği incelenmiştir. Ayrıca, RhoB'nin Akt inhibisyonu ile ilişkisinin moleküler mekanizmaları ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Türleri

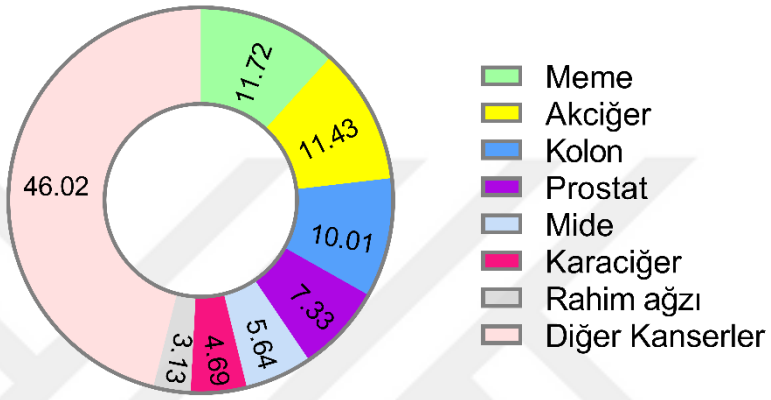
Vücuttaki organları veya dokuları etkileyen "kanser" olarak adlandırılan iki yüzden fazla hastalık formu tanımlanmıştır.[40] Merkezi endojen kontrol mekanizmalarından kaçmayı başaran, kontrolsüz hücresel replikasyon ve normal dokulara göre düzensiz büyüme gibi birkaç ortak özellik ile karakterize edilmiştir.[41]

Neoplazmların gelişimini tetikleyen birincil faktörler, genetik yatkınlık, virüsler gibi bir dizi enfeksiyöz ajan, kanserojenlere mesleki maruziyet, yaş ve yaşam tarzıdır. Bu bağlamda, egzersiz eksikliği, obezite, alkol tüketimi, sigara ve aşırı UV radyasyonuna maruz kalmanın tüm vakaların %42'sine kadar sorumlu olabileceği öne sürülmüştür.[42] Hem hastalığın tam olarak anlaşılması hem de daha etkili ve daha güvenli tedavilerin keşfedilmesi amacıyla kanser araştırmaları bilimsel alanda popülerliğini korumaktadır.

Kanserin türü belirlenirken vücutta ilk ortaya çıktığı yere göre adı konulmaktadır ve genellikle akciğer, prostat, kolon, mide, meme, pankreas ve cilt kanserleri ile karşılaşılmaktadır. Kanserler kaynaklandıkları hücrelere ya da dokulara göre de alt sınıflara ayrılır. Karsinoma ve sarkoma bu sınıflandırmaya örnek olarak verilebilir. Karsinoma sınıfı kanserler; akciğer, prostat ve meme kanserleri gibi epitel hücre kaynaklı kanser türlerini oluştururken, sarkoma kanser türleri ise kemik gibi sert dokularda veya kan damarları gibi yumuşak dokularda oluşmaktadır. Kanser türlerinin çoğu doku kitlelerinden oluşan tümör formunda olmasına rağmen her tümör kanser olarak adlandırılmamaktadır. Tümörler kötü huylu (malign) olduğu gibi iyi huylu (benign) da olabilmektedir. İyi huylu tümörler çoğalmalarına rağmen yayılma eğiliminde değildir. Ancak kötü huylu tümörler çevre dokulara yayılım gösterdikleri için kanser olarak adlandırılır. Kanser hücreleri primer olarak ortaya çıktıkları dokudan

başka dokulara invazyonu (metastaz) lenf sistemleri ya da kan dolaşımıyla yapmaktadır.[43, 44]

Tüm dünyada 2020 yılında 19.292.789 yeni kanser vakası tespit edilmiştir. Bu vakaların %11.72'si meme kanseri, %11.43'ü akciğer kanseri, %10.01'i kolon kanseri, %7.33'ü prostat kanseri, %5.64'ü mide kanseri, %4.69'u karaciğer kanseri, %3.13'ü rahim ağzı kanseri ve %46.02'si diğer kanserler olarak tespit edilmiştir (Şekil 2.1).[45]



Şekil 2.1. 2020 yılına ait dünya genelindeki yeni kanser vakalarının yüzdelik dağılım grafiği.

2.1.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir ve sırasıyla prostat ve meme kanseri insidansında ikincil pozisyondadır. İnsidans ve mortalite son 30 yılda bir azalma yaşamış olsa da hala dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenini temsil etmektedir. Akciğer kanseri küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakaların büyük bir kısmını oluşturur ve histolojik özelliklere göre üç grupta sınıflandırılabilir: skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom. Tüm vakalarının yarısı, glandüler histolojiye sahip malign tümörler olan ve distal hava yollarından, özellikle bronşiyol ve alveolar epitel hücrelerinden türeyen adenokarsinomlar olarak kategorize

edilir. Vakaların %40'ında meydana gelen skuamöz hücreli karsinomlar tipik olarak bronşiyal epitel hücrelerinden kaynaklanır ve skuamöz farklılaşma ile karakterize edilirken, büyük hücreli karsinomların insidansı daha düşüktür ve skuamöz veya glandüler farklılaşma olmamasına göre teşhis edilir. Spesifik hücre veya orijin hücreleri, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin histolojik çeşitliliğine katkıda bulunur.[46]

2.1.1.1. Akciğer Kanserinin Etiyolojisi

Akciğer kanseri gelişiminde başta sigara kullanımı ve pasif içicilik olmak üzere cinsiyet, yaş, ırk, radyasyon, çalışma koşulları, hava kirliliği, karsinojenler, beslenme, viral enfeksiyonlar, immünolojik faktörler ve akciğer kanserine genetik yatkınlık gibi birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar arasında sigara veya tütün kullanımı akciğer kanseri gelişiminde en etkili faktör olarak belirlenmiştir.[47]

Akciğer kanseri patogenezindeki en önemli faktör olarak belirtilen sigara veya tütün kullanımı, akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %80'inden sorumlu tutulmaktadır. Kullanılan sigara veya tütün miktarının ve kullanım süresinin artmasıyla doğru orantılı olarak akciğer kanserine yakalanma riskini de artırmaktadır.[48] Sigara veya tütün kullanımı, akciğer kanserinin histopatolojisini belirleyen faktör olarak kişinin küçük hücreli akciğer kanseri ya da skuamöz hücreli akciğer kanserine yakalanma eğilimi artırır.[49] Sigara kullanılmadığı halde sigara dumanına maruziyetin kanser gelişim riskini yaklaşık %3 oranında artırdığı bildirilmiştir.[50]

Akciğer kanserinde etnik kökenin az da olsa önemi bildirilmiştir. Erkeklerde akciğer kanserine yakalanma riski %7.5 ile en yüksek Afrika asıllı Amerikalılardadır. Riskin en düşük olduğu toplum ise İsveçliler olarak belirlenmiştir. Kadınlarda da erkeklerde olduğu gibi en yüksek risk %3.5 ile Afrika asıllı Amerikalılarda olmakla birlikte en düşük riskin Fransız ve Korelilerde olduğu bildirilmiştir.[51]

Çalışma koşulları veya çevresel etkenler sebebiyle akciğer kanserine neden olduğu bilinen en önemli kanserojenler radon gazı ve asbesttir. Bunların dışında, formaldehit, kadmiyum, berilyum, vinil klorür, krom, silika ve iyonize radyasyonu içeren etkenler akciğer kanseri oluşumunu artırmaktadır. Sigara ve tütün kullanımı ile bahsi geçen etkenler bir araya geldiğinde akciğer kanseri oluşum riskini fazlasıyla artırmaktadır.[49]

2.1.1.2. Akciğer Kanserinde Histopatolojik Sınıflandırma

Akciğer ve plevral tümörlerin DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) histolojik tiplemesi, iki kategoriye ayrılan dört ana histolojik akciğer kanseri tipini tanımlamıştır: küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri.[52, 53] Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu ayrıca akciğer adenokarsinomu, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üçe ayrılır.[54] Akciğer kanseri sınıflandırması 2015 yılında güncellenmiştir.[55] Skuamöz hücreli karsinom, küçük hücreli karsinom ve adenokarsinom, sigara içmeyle ilişkili yaygın histolojik tiplerdir ve adenokarsinom, sigarayla güçlü bir bağlantı gösterir.[52, 56] Bununla birlikte, adenokarsinom sigara içmeyenlerde hala en yaygın histolojik alt tiptir. Son veriler, adenokarsinom insidansında bir artış ve buna karşılık gelen skuamöz hücreli karsinom insidansında bir azalma olduğunu göstermiştir, bu eğilimin sigara bileşimi ve tasarımındaki değişikliklerden (azalan nikotin/katran içeriği ve sigara filtrelerinin eklenmesi) kaynaklandığı varsayılmaktadır.[52]

2.1.1.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli akciğer kanseri, tedavisi son 30 yılda çok az değişen ve ABD Kongresi ve Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) bunu “inatçı” bir kanser olarak etiketlemesine neden olan bir nöroendokrin (NE) programını ifade eden ölümcül ve oldukça metastatik bir akciğer kanseri formudur.[57]

2.1.1.2.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, akciğer kanseri vakalarının çoğunluğunu (%85) oluşturur ve genellikle üç histolojik alt tipe ayrılır: skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom. Adenokarsinom (%40) ve skuamöz hücreli karsinom (%30) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri vakalarının çoğundan sorumludur.[54]

2.2. Akciğer Kanseri Oluşumunda Etkili Hücre-içi Mekanizmalar

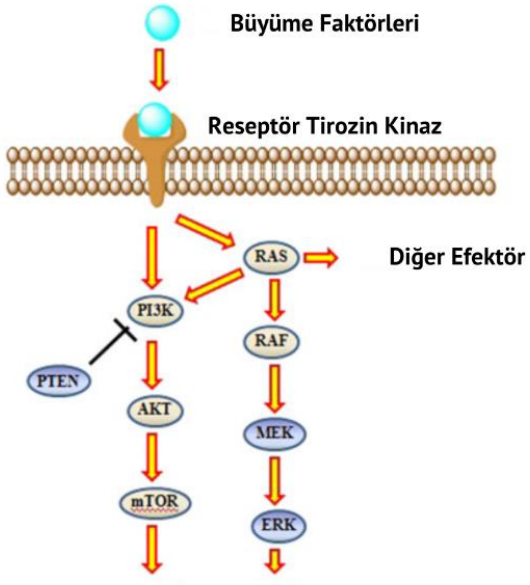
Proto-onkogenlerdeki anormallikler kanser gelişimi ve hastalık ilerlemesi ile yüksek oranda ilişkilidir. Onkogen aktivasyonu esas olarak genetik değişikliklere atfedilir, ancak hücre dışı sinyal uyaranlarından da kaynaklanabilir. Hücre dışı büyüme faktörlerinin konsantrasyonundaki artış, reseptör tirozin kinaz (RTK) aktivitesinin uyarılmasına neden olan hücresel reseptörlerin (örneğin EGFR) aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu durum; KRAS, PIK3CA ve Akt gibi çeşitli sinyal efektörlerinin aracılık ettiği sinyal yollarına sinyal iletimini başlatır. PI3K/Akt sinyal yolu ve RAS/RAF/MEK/mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolu, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde en çok çalışılan mekanizmalardır. Ek olarak, TP53 ve PTEN gibi tümör baskılayıcı genler ve bunların transkripsiyonel olarak eksprese edilen protein ürünleri, hücre büyümesi ve ölümünün düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Bu tümör baskılayıcıların ekspresyonu, platin ajan bazlı kemoterapi gibi kanser tedavilerinin etkinliği ile de ilişkilidir. Kanser ortamında, tümör baskılayıcı genler, gen ekspresyonunun düzensizliği yoluyla devre dışı bırakılma veya aşağı-regüle olma eğilimindedir ve bu genellikle tedavilere duyarlılıkta bir azalmaya yol açar.[58]

2.2.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağı

PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dahil birçok kanserin onkogenezinde yer aldığı belgelenmiş ve birçok genetik değişiklik

aracılığıyla kanser gelişimine yön verdiği gösterilmiştir. Bunlara PIK3CA mutasyonları veya amplifikasyonları,[59] PTEN mutasyonları veya delesyonları, EGFR veya HER2 mutasyonları dahildir.[60-63]

Akt aktivasyonunun işlevi, çeşitli sitoplazmik proteinleri fosforile ederek hücre büyümesine ve hayatta kalmasına aracılık etmektir. Akt'nin ana akış aşağı efektörü serin/treonin kinaz-mTOR'dur.[64] PI3K/Akt/mTOR sinyalleşmesinin aktivasyonu genellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde kuralsızlaştırılır ve kademeli bileşenlerdeki genetik sapmalarla ilişkilendirilir.[60] Akt tarafından aktive edilen diğer aşağı akış efektörleri arasında MDM2 ve IKKα (nükleer faktör kappa B'nin (NF-κB) düzenleyicisi) bulunurken, Akt tarafından etkisiz hale getirilen efektörler arasında BAD (Bcl-2-ilişkili ölüm promotörü) ve kaspaz-9 belirlenmiştir.[64] Ek olarak, birçok Akt akış aşağı efektörü ERK ile birlikte düzenlenir; Akt ve ERK sinyalleri, hücre hayatta kalma süreçlerinin aktivasyonunda birbirlerinin yerini alabilir (Şekil 2.2).[64, 65]



Şekil 2.2. PI3K/Akt sinyal yolağı ile ERK ilişkisi.[65]

2.3. Akt İnhibitörleri

Akt aktivasyonu, tümörün ilerlemesini ve birçok kemoterapötik ajana direnci

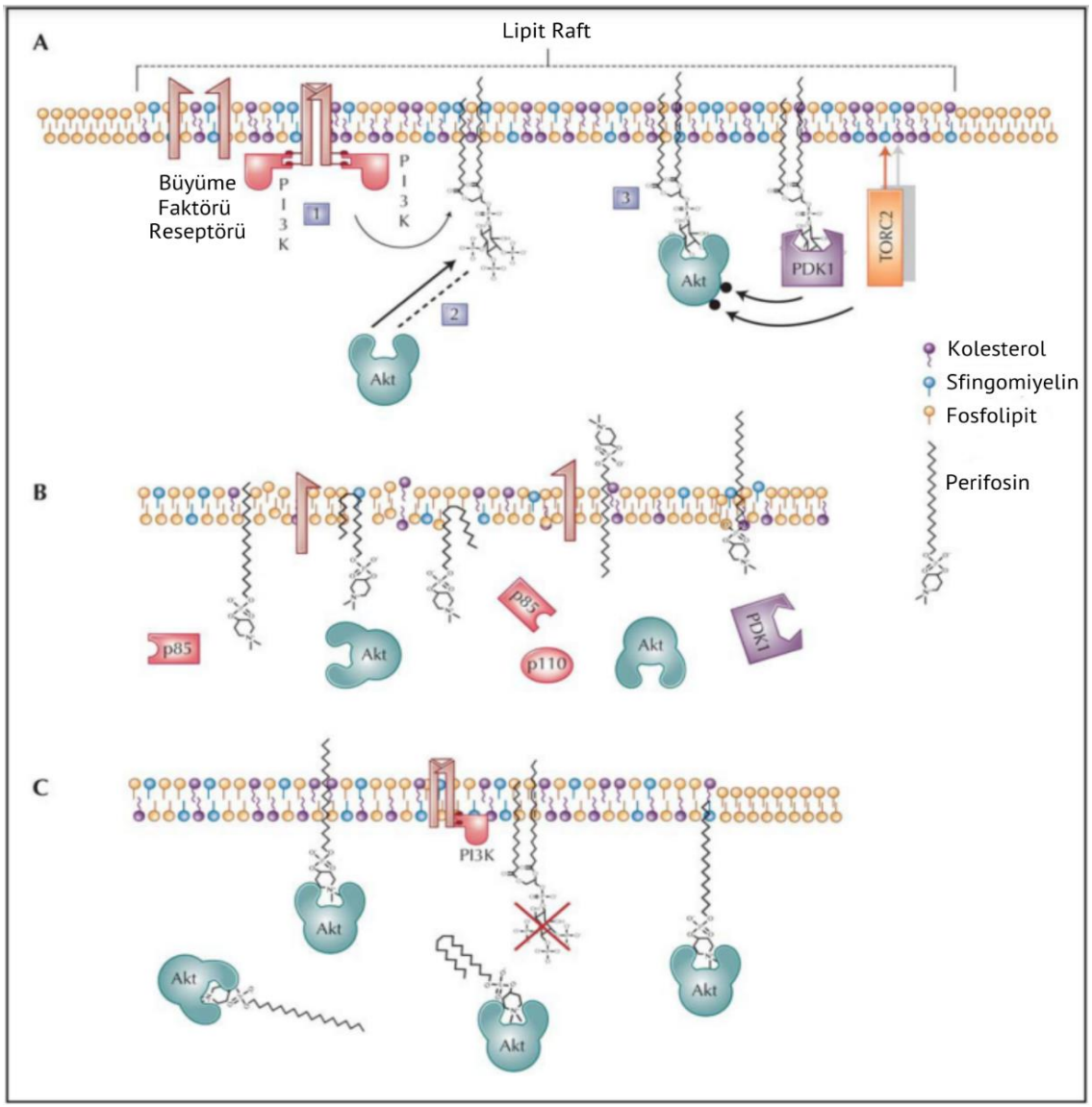
artırır.[66-68] Bu nedenle Akt, kanser tedavisi için rasyonel bir hedef olarak kabul edilmektedir. İlk Akt inhibitörü ML-9 (1-(5-kloronaftalin-1-sülfonil)-1H-heksahidro-1,4-diazepin) 2000 yılında kayıtlara geçmiştir.[69] Protein kinaz A (PKA) inhibitörü H-89 baz alınarak, 2002'de Akt'yi PKA'dan 2.4 kat daha iyi inhibe etmek için yeni bir NL-71-101 bileşiği geliştirilmiştir.[70] Akt inhibitörleri olarak bir dizi 3-deoksijenli eter lipid-tipi fosfatidilinositol analogunun l-quebrachitol'den sentezi 2003 yılında rapor edilmiştir.[71] Bir yıl sonra ise Akt inhibitörlerinden biri olan perifosin için yapılan faz I klinik deneyinin sonuçları bildirilmiştir.[72] Şu anda, capivasertib (AZD5363) ve ipatasertib gibi bazı Akt inhibitörleri, faz III klinik deneylerinde değerlendirilmektedir.[73]

2.3.1 Perifosin

Perifosin, Akt inhibitörü olan sentetik bir oral alkilfosfolipiddir (APL) (Şekil 2.3). Edelfosin ve miltefosini de içeren bir antitümör APL sınıfına aittir ve orijinal olarak lizofosfatidilkolin yapısına dayanmaktadır. APL'lerin in vitro normal hematolojik hücrelere karşı neoplastik seçiciliğe sahip olduğu gösterilmiştir. İn vivo olarak perifosin, trombositoz ve lökositozu indüklemiş, murin iliği ve dalağında miyelopoezi artırmış olmasına rağmen miyelom ksenograftlarında apoptoza neden olmuştur.[66] Bu seçiciliğin nedeni bilinmemektedir. İn vitro, perifosinin Akt'yi düşük mikromolar konsantrasyonlarda inhibe ettiği gösterilmiş ve inhibisyon in vivo olarak birçok ksenograft modelinde ölçülmüştür.[74-78]

Akt, fosforilasyon ile aktive edilmektedir ve Akt'nin fosforilasyonu bu enzimin aktivasyonu için bir belirteç durumundadır. Perifosinin doza bağımlı bir şekilde AKT'nin indüklenebilir fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir Ayrıca bazı hücre tiplerinde Akt'nin inhibisyonuna ek olarak perifosinin MEK-ERK 1/2 yolağını baskıladığı ve proapoptotik c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ağını aktive ettiği

gösterilmiştir. Bu sayede hayatta kalma ve ölüm sinyalizasyon kaskadları arasındaki dengeyi modüle etmekte ve apoptozu indüklemektedir.[78-80]



Şekil 2.3. Akt aktivasyonuna neden olan olaylar ve perifosinin potansiyel inhibitör mekanizmaları. **A**, Lipit raftlarda Akt aktivasyonu. 1) Ligand bağlama yoluyla büyüme faktörü reseptörü aktivasyonu sonucu PI3K'nın aktivasyonu. 2) Akt'nin plekstrin homoloji (PH) domaini, membranda PIP2 veya PIP3'e bağlanır. 3) Akt, membranda PDK1 ve TORC2 kompleksi tarafından fosforilasyon yoluyla aktive edilir. **B ve C**, Perifosinin olası etki mekanizmalarını göstermektedir. **B**, Perifosin, lipit raftların yapısını ve sinyalleşmesini bozarak Akt'nin membrana alınmasını önler. **C**, Perifosin, Akt'nin PH domainine doğrudan bağlanır ve onu inhibe eder.[81]

2.4. RhoB

RhoB, Rho GTPaz ailesinin bir üyesidir ve temelde endositoz ve vezikül trafiğine dahil olur. Ayrıca hücrelerde epidermal büyüme faktörü reseptörü, trombosit

kaynaklı büyüme faktörü reseptörü gibi çeşitli reseptörler ve sinyal moleküllerinin yanı sıra src ve Akt gibi reseptörü olmayan kinazları hedef alan sitoplazmik membrana da katkıda bulunur.[34, 82, 83]

Rho GTPazlar, hücre göçü ve proliferasyonunu düzenlemede önemli bir rol oynar ve bu nedenle kanser progresyonu ve metastazındaki rolleri için geniş çapta çalışmalar yapılmıştır.[26, 84, 85] Rho GTPazlardan RhoA, RhoB ve RhoC yüksek oranda korunmuş olmalarına ve %85'ten fazla amino asit sekans özdeşliği paylaşmasına rağmen, tümör progresyonunda farklı roller oynuyor gibi görünmektedir. RhoA ve RhoC, tümör ilerlemesini teşvik etmede rol oynarken, RhoB'nin kanserdeki rolü açıkça tanımlanmamıştır. RhoB ilk olarak Ras kaynaklı fibroblast transformasyonuna katkıda bulunmak için tanımlanmıştır.[86] Ek çalışmalar ayrıca RhoB için onkojenik bir rol ortaya çıkarmıştır. Örneğin, hücre içi RhoB azalması, hücre döngüsünün durmasına, apoptoza ve in vivo glioblastoma hücrelerinin tümörijenik potansiyelinin azalmasına yol açmıştır.[87] Benzer şekilde, normal doku ile karşılaştırıldığında meme tümörlerinde RhoB seviyelerinin arttığı bulunmuştur.[88] Düşük RhoB ekspresyonu seviyeleri hastaların primer tümöründe, epidermal büyüme faktörü reseptörü tirozin kinaz inhibitörü tedavisine olumlu bir yanıt verirken, yüksek RhoB seviyeleri akciğer kanseri hastalarında aynı tedaviye zayıf bir yanıt vermiştir.[37] Öte yandan, diğer çalışmalarda RhoB için ayrıca bir tümör baskılayıcı rol ortaya çıkmıştır. Örneğin, RhoB'nin aşırı ekspresyonunun yumurtalık kanseri hücre proliferasyonunda azalmaya ve apoptozda artışa sebep olduğu gösterilmiştir.[89]

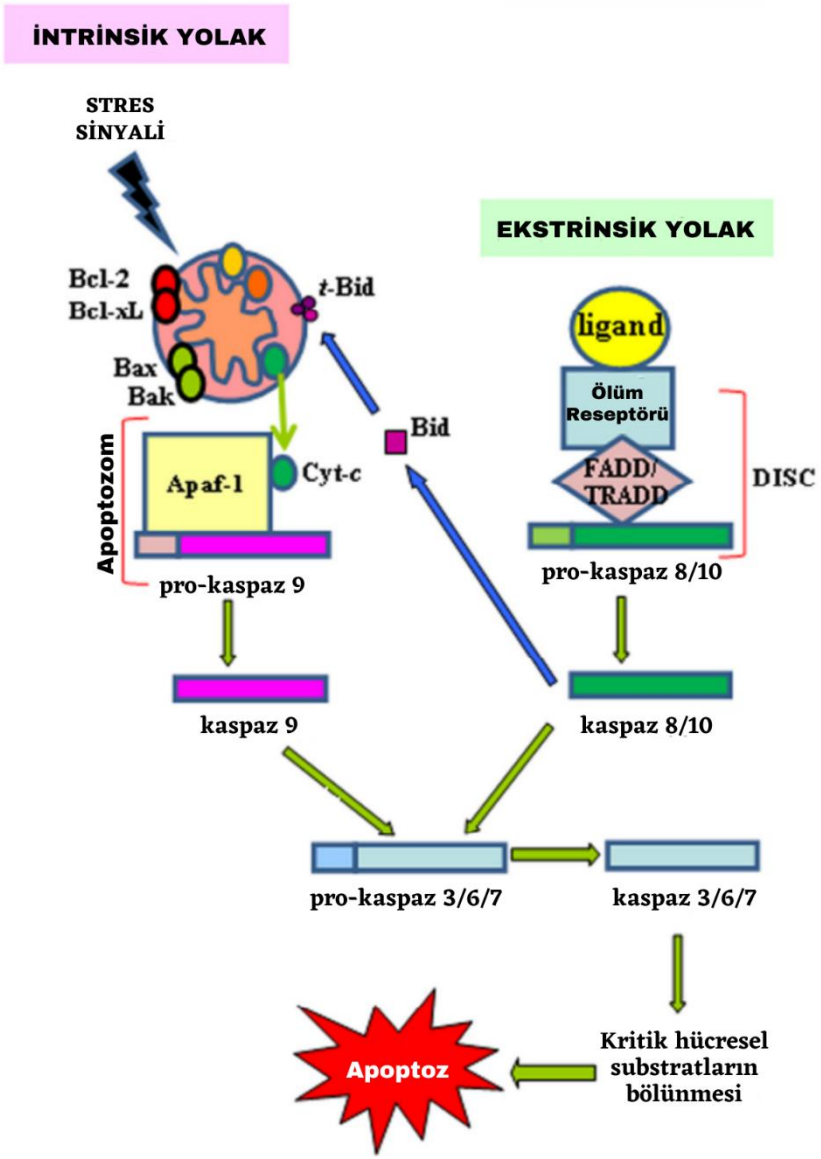
2.4.1. RhoB Up-Regülatörleri

RhoB, sitokinler veya TGF-β gibi büyüme faktörleri tarafından hızla up-regüle edilip genotoksik stres ve ısı stresi ile aktive edilebilir.[35, 85, 90-94] Ayrıca deksametazon

gibi glukokortikoidler aracılığıyla küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre kültürlerinde RhoB up-regülasyonu başarıyla gösterilmiştir.[39]

2.5. Apoptoz ve Mekanizmaları

Apoptoz, yani programlanmış hücre ölümü; DNA hasarı sebebiyle veya gelişim sırasında oluşan hasarlı hücrelerin gen seviyesinde düzenli ve etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasıdır.[95] Apoptoz mekanizması karmaşıktır ve birçok sinyal yolunu içerir. Apoptoz, bir hücrede kaspaz aracılı ekstrinsik veya intrinsik yollar aracılığıyla tetiklenebilir (Şekil 2.4). Her iki yol da hücrede efektör apoptotik kaspazları aktive etmek için birleşir ve sonuçta apoptozun özellikleri olan morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle sonuçlanır.[96, 97] Genellikle, proapoptotik ve anti-apoptotik protein düzenleyicileri arasındaki denge, bir hücrenin apoptoza uğrayıp uğramadığını belirlemek için kritik bir noktadır. Prekanseröz lezyonlarda DNA hasarının bir sonucu olarak apoptozun indüklenmesi, potansiyel olarak zararlı hücreleri uzaklaştırabilir ve böylece tümör büyümesini bloke edebilir. Bu hücre ölüm süreci düzeninin bozulması, kontrolsüz hücre çoğalması, kanserin gelişmesi ve ilaç tedavilerine karşı kanser direnci ile doğrudan ilişkilidir.[98, 99] Bu nedenle apoptoz düzeninin bozulması kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilir.[100] Apoptotik dirençle ilgili molekülleri hedef alan terapötik stratejiler bu nedenle kanser hücrelerinin apoptoza duyarlılığını geri kazandırmak ve tedavilerin etkisizliğinin üstesinden gelmek için izlenecek geçerli bir yaklaşımı temsil eder.[101, 102]



Şekil 2.4. Kaspaz aracılı apoptoz mekanizmaları.[97]

2.5.1. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik apoptotik yolak (ölüm reseptörüne bağımlı), tümör nekroz faktör reseptörünün (TNFR) süper ailesine ait hücre yüzeyine maruz kalan ölüm reseptörlerinin ilgili proteinin TNF ailesi ligandları ile etkileşimi sonucu başlatılır.[103] Ölüm reseptörleri yapısal olarak, apoptozu indükleyen sinyalleşmede kritik bir rol oynayan ve ölüm domaini (DD) olarak adlandırılan hücre içi protein-protein etkileşim alanı tarafından tanımlanır.[104] Tanımlanan ölüm reseptörleri; FAS, DR-3, DR-6,

TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF-R1, p75-NGFR ve ektodisplazin-A'dır. Ölüm reseptörleri ilgili ligandları ile etkileşime girerek trimerik bir yapı kazanmaktadır. Trimerik yapı kazanan reseptörler ile adaptör moleküller, prokaspazla birleşerek ölüm indüklü sinyal kompleksi (DISC) adı verilen bir yapı meydana getirir. DISC içinde inaktif durumda bulunan prokaspaz-8'in ve/veya -10'un kaspaz-8'e ve/veya -10'a dönüşümü tetiklenir. Ardından bu durum hücre canlılığı için temel bazı substratların bölünmesine yol açarak hücre ölümünü indükleyen efektör kaspazların (-3, -6 ve -7) işlenmesiyle sonuçlanır.[105, 106]

2.5.2. İntrinsik Yolak

İntrinsik apoptotik yolak (mitokondriye bağımlı), farklı stres koşullarına (radyasyon, kemoterapötik ajanlarla tedavi vb.) yanıt olarak mitokondriyal seviyede birleşen hücre içi sinyaller aracılığıyla gerçekleşir.[107] Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik Ca+ konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyaranlar, intrinsik mitokondriyal yolağın başlatılmasının bazı tetikleyicileridir.[108] Bcl-2 ailesinin yalnızca proapoptotik-BH3 üyelerinin (Bax, Bak) aktivasyonu, antiapoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'i nötralize ederek mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin (MOMP) bozulmasına yol açarak normalde zarlar arası boşlukta bulunan proteinlerin sitozole yayılmasını sağlar. Bu proteinler arasında sitozolde mitokondriye bağlı ölümü aktive etmede çok önemli bir rol oynayan sitokrom-c gibi apoptojenik faktörler bulunur.[109] Sitokrom-c, sitozolik Apaf-1'e (apoptoz proteaz aktive edici faktör-1) bağlanır ve başlatıcı pro-kaspaz-9'u, CARD'a (Caspase activation and recruitment domain) alan, otoaktivasyona ve ardından proteolize izin veren apoptozom adlı bir kompleksin oluşumunu tetikler. İşlem sırayla apoptotik hücre ölümüne yol açan hücresel substratların bölünmesi için aşağı akış yürütücü kaspazları (-3, -6 ve -7) aktive eder.[110, 111]

Bcl2l11 (BIM)

İntrinsik, yani mitokondriye bağımlı yolun, Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlendiğinden bahsetmiştik. Pro-apoptotik hareketlere yanıt olarak, Bax ve Bak1, apoptozu indüklemek için kaspazları aktive eder. Yalnızca BH3 proteinlerinin, Bax-Bak1'i dizginleme yeteneklerini engellemek için Bcl-2 proteinlerine bağlandığı veya Bax-Bak1'i aktive ederek hücreleri öldürdüğü görülmektedir. BH3 proteini olarak yalnızca Bcl2l11 (BIM), Bcl-2 proteinlerini inhibe edebilir ve Bax-Bak1 proteinlerini aktive edebilir. Sağlıklı hücrelerde, Bcl2l11, dynein hafif zincir 1 tarafından mikrotübüllere sekestre edilir ve inaktif kalır. Ölüm uyaranlarına yanıt olarak, Bcl2l11 fosforile edilir, DYNLL1'den salınır ve apoptozu indükleyebilir.[112]

3. MATERYAL VE METOT

"Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılan Akt İnhibisyonunun anti-tümör aktivitesinde RhoB Molekülünün Regülatif Rolünün İncelenmesi" adlı tez çalışması Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından TDK-2021-8900 proje numarasıyla desteklenmiştir. Bu çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun B.30.2.ATA.0.01.00/377 sayılı 74 nolu kararıyla etik kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir. Tüm hücre kültürü ve analiz çalışmaları Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında, akım sitometrisi çalışmaları Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DAYTAM) gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Hücre Kültürü Uygulamaları

3.1.1.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattı (A549)

Bu tez çalışmasında RhoB molekülünün, akciğer kanserinde gerçekleştirilen Akt inhibisyonunun anti-tümör etkinliği üzerindeki regülatif rolünü incelemek amacıyla A549 (ATCC, ABD) hücreleri kullanılmıştır. A549 hücrelerinin çoğalması için içerisinde %10 FBS, %1 PSA ve 2mM L-Glutamin bulunan RPMI (Capricorn-Scientific, Almanya) besiyeri kullanıldı. Hücreler T75cm^2'lik flasklara ekildi ve uygun inkübasyon ortamı 37 ^oC, %5 CO_2 ve %90 nem şartlarına sahip olan etüv aracılığıyla sağlandı. Yapılan tüm hücre kültürü uygulama çalışmaları tam steril laminar akımlı kabinde yapıldı. Hücreler çoğaldıktan sonra hücre sayımı ve ekimi aşamasına geçildi.

3.1.1.2. Hücre Sayımı ve Ekimi

Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra hücre flaskı laminar kabine alınıp içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 1X soğuk steril fostat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkanma işlemini takiben yaklaşık 2 ml fenol kırmızısı içermeyen tripsin-

EDTA solüsyonu flask içerisine eklendi. Tripsine maruz bırakılan hücreler inkübatör içerisinde yaklaşık iki dakika bekletildi. Hücrelerin yüzeyle olan bağlarının ayrılması amacıyla mekanik hamleler uygulandı. Yüzeye yapışık hücrelerin kaldırılmasının ardından vakit kaybetmeden laminar akımlı kabin içerisine alınan hücrelere, tripsinin etkisinin nötralize edilmesi amacıyla yaklaşık 2 ml medyum eklendi. Flask içerisindeki süspande hücreler bir falkon tüpüne alındı ve 1000 rpm'de iki dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım atıldı. Falkon tüp içerisinde çökelmiş halde bulunan hücrelerin üzerine 1 ml medyum eklenerek resüspende edildi ve hücre sayımına geçildi. 90 µL PBS, 100 µL 2X Tripan Mavisi ve 10 µL resüspende edilen hücre çözeltisi karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µL alınarak vakit kaybedilmeden Cedex hücre sayım cihazının plakasına yüklendi ve mililitredeki canlı hücre sayısı cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.

3.1.1.3. siRNA Aracılığıyla RhoB'nin Susturulması

RhoB'yi susturma (knockdown) amacıyla siRNA-RhoB (MyBioSource, ABD) kullanıldı (Tablo 3.1). Transfeksiyona aracılık etmesi amacıyla Lipofectamine™ RNAiMAX (Thermo, ABD) transfeksiyon ajanı kullanıldı.

Tablo 3.1. siRNA-RhoB Sekansları

siRNA-RhoB tipi	**siRNA-RhoB sekansları**
RhoB-siRNA (İnsan)-A	GCAAGAAGCUGGUGGUGGUTT
	ACCACCACCAGCUUCUUGCTT
RhoB-siRNA (İnsan)-B	ACGUCAUUCUCAUGUGCUUTT
	AAGCACAUGAGAAUGACGUTT
RhoB-siRNA (İnsan)-C	CCAUCAUCCUGGUGGCCAATT
	UUGGCCACCAGGAUGAUGGTT

Çalışmalarımızda transfeksiyon için negatif kontrol olarak siRNA uygulanmayan, sadece transfeksiyon ajanı uygulanan hücreler (Mock Kontrol) test edildi. A549 hücrelerinde, ilgili çalışmanın gerçekleştirildiği kuyucuk ve plakalarda transfeksiyonu sağlamak amacıyla üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde hareket edildi. Hücrelerin ekiminin üzerinden 24 saat geçtikten sonra transfeksiyon işlemi başlatıldı. Liyofilize halde bulunan siRNA molekülleri RNaz içermeyen suda çözündükten sonra yukarıda sekansları belirtilen üç farklı çift-zincir siRNA içeren siRNA havuzu oluşturuldu. Firmanın protokolünde belirttiği hacim oranlarında Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı ile siRNA havuzu antibiyotiksiz ve serum içermeyen besiyeri ile dilüe edilerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemin ardından 24 saattir inkübasyonda bekleyen hücrelerin besiyeri, serum ve antibiyotik içermeyen besiyeri ile değiştirildi. Ardından siRNA havuzu belirlenen hacimde ilave edilerek 100 nM siRNA uygulaması gerçekleştirildi. Yaklaşık altı saat sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve serum içeren besiyeri ile değiştirildi. Ayrıca siRNA uygulamasına ek olarak perifosin (Sigma, ABD) tedavisi eklenecek olan gruplarda perifosin, siRNA aracılığıyla transfeksiyon işleminden 6 saat sonra ilave edildi.

3.1.1.4. Perifosin ve Deksametazon Doz Hesaplaması

Çalışmalar deney türüne göre e-plakada veya 6 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirildiği için her bir deney türünde, doz konsantrasyonunu karşılayacak şekilde hacimler ayrı ayrı belirlendi. Deney protokolündeki son hacim değişmeyecek şekilde ilacın istenen dozuna, stok çözeltisinin belirli bir oranda dilüe edilmesiyle ulaşıldı. Deneyler siRNA ve deksametazon ilavesini takiben yaklaşık 72 saat sürdü. Bu sebeple, perifosin için daha önceki bir çalışmada 72 saat için 10 μM olarak belirlenmiş olan IC50 değerine göre hesaplamalarımız yapıldı.[113] Deksametazon 100 nM olarak daha önceki bir çalışmada A549 hücrelerinde RhoB'yi up-regüle ettiği gösterilmiş olsa da

çalışmamızda 100 nM'ın yanı sıra 10 nM ve 1 nM dozlar için hem proliferasyon üzerindeki etkisine hem de RhoB'yi up-regüle etme oranına ilişkin çalışma yapıldı.[39]

Akt inhibitörü perifosin için; 10 mM konsantrasyona sahip ilk stok çözelti PBS ile hazırlandı. 10 mM çözeltiden 1 µL pipetle çekildi ve mikro eppendorf tüpe alındı. PBS ile 100 µL'ye tamamlandı ve karıştırılarak 100 µM konsantrasyona sahip ikinci perifosin stok çözeltisi elde edildi. E-plakada perifosin uygulanacağında 10 µM perifosin uygulaması için 100 µL besiyeri bulunan kuyucuktan 10 µL besiyeri uzaklaştırıldı, yerine 10 µL ikinci perifosin stok çözeltisinden eklendi. Her bir kuyucuğunda 3 mL besiyeri bununan 6 kuyucuklu plakalarda yapılan çalışmalarda ise 3 µL besiyeri uzaklaştırıldı, yerine 5µL ilk stok çözeltiden ilave edildi. Böylelikle her iki durumda da 10 µM perifosin uygulanmış oldu.

RhoB up-regülatör deksametazon-siklodekstrin kompleksi (Dexamethasone-water soluble, suitable for cell culture) (Sigma, ABD) için: 200 µM konsantrasyona sahip ilk stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlama aşamasında deksametazon-siklodekstrin kompleksinin 65 mg deksametazon/1000 mg kompleks oranında saf deksametazon içerdiği göz önüne alındı. 2 µM konsantrasyona sahip ikinci stok çözelti için, 10 µL 200 µM'lık deksametazon çözeltisinden pipetle alındı ve 990 µL besiyeri eppendorf tüpte karıştırıldı. 100 nM deksametazon uygulaması için 100 µL besiyeri bulunan kuyucuktan 5 µL besiyeri çekildi, yerine 2 µM konsantrasyona sahip ikinci stok çözeltiden 5 µL ilave edildi. Her bir kuyucuğunda 3 mL besiyeri bulunan 6 kuyucuklu plakalarda yapılan çalışmalarda ise, 1.5 µL besiyeri uzaklaştırıldı, yerine 1.5 µL ilk stok çözeltiden ilave edildi. Böylelikle her iki durumda da 100 nM deksametazon uygulanmış oldu.

3.1.1.5. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihazlar	**Model-Firma**
İnkübatör, etüv	Autoflow water jacketed CO2 Incubator, NuAire
Laminar Akımlı Kabin	Class II BSC, Sentinel Gold, ESCO
Sıvı Azot Tankı	Taylor Wharton, LS750
Su Banyosu	Memmert, SV1422
Işık Mikroskobu	Leica, DMIL LED
Santrifüj Cihazı	Hettich, Universal 320R
+4ºC Buzdolabı	Vestel S1108W
-20ºC Buzdolabı	SIEMENS
-80ºC Dondurucu	NuAire, Glacier -86oC Ultraflow freezer
Nanodrop okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek
Otomatik Pipet Seti(10-1000µl)	Research Pro, Eppendorf
Akım Sitometri Cihazı	Beckman Coulter CytoFLEX
Elektronik Pipet	Easypet, Eppendorf
Hücre Sayım Cihazı	Cedex XS, Roche Diagnostics,
Elisa Sistemi Epoch+Take3+Pc	Roche®, İsviçre
Hassas terazi	Shimadzu®, Japonya
Kültür kabı (75 cm2)	Gibco®, İngiltere
Kültür kabı (25 cm^2)	Gibco®, İngiltere
6 kuyucuklu plaka	NEST®
16 kuyucuklu e-plaka	ACEA Biosciences
Steril cam pipetler (5,10 mL)	Gibco®, İngiltere
Hücre Proliferasyon Takip Cihazı	ACEA Biosciences, xCELLigence RTCA

3.2. Metot

3.2.1. Deney Protokolü ve Detayları

A549 hücrelerinde RhoB molekülünün siRNA aracılığı ile susturulduğu veya deksametazon ile up-regülasyonunun sağlandığı durumlarda Akt inhibisyonunun anti-

tümör etkinliğinin incelenmesi amacıyla çalışmalar yapıldı. Akt inhibitörü olarak perifosin kullanıldı.

3.2.2. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) ile Proliferasyon Ölçümü

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi; hücre indeksini belirli zaman periyotlarında, elektriksel akım esasına göre hesaplayan ve gerçek zamanlı olarak analiz edebilen sistemdir. Temelde hücre membranı çift lipit tabakası ve bu tabaka içerisinde bulunan protein moleküllerinden meydana gelmektedir. Lipitlerin hidrofilik kısımları akuatik çevreye bakarken, hidrofobik kısımları hücre membranın iç kısmına bakar. Bu durum hücrenin membranının yalıtkan, hücrenin iç kısmının ise iletken olmasını sağlar. Hücreler büyüme sırasında ortamdaki yüksüz veya zayıf yüklü maddeleri, yüklü maddelere dönüştürür böylece iletkenliği artmış olur. Artan bu iletkenlik, cihaz elektrodlarıyla ölçülür ve empedans hesaplanır[114].

Ana çalışmamızda kullanılacak olan optimum deksametazon dozunun belirlenmesi için gruplar oluşturuldu (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Ön Çalışma Grupları

Ön Çalışma Grupları
1. A549 kontrol grubu
2. 1 nM deksametazon grubu
3. 10 nM deksametazon grubu
4. 100 nM deksametazon grubu

16 kuyucuklu e-plakalarda yapılan çalışmada öncelikle her bir kuyucuğa 50 µL besiyeri konuldu. E-plaka ile cihazın aynı sıcaklığa gelmesi ve arka plan mikroelektrot kontrollerinin yapılması amacıyla e-plaka, yaklaşık 10 dakika cihaz içerisinde bekletildi. Ardından çıkarılarak her bir kuyucuğa 50 µL medyum aracılığıyla 5000

hücre ekimi yapıldı. Tekrar cihaza yerleştirilen e-plaka, hücrelerin çoğalması ve tutunması için 24 saat bekletildi. 24. saatte belirtilen dozlarda deksametazon kuyucuklara eklendi. Sistem 15 dk aralıklarla gerçek zamanlı empedans ölçümü alınacak şekilde ayarlandı ve deksametazon ilavesini takip eden 72. saatte deney sonlandırıldı. Tüm süreç boyunca proliferasyon takip cihazı %5 CO2, %90 nem ve 37 ^{o}C şartlarındaki inkübatörde çalıştırıldı. Her gruptaki sonuçlar iki tekrar ile analiz edildi. Elde edilen zamana bağlı hücre proliferasyon grafiği 24. saatte normalize edildi.

Ön çalışmamıza göre uygun deksametazon dozuna karar verildi. Asıl çalışma için kullanılan deney grupları Tablo 3.4'te gösterildi.

Tablo 3.4. Deney Grupları

Deney Grupları
A549 kontrol grubu
Mock (sahte) kontrol grubu
Deksametazon grubu
Perifosin grubu
siRNA-RhoB grubu
Perifosin + Deksametazon grubu
Perifosin + siRNA-RhoB grubu

Yukarıdaki gruplar için proliferasyon analiz adımları tekrarlandı. Bu sefer hücre ekimini takip eden 24. saatte deksametazon ve siRNA-RhoB eklenirken, perifosin, transfeksiyon sonrası bir miktar süre geçmesi açısından yaklaşık 30. saatte eklendi. Deksametazon ve siRNA-RhoB ilavesini takip eden 72. saatte deney sonlandırıldı. Her gruptaki sonuçlar iki tekrar ile analiz edildi. Elde edilen zamana bağlı hücre proliferasyon grafiği 24. saatte normalize edildi.

3.2.3. Moleküler Analizler

3.2.3.1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ELISA, lökositlerin B hücreleri tarafından üretilen antikorlar ve antijenler arasındaki kimyasal etkileşimi temsil eden antijen-antikor reaksiyonları kavramına dayanmaktadır. Dolayısıyla, bu reaksiyondan yararlanarak ELISA; proteinler, peptitler, nükleik asitler, hormonlar ve birçok ikincil metabolitler dahil antijenlerin oldukça hassas ve seçici nicel/kalitatif analizine olanak sağlar.[115]

ELISA analizlerinde de proliferasyon testlerinde belirlenmiş deney gruplarında çalışıldı. RhoB, pAkt ve Bcl2l11 molekülleri için 96 kuyucuklu plakalar içeren ELISA Kitleri (BT LAB, Çin) kullanıldı. Yapılan çalışmalar üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. 6 kuyucuklu plakalarda A549 hücre ekimleri yapıldı. 24. saatte belirlenen kuyucuklara 100 nM deksametazon ve 100 nM siRNA-RhoB uygulandı. Bu işlemden 6 saat sonra ilgili kuyucuklara perifosin ilavesi yapıldı.

3.2.3.1.1. Hücrelerden Protein İzolasyonu

Hücre ekimini takip eden 96. saatte hücreler protokole uygun olarak kuyucuklardan kaldırıldı. ELISA protokolünde belirtildiği üzere hücreler santrifüjle toplandıktan sonra PBS'te resüspende edildi. Erime-donma döngüsüne (freeze-thaw cycle) alındı ve parçalanması sağlandı. Tekrar protokolünde belirtilen sınırlamalara uyularak santrifüje alındı ve süpernatant kısmı çalışmalarda kullanılmak üzere ayrıldı.

3.2.3.1.2. Protein Analizi

Her bir örnek dörder kuyucukta çalışıldı. Standart konsantrasyonların hazırlanma prosedürü üretici firmanın protokolünde belirtildiği üzere gerçekleştirildi. Her bir kitin kendine ait standart konsantrasyon aralıklarını oluşturmak için daha önce hazırlanan eppendorf tüplerde sırasıyla, pipetle çekilen 120µl (3200ng/L) standart stok solüsyonu, 120µl standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapmadan önce standardın hafif

çalkalama ile homojen karışması için 15 dakika beklendi. 800ng/L, 400ng/L, 200ng/L ve 100ng/L solüsyonları elde etmek için standart stok solüsyonu (1600ng/L) 1:2 standart seyreltici oranında seri olarak seyreltilerek belirtilen standartlar hazırlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. ELISA Standart Solüsyonun Seyreltme Oranları

Konsantrasyon	Standart No	Dilüsyon Tarifi
1600ng/L	Standard 5	120ul orjinal standard + 120µl standard seyreltici
800ng/L	Standard 4	120ul standard 5 + 120µl standard seyreltici
400ng/L	Standard 3	120ul standard 4 + 120µl standard seyreltici
200ng/L	Standard 2	120ul standard 3 + 120µl standard seyreltici
100ng/L	Standard 1	120ul standard 2 + 120µl standard seyreltici

500 ml yıkama tamponu (1x) elde etmek için 20 ml yıkama tamponu konsantresi (25x) deiyonize su ile seyreltildi. Protokole uygun olarak deney adımlarına geçildi.

1. Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler talimatlara göre hazırlandı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi.

2. Standart olarak belirlenen kuyucuklara 50µl standart eklendi.

3. Numune kuyucuklarına 40µl numune eklendi ve ardından numune kuyucuklarına 10µl ilgili antikor eklendi (Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyucuğa antikor eklemesi yapılmadı). Ardından kör kontrol kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 50µl streptavidin-HRP eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra plaka üzeri kapatıldı. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

4. Plaka üzerindeki kapatıcı çıkarıldı ve plaka yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Kuyular her yıkama için 30 saniye ile 1 dakika arasında 300µl yıkama tamponu ile muamele edildi. İşlemler sonunda plakanın kâğıt havlu üzerinde kuruması beklendi.

5. Her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu A ve ardından her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu B eklendi. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca bekletildikten sonra yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plaka inkübe edildi.

6. Her kuyucuğa 50µl durdurma (Stop) solüsyonu eklendi.

7. Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 450 nm'ye ayarlanmış olan spektrofotometre kullanarak 10 dakika içinde gerekli ölçüm yapıldı.

3.2.4. Biyokimyasal Analizler

3.2.4.1. Akım Sitometrisi ile Apoptoz Testi

Akım sitometri cihazı (Beckman Coulter CytoFLEX) ile Annexin V-FITC kiti (Elabscience, ABD) kullanılarak apoptoz seviyeleri analiz edildi. A549 hücreleri 6'lı plakaya 300 bin hücre/3 ml medyum olacak şekilde ekildi. Plakalar 24 saat inkübatörde hücrelerin tutunması için bekletildi. Daha önce hesaplaması yapılan konsantrasyona karşılık gelen hacimlerde 100 nM siRNA-RhoB ve Lipofectamine RNAiMAX transfeksiyon ajanı karışımı ilgili kuyucuklara eklendi. Ardından siRNA-RhoB ilavesini takip eden 6. saatte perifosin 10 µM final konsantrasyona denk gelecek hacimde stok çözeltiden pipetle plakaya ilave edildi. Transfeksiyon ajanının apoptoza etkisini ölçmek için de sadece transfeksiyon ajanı içeren çözelti ile mock kontrol grubu oluşturuldu. SiRNA-RhoB ilavesini takip eden 72. saatte hücreler analiz için kaldırıldı. Üretici firmanın sunduğu protokollerden tek-adımlı analiz protokolü tercih edildi. Buna göre;

1. 5 dk boyunca 300g'de hücreler santrifüj edildi ve PBS ile yıkanarak nazikçe resüspende edildi.
2. Her deney grubunda en az 10000 hücre olacak şekilde tüplere ayrıldı.

3. Tekrar yıkama işlemi ve santrifüjün ardından 500 µL Annexin V 1x Binding Buffer ile resüspende edildi.

4. Her tüpe 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl Propidium İyodür (PI) Boyama Solüsyonu eklendi.

5. Hücreler nazikçe vortekslendi ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 15-20 dakika inkübe edildi.

6. Cihaz protokolüne uygun olarak cihaza yüklenen hücrelerden apoptoz grafiği elde edildi.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

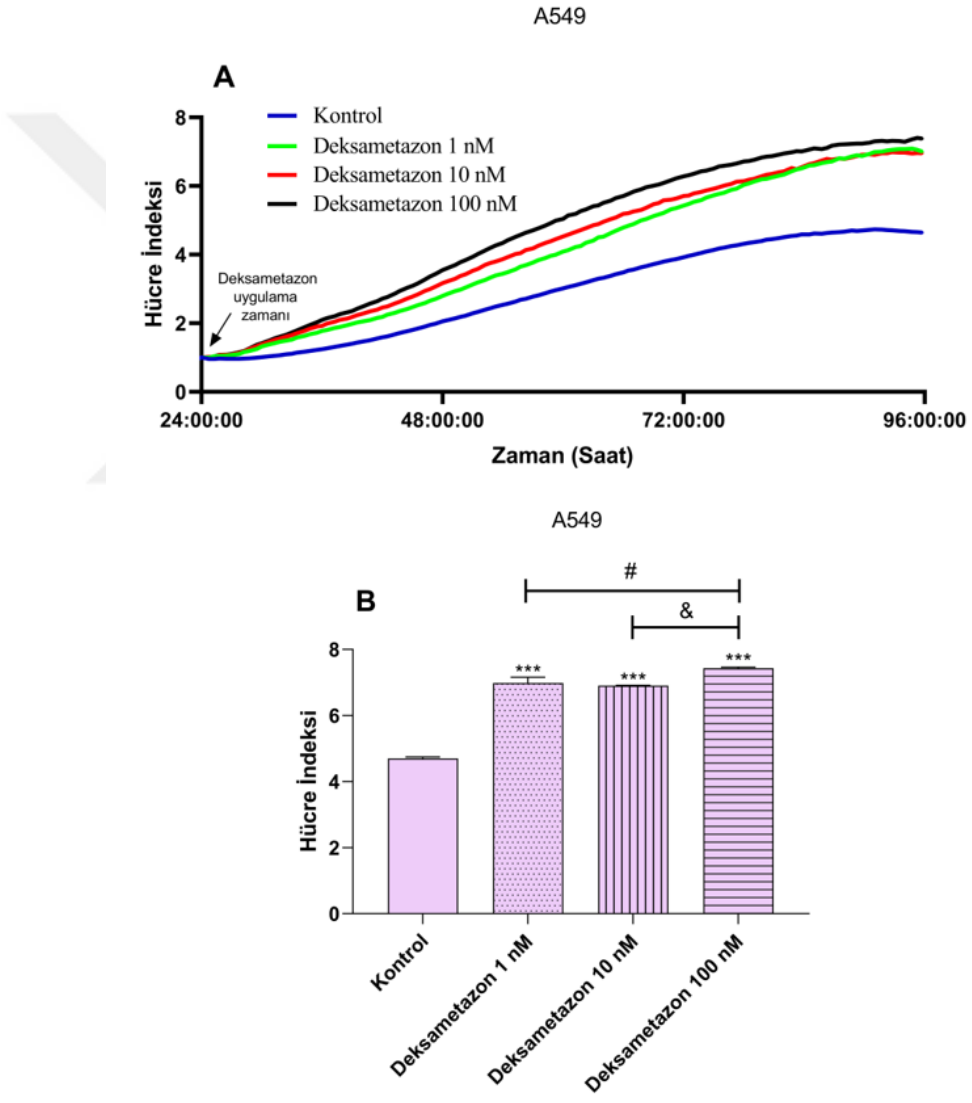
Çalışmamızın veri analizleri ve grafik çiziminde GraphPad Prism 9.4.1 (Dotmatics, ABD) yazılımı kullanıldı ve veriler ortalama ± SD olarak gösterildi. Gruplar arası karşılaştırmalar, tek yönlü ANOVA ve post-hoc test olarak Tukey tercih edildi ve analizler gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) Bulguları

4.1.1. Deksametazon Doz Belirleme Çalışması

Çalışmalarımız boyunca kullanılacak olan RhoB up-regülatör deksametazon optimum dozunun belirlenmesi için Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Yöntemi (RTCA) kullanılarak bir ön çalışma gerçekleştirildi (Şekil 4.1).



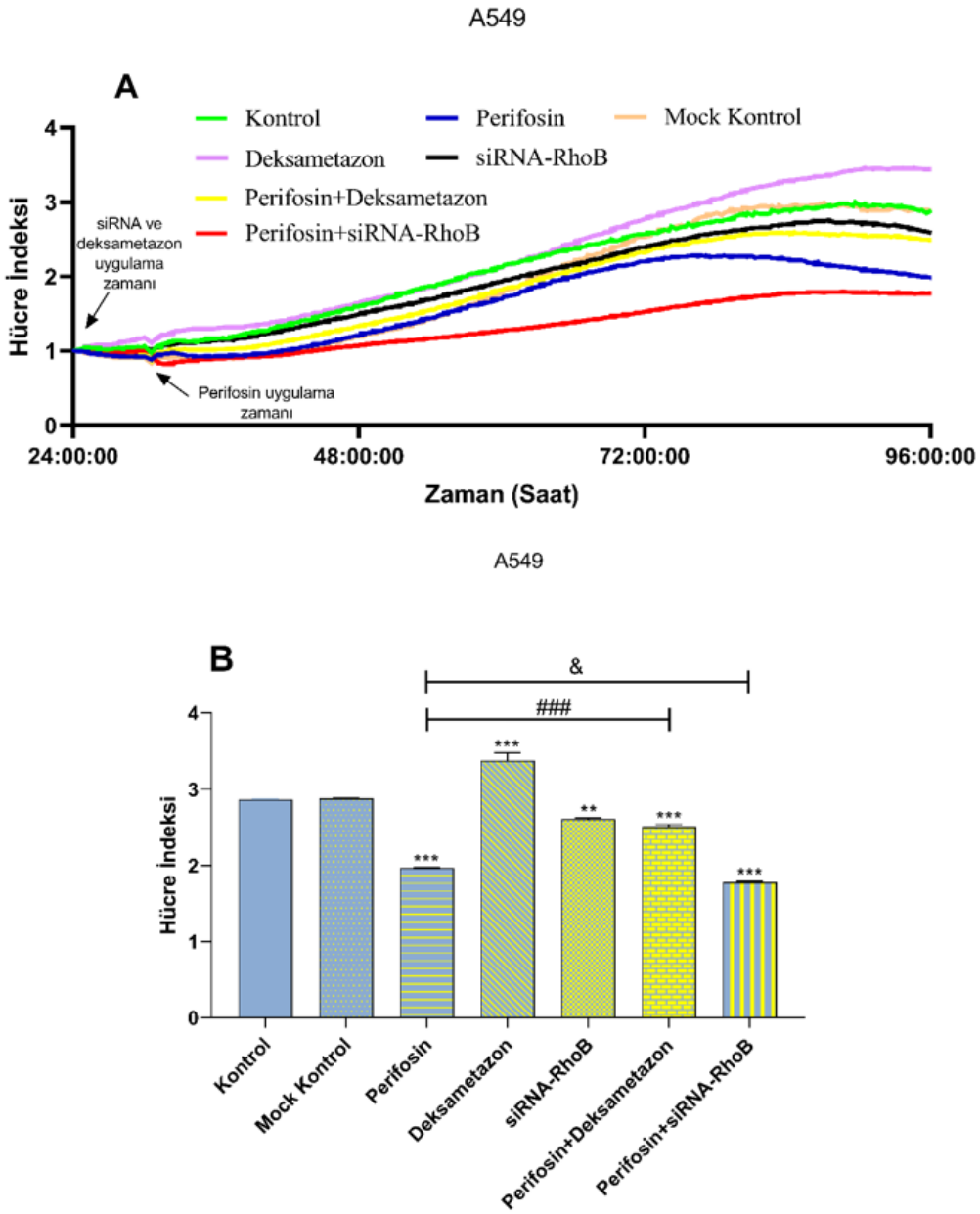
*: Kontrol grubuna göre, ***p <0.001 #: Deksametazon 100 nM ile deksametazon 1nM arasında, # <0.05; &: Deksametazon 100 nM ile deksametazon 10 nM arasında, & <0.05 kabul edildi.

Şekil 4.1. Deksametazonun 1 nM, 10nM, 100 nM konsantrasyonlarındaki gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA) grafiği (A) ve 72 saat sonundaki hücre indeksleri (B).

100 nM deksametazon uygulamasının, 72 saat sonunda hücre proliferasyonunu A549 hücrelerinde kontrol grubu ve diğer deksametazon gruplarına göre anlamlı bir şekilde artırdığı gözlendi. 1 nM ve 10 nM deksametazon uygulamaları, proliferasyon üzerinde birbirlerine göre anlamlı bir fark oluşturmamasına rağmen A549 kontrol hücrelerine kıyasla proliferasyonda artış gösterdi.

4.1.2. Hücre Proliferasyon Bulguları

Akt inhibitörü perifosinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) yöntemi ile proliferasyon üzerindeki etkisinin, hücre içindeki RhoB ekspresyon miktarıyla olan ilişkisinin incelenmesi için perifosin tek başına, RhoB up-regülatör deksametazon ile kombine halde ve siRNA-RhoB ile kombine halde denendi (Şekil 4.2). Tüm çalışmalarda perifosinin 72 saatlik IC50 değeri olarak belirlenen 10 μM doz kullanıldı. Sadece perifosin kullanılan grup ile perifosin ve siRNA-RhoB kombinasyonunun kullanıldığı grubun A549 hücrelerinde proliferasyonu kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azalttığı gözlendi. Ayrıca, perifosin ve siRNA-RhoB kombinasyonunun sadece perifosin grubuna göre de anlamlı bir şekilde proliferasyonu azalttığı belirlendi. RhoB'nin hücre içerisinde baskılanmasıyla akt inhibitörü perifosinin anti-proliferatif etkinliğinin arttığı gözlendi. Diğer taraftan, beklenildiği gibi RhoB-up-regülatör deksametazonun doz belirleme çalışmasına paralel olarak hücre proliferasyonunu diğer gruplara göre artırdığı belirlendi. Dahası, hücre içindeki RhoB'yi up-regüle ettiği bilinen deksametazonun, perifosinin anti-proliferatif etkisini azalttığı gözlendi.



*: Kontrol grubuna göre, **p <0.01; ***p <0.001 #: Perifosin ile perifosin+deksametazon arasında, ### <0.001; &: Perifosin ile perifosin+siRNA-RhoB arasında, & <0.05 kabul edildi.

Şekil 4.2. xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizi yöntemiyle elde edilen proliferasyon grafiği (A) ve 72 saat sonundaki hücre indeksleri (B).

4.2. Moleküler Bulgular

4.2.1. ELISA Bulguları

pAkt

ELISA yöntemiyle A549 hücrelerinde pAkt (fosforillenmiş Akt) düzeyi belirlendi. Bir Akt inhibitörü olan perifosin, beklendiği gibi, kontrole kıyasla 72 saat sonra pAkt ekspresyon seviyesini önemli ölçüde azalttı. Perifosin ve siRNA-RhoB

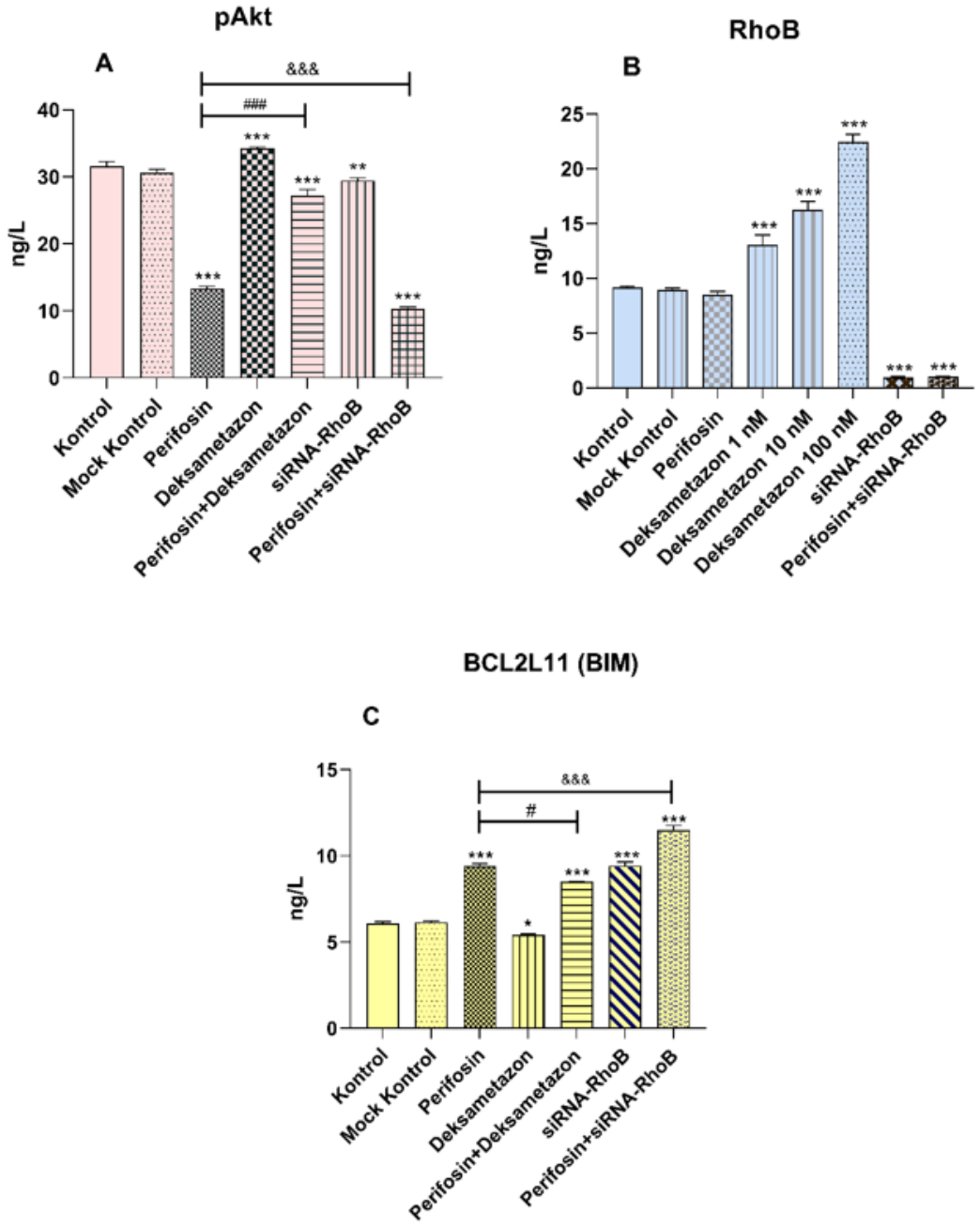
kombinasyonu ise tek başına perifosine kıyasla pAkt seviyesini anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi. Ayrıca, deksametazon ilavesinin, kontrol grubuna kıyasla pAkt seviyesini önemli ölçüde artırdığı gözlendi. Perifosinin deksametazon ile kombinasyonunun pAkt seviyesinde meydana getirdiği azalma miktarının, perifosinin tek başına pAkt seviyesinde meydana getirdiği azalma miktarına göre anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.3 A).

RhoB

A549 hücrelerinde RhoB'nin protein düzeyinde seviyesi tespit edildi. RhoB up-regülatör deksametazonun, kontrol ve mock kontrol gruplarına kıyasla doza bağımlı olarak RhoB seviyesini önemli ölçüde artırdığı gözlendi. Ek olarak, siRNA-RhoB ilavesinin, kontrol ve mock kontrol gruplarına kıyasla RhoB'nin seviyesini önemli ölçüde azalttığı gözlendi. Perifosin ise hücre içi RhoB seviyesinde kontrol ve mock kontrol gruplarına göre anlamlı bir değişiklik meydana getirmedi (Şekil 4.3 B).

Bcl2l11 (BIM)

Bcl2l11 (BIM) seviyesi ELISA yöntemi ile tespit edildi. Elde edilen verilere göre 72 saat sonunda perifosin ve siRNA-RhoB kombinasyonu, tek başına perifosine göre apoptotik protein olan Bcl2l11 düzeyini önemli ölçüde artırırken, deksametazonun önemli ölçüde azalttığı belirlendi. Ayrıca perifosin ve siRNA-RhoB kombinasyonunun, kontrol grubuna, tek başına perifosin ve tek başına siRNA-RhoB uygulanan tedavi gruplarına kıyasla Bcl2l11 seviyesini önemli ölçüde artırdığı gözlendi (Şekil 4.3 C).



*: Kontrol grubuna göre, *p<0.05; **p <0.01; ***p <0.001 #: Perifosin ile perifosin+deksametazon arasında, #p<0.05; ### <0.001; &: Perifosin ile perifosin+siRNA-RhoB arasında, &&& <0.001 kabul edildi.)

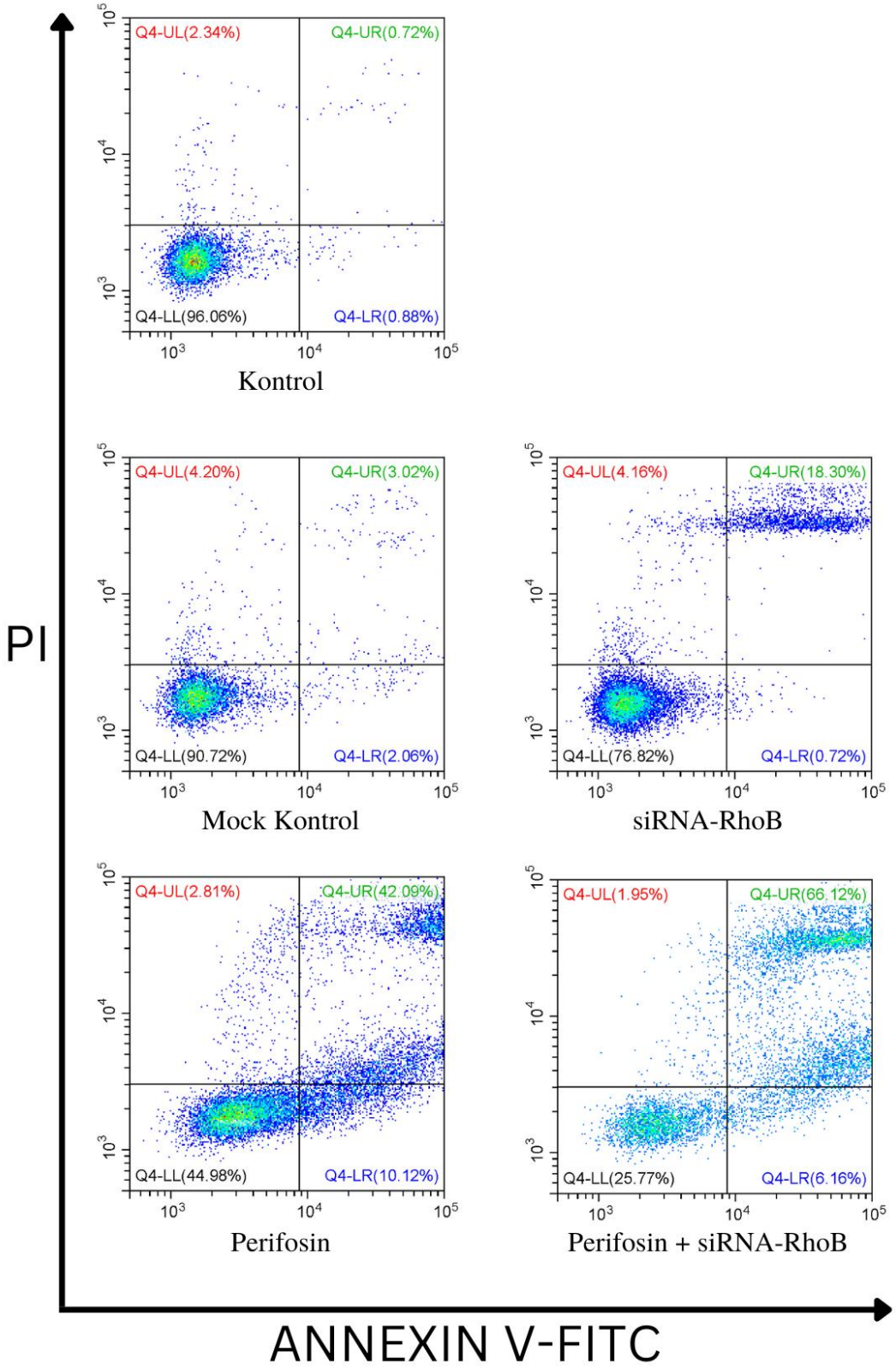
Şekil 4.3. ELISA'da ölçülen pAkt (A), RhoB (B), Bcl2l11 (C) seviyelerindeki değişim. (Transfeksiyonu takip eden 72 Saatlik deney sürecinde ilgili deney gruplarına 10 μM perifosin, 100 nM deksametazon ve 100 nM siRNA-RhoB uygulandı.)

4.3. Biyokimyasal Bulgular

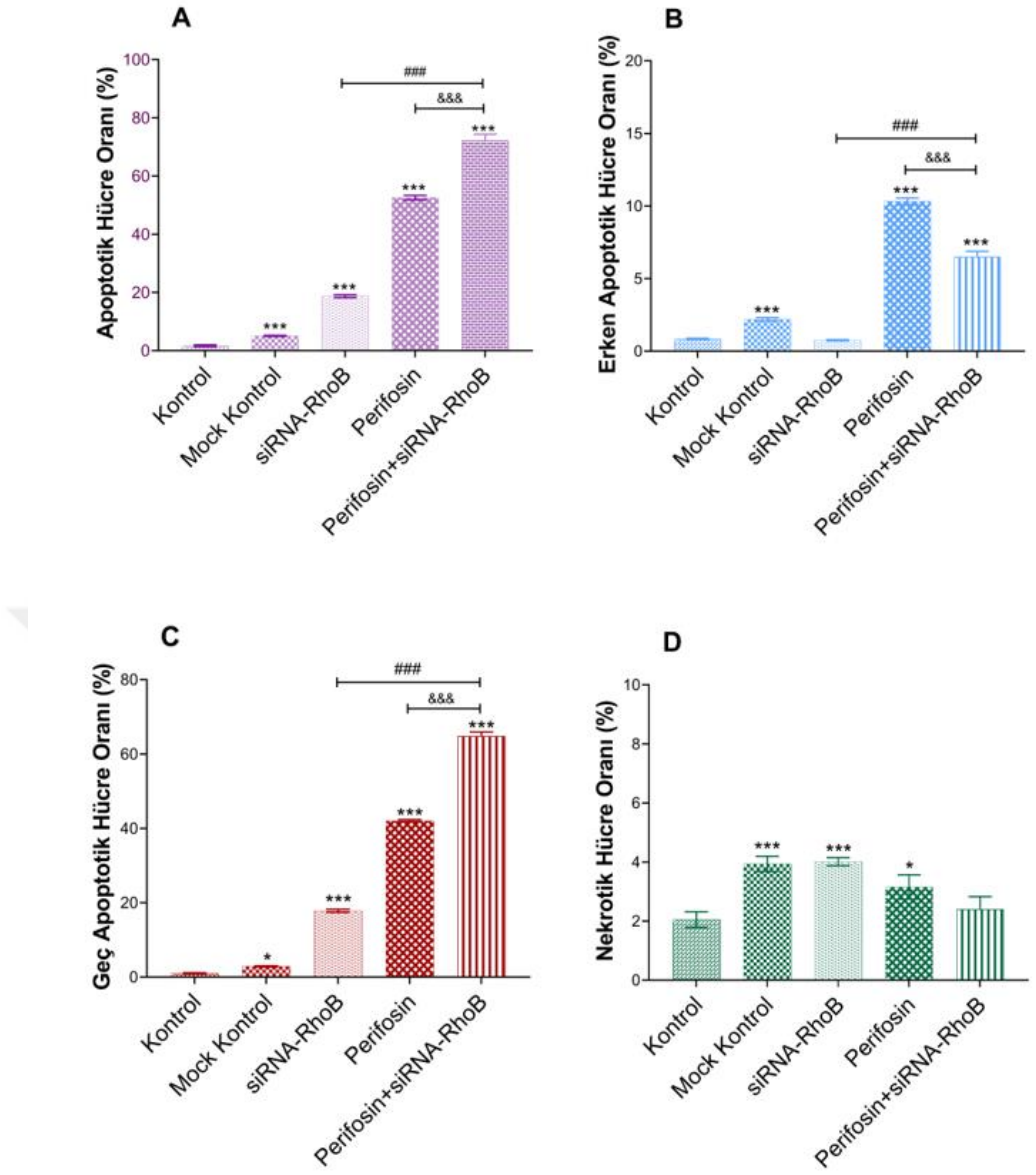
4.3.1. Akım Sitometri ile Apoptoz Analiz Bulguları

Akım sitometrisinde A549 hücrelerinde sadece perifosin, sadece siRNA-RhoB'nin yanı sıra perifosin ve siRNA-RhoB kombinasyonunun apoptotik yüzdeleri tespit edildi. Elimizdeki verilere göre perifosin ve siRNA-RhoB kombinasyonunun oluşturduğu apoptotik etki, bu iki molekülün tek başına meydana getirdiği apoptotik etkiye göre ve kontrol gruplarının her ikisine göre anlamlı bir şekilde artış gösterdiği belirlendi. Bu moleküllerin akım sitometrisi panellerindeki apoptoz seviyeleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Grafikte X ekseni Annexin V'in, Y ekseni ise PI'nın yaydığı floresanı göstermektedir. Grafiklerdeki -LL bölgeleri canlı hücreleri, -UL bölgeleri nekrotik hücreleri, -UR bölgeleri geç apoptoza uğramış hücre oranını ve -LR bölgeleri de erken apoptoza uğramış hücre oranını göstermektedir. Bu grafiklerden elde edilen verilere göre deney sonunda A549 hücrelerine ait kontrol grubunun %96.06 canlı kaldığı, mock kontrol grubunun ise %90.72 canlılığa sahip olup %4.2 oranında nekroza uğradığı görülmektedir. Akt inhibitörü perifosin uygulanan hücrelerde ise %42.09 geç apoptoz, %10.12 erken apoptoz gözlenmiştir. Perifosin tedavisinin, siRNA aracılığıyla RhoB baskılanmış hücrelerde apoptoz seviyeleri ölçüldüğünde ise tüm gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde apoptoz oranlarının arttığı gözlendi. Bu gruptaki hücrelerde canlılık sadece %25.77 ölçülürken, hücrelerin %66.12'sinin geç apoptoza, %6.16'sının ise erken apoptoza uğradığı belirlenmiştir (Şekil 4.5). Tüm gruplar incelendiğinde en az nekrotik hücre yüzdesine sahip olan grubun siRNA-RhoB ile baskılanmış hücrelere perifosin uygulanan grup olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. 72 saat sonunda ölçülen Annexin V/PI apoptoz seviyeleri.



*: Kontrol grubuna göre, *p<0.05; ***p <0.001, #: siRNA-RhoB ile perifosin+siRNA-RhoB arasında, ### <0.001, &: Perifosin ile perifosin+siRNA-RhoB arasında, &&& <0.001 kabul edildi.

Şekil 4.5. 72 saat sonunda ölçülen apoptoz oranları ve değişen hücre canlılığı

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri moleküler olarak heterojen bir hastalıktır ve biyolojisini anlamak, etkili tedavilerin geliştirilmesi için büyük önem arz etmektedir.[5] Daha etkili sonuçlar elde etmek için planlanan hedefe yönelik tedavilerden fayda gören popülasyonu genişletmek amacıyla yeni gen değişikliklerinin tanımlanmasının yanı sıra hedefe yönelik tedaviye direnç mekanizmalarının ve regülatörlerinin de iyi anlaşılması gerekmektedir.[6] Gerek hedefe yönelik kanser tedavileri gerekse direnç mekanizmalarının ve regülatörlerinin öneminden bahsetmişken en iyi hedef yolaklardan biri olan PI3K/Akt yolunu incelemek gerekmektedir. Bu yolak akciğer kanseri dahil birçok kanser türünde anormal şekilde aktive edilir ve bu yolun ilaç inhibitörleriyle hedeflenmesi hem solid hem de hematolojik tümörler için daha etkili antikanser tedavi yolu olabilmektedir.[11, 12] Bu karmaşık yol, antikanser ajanlarının geliştirilmesi için en çekici hedeflerden biri olmasına rağmen, onkolojik kullanım için henüz hiçbir Akt inhibitörü onaylanmamıştır.[19, 22] Bunun birçok nedeni bulunmaktadır. Literatürü incelediğimizde deneysel olarak Akt inhibitörlerinin kullanılmasının bazı çalışmalarda çok önemli etkinlikler göstermesine rağmen bazı çalışmalarda etkinlik göstermemesi en önemli nedenlerden biridir.[21, 116] Bu konu gerçekten açıklamaya değer bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser gelişiminde önemli olan bir yolağın inhibe edilmesinin farklı sonuçlar doğurmasının incelenmesi, ileride yapılacak birçok kanser çalışmasına da yol gösterecektir. PI3K/Akt yolağının inhibisyonu sonucunda farklı etki gözlenmesi, bu yolağın kanser hücrelerinde regülatör bir mekanizmayla kontrol ediliyor olması ihtimalini akıllara getirmektedir. PI3K/Akt yolağının regülatör mekanizmalarının derinlemesine anlaşılması ve temel regülatörlerin hedeflenmesiyle daha etkili tedavi fırsatları elde edilebilir.[23] Biz de bu çalışmamızda, akciğer kanserinde Akt inhibisyonunun anti-tümör etkinliği üzerinde Rho-GTPaz sınıfı RhoB molekülünün

regülatör rol oynayıp oynamadığını; farklı kanser tiplerinde onkojen mi yoksa tümör baskılayıcı mı olduğu tartışmalarından ve endotel hücrelerinde Akt fosforilasyonunu düzenlediğinin gösterilmesinden yola çıkarak inceledik.[24, 34]

Çalışmamızda ilk olarak siRNA aracılığıyla RhoB'nin susturulması sonucu Akt inhibisyonunun anti-proliferatif etkinliğinde artış tespit ettik. RhoB, deksametazon aracılığıyla up-regüle edildiğinde ise Akt inhibisyonunun anti-proliferatif etkinliğinde önemli ölçüde azalma tespit ettik. Bu sonuçlar hücre içi RhoB miktarı ile Akt inhibisyonunun anti-tümör etkinliği arasındaki ilişkiyi gözler önüne sermiş, savımızda belirttiğimiz gibi RhoB'nin regülatif rolünün varlığını ortaya koymuştur. Ayrıca sonuçlarımıza göre, A549 hücre hattında siRNA aracılığıyla RhoB'nin susturulması sonucu ek bir tedaviye ihtiyaç duymadan da anti-proliferatif etki gözlenmiştir. Bunun aksine A549 hücre hattında deksametazon aracılığıyla up-regüle edilen RhoB'nin, hücrelerin proliferasyon yeteneklerini artırdığını gözlemledik. Daha önce yapılan bir çalışmada akciğer kanserinde RhoB ekspresyon kaybı bildirilmiş, RhoB'nin potansiyel bir tümör süpresör olabileceğinden bahsedilmişti.[117] Bu çalışma temelde bizim çalışmamızın sonuçlarına zıt bulgular göstermiş olmasına rağmen bir molekülün kanser hücresinde az eksprese edilmesi, o molekülün bir tümör süpresör olarak görev aldığı anlamına gelmemektedir. Elde ettiğimiz veriler ışığında küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde RhoB molekülünün tümör süpresör olarak görev yapmadığını söyleyebiliriz.

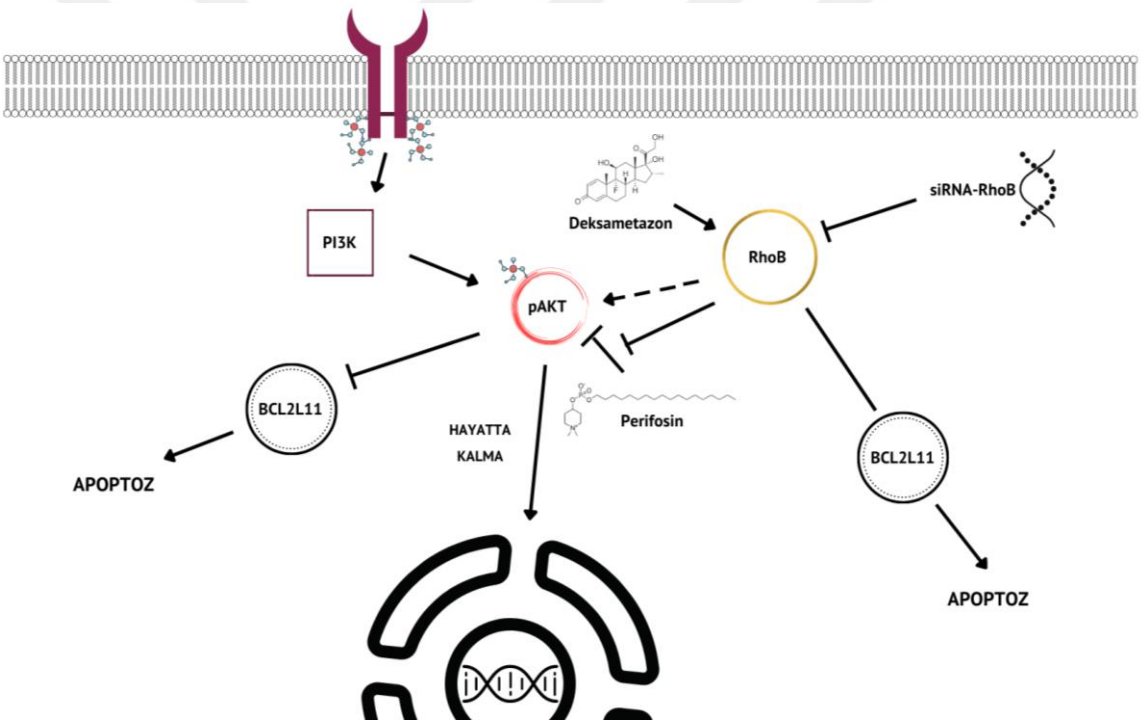
Çalışmamızda, Akt inhibisyonunun belirteci olarak gösterilen hücre içi pAkt miktarına ilişkin olarak,[79] yukarıda belirttiğimiz proliferasyon sonuçlarını destekleyecek sonuçlar elde edilmiştir. RhoB susturulmuş A549 hücrelerinde sağlanan Akt inhibisyonu sonucu ölçülen pAkt miktarının, normal A549 hücrelerinde sağlanan Akt inhibisyonu sonucu ölçülen pAkt miktarından daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hücre içi RhoB'nin up-regüle edildiği durumda, Akt inhibisyonu sonucu ölçülen pAkt

miktarının, normal A549 hücrelerinde sağlanan Akt inhibisyonu sonucu ölçülen pAkt miktarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerindeki RhoB'nin varlığının Akt inhibitörünün etkisini azalttığını göstermekte ve RhoB'nin Akt inhibisyonu üzerindeki regülatif rolünü kanıtlar niteliktedir.

Apoptoz, hücre içinden ve hücre dışından birçok stimülan tarafından harekete geçebilen kontrollü bir ölüm mekanizmasıdır. Apoptozdan kaçış ise kanser hücreleri için ayırt edici bir özelliktir.[118] Biz bu çalışmamızda Akt ihibisyonu sağlandıktan sonra ölçülen apoptotik etki oranının A549 kontrol hücrelerine ve mock kontrol grubundaki hücrelere göre artmasının, proliferasyon testindeki sonuçlarımızı destekler nitelikte olduğunu belirledik. RhoB susturulduktan sonra uygulanan Akt inhibitörünün hücrelerde oluşturduğu apoptotik etki oranında, tek başına Akt inhibitörünün oluşturduğu etki oranına göre artış tespit edildi. Bu sonuç Akt inhibitörünün apoptotik moleküler mekanizmaları harekete geçirmesinde RhoB'nin sınırlayıcı etkisini ortaya koymaktadır. Biyokimyasal analiz sonucu elde ettiğimiz bulgular, Akt inhibisyonunda RhoB'nin susturulmasıyla artan anti-proliferatif etkinin nekroz kaynaklı olmadığı, apoptotik sürecin sonucu olduğunu da ispatlamıştır. Sağlanan Akt inhibisyonunun, RhoB'nin susturulduğu akciğer kanseri hücrelerinde, RhoB'nin susturulmadığı hücrelere göre proliferasyonu daha fazla baskılayıcı ve apoptoz parametreleri üzerinde daha olumlu etkileri bulunduğunu göstermiş olduk. Tüm bu apoptotik veriler, RhoB molekülünün, Akt inhibisyonunun anti-tümör ve apoptotik etkileri üzerinde negatif bir regülasyon sağladığını göstermiştir.

Apoptoz sürecine dahil olan birçok pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında etkin oldukları gösterilmiştir.[119] Elde edilen apoptotik bulgular, apoptotik bir protein olduğu gösterilen[120] Bcl2l11'e ait moleküler

analiz sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Bunun yanında perifosinin etkisinin Akt inhibisyonu olduğu[121] bilinmekle birlikte, perifosinin küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu üzerindeki Akt fosforilasyonunu azaltmasının, Bcl2l11 seviyesini artırarak anti-tümör etkisine katkısı olabileceğini belirledik. Ayrıca hücre içinde deksametazon aracılığıyla up-regüle edilen RhoB'nin, Bcl2l11 seviyesinde bir miktar azalmaya yol açtığı ve RhoB up-regülasyonu sağlanmış akciğer kanseri hücrelerinde gözlenen proliferasyon artışında bu mekanizmanın da etkili olabileceğini göstermiş olduk. Çalışmamız sonucunda elde edilen verileri literatürdeki bilgiler ile birleştirerek RhoB-Akt inhibisyonu ilişkisinin mekanizmasını Şekil 5.1'de özetledik.



Şekil 5.1. RhoB'nin Akt inhibisyonu üzerindeki regülatif rolünün sinyal mekanizmaları üzerinden şematik gösterimi

Deksametazonun; A549 hücrelerinde RhoB seviyesini protein düzeyinde artırdığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olmasına rağmen,[39] çalışmamızda Bcl2l11 seviyesinde de minimal düzeyde bir azalmaya yol açtığından bahsetmiştik. Fakat, lenfoid malignitelerde apoptozu indüklediği gösterilen deksametazonun bu

etkisi,[122] akciğer kanseri üzerindeki çalışmamızda ortaya koyduğu anti-apoptotik etkileriyle uyuşmamaktadır. A549 hücre hattında yapılan, deksametazonun daha yüksek dozlarda ve daha kısa süreli olarak kullanıldığı bir çalışmada A549 hücrelerinde anti-proliferatif bir etkisi olduğu gösterilmişti.[123] Biz ise deksametazonun daha düşük fakat hücre içinde RhoB'nin protein miktarını istenilen düzeyde up-regüle edebilecek seviyedeki dozlarında proliferasyonu artırdığını göstermiş olduk.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak mevcut çalışma ile hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi dahil birçok görevi bulunan RhoB molekülünün Akt sinyal yolağına ve Akt inhibisyonunun anti-tümör etkinliğine olan regülatif etkilerini göstermiş olduk. Çalışmamız sonucunda RhoB molekülünün küçük hücreli olmayan akciğer kanseri özelinde hedefe yönelik tedavilerden biri olan Akt inhibisyonunun etkinliğini negatif yönde düzenleyen, tedavi başarısını kısıtlayan bir regülatör molekül olduğunu belirledik. RhoB'nin susturulması sağlandıktan sonra tedavide verilen Akt inhibitörünün anti-tümör etkinliğinin artmasıyla, Akt inhibitörlerinin klinik kullanıma geçişinin hızlanacağını düşünüyoruz. Hücre içerisinde, çalışmamızda up-regüle edildiğinden daha fazla RhoB up-regülasyonunun, Akt inhibisyonu ve diğer sinyal yolakları üzerine olan etkisinin incelenmesiyle, RhoB hedefli tedavilerin kapsamının genişleyeceğini öngörmekteyiz. RhoB'nin farklı sinyal mekanizmalarıyla akciğer kanseri ve diğer kanser türlerindeki rolünün derinlemesine incelenmesinin, gelecekte daha da değerli olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 893: 1-19.
2. Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba, II. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat Res*, 2016, 170: 25-46.
3. Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P, Borghaei H, Chow LQ, Downey RJ, Gandhi L, Ganti AK, Govindan R, Grecula JC, Hayman J, Heist RS, Horn L, Jahan T, Koczywas M, Loo BW, Jr., Merritt RE, Moran CA, Niell HB, O'Malley J, Patel JD, Ready N, Rudin CM, Williams CC, Jr., Gregory K, Hughes M. Small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 2013, 11: 78-98.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61: 69-90.
5. Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, Wedge DC, Song X, Zhang J, Seth S, Chow CW, Cao Y, Gumbs C, Gold KA, Kalhor N, Little L, Mahadeshwar H, Moran C, Protopopov A, Sun H, Tang J, Wu X, Ye Y, William WN, Lee JJ, Heymach JV, Hong WK, Swisher S, Wistuba, II, Futreal PA. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*, 2014, 346: 256-259.
6. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 2018, 553: 446-454.
7. Yu JL, Simmons C, Victor JC, Han D, Hogeveen S, Leighl N, Verma S. Impact of new chemotherapeutic and targeted agents on survival in stage IV non-small cell lung cancer. *Oncologist*, 2011, 16: 1307-1315.

8. Ke B, Wei T, Huang Y, Gong Y, Wu G, Liu J, Chen X, Shi L. Interleukin-7 Resensitizes Non-Small-Cell Lung Cancer to Cisplatin via Inhibition of ABCG2. *Mediators Inflamm*, 2019, 2019: 7241418.
9. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1856: 189-210.
10. Sosa Iglesias V, Giuranno L, Dubois LJ, Theys J, Vooijs M. Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer: A Potential for NOTCH Targeting? *Front Oncol*, 2018, 8: 267.
11. Camidge DR. Targeted therapy vs chemotherapy: which has had more impact on survival in lung cancer? Does targeted therapy make patients live longer? Hard to prove, but impossible to ignore. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2014, 12: 763-766.
12. Steelman LS, Stadelman KM, Chappell WH, Horn S, Bäsecke J, Cervello M, Nicoletti F, Libra M, Stivala F, Martelli AM, McCubrey JA. Akt as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12: 1139-1165.
13. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*, 1999, 13: 2905-2927.
14. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 2006, 441: 424-430.
15. Jiang J, Xu Y, Ren H, Wudu M, Wang Q, Song X, Su H, Jiang X, Jiang L, Qiu X. MKRN2 inhibits migration and invasion of non-small-cell lung cancer by negatively regulating the PI3K/Akt pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37: 189.
16. Zhang Y, Bao C, Mu Q, Chen J, Wang J, Mi Y, Sayari AJ, Chen Y, Guo M. Reversal of cisplatin resistance by inhibiting PI3K/Akt signal pathway in human lung cancer cells. *Neoplasma*, 2016, 63: 362-370.

17. Zhu Y, Rao Q, Zhang X, Zhou X. Galangin induced antitumor effects in human kidney tumor cells mediated via mitochondrial mediated apoptosis, inhibition of cell migration and invasion and targeting PI3K/ AKT/mTOR signalling pathway. *J buon*, 2018, 23: 795-799.
18. Gershtein ES, Scherbakov AM, Shatskaya VA, Kushlinsky NE, Krasil'nikov MA. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling pathway components in human breast cancer: clinicopathological correlations. *Anticancer Res*, 2007, 27: 1777-1782.
19. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4: 988-1004.
20. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*, 2014, 4: 64.
21. Rivera-Soto R, Yu Y, Dittmer DP, Damania B. Combined Inhibition of Akt and mTOR Is Effective Against Non-Hodgkin Lymphomas. *Front Oncol*, 2021, 11: 670275.
22. Nitulescu GM, Margina D, Juzenas P, Peng Q, Olaru OT, Saloustros E, Fenga C, Spandidos D, Libra M, Tsatsakis AM. Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol*, 2016, 48: 869-885.
23. Haddadi N, Lin Y, Travis G, Simpson AM, Nassif NT, McGowan EM. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. *Mol Cancer*, 2018, 17: 37.
24. Ju JA, Gilkes DM. RhoB: Team Oncogene or Team Tumor Suppressor? *Genes (Basel)*, 2018, 9.

25. Parri M, Chiarugi P. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal*, 2010, 8: 23.

26. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, 2008, 582: 2093-2101.

27. Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2001, 1: 162-168.

28. Zandvakili I, Lin Y, Morris JC, Zheng Y. Rho GTPases: Anti- or pro-neoplastic targets? *Oncogene*, 2017, 36: 3213-3222.

29. Horiuchi A, Imai T, Wang C, Ohira S, Feng Y, Nikaido T, Konishi I. Up-Regulation of Small GTPases, RhoA and RhoC, Is Associated with Tumor Progression in Ovarian Carcinoma. *Laboratory Investigation*, 2003, 83: 861-870.

30. Sun HW, Tong SL, He J, Wang Q, Zou L, Ma SJ, Tan HY, Luo JF, Wu HX. RhoA and RhoC -siRNA inhibit the proliferation and invasiveness activity of human gastric carcinoma by Rho/PI3K/Akt pathway. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 3517-3522.

31. van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao LW, Merajver SD. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res*, 2000, 60: 5832-5838.

32. Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J, Sebti SM. Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem*, 2000, 275: 17974-17978.

33. Vega FM, Ridley AJ. The RhoB small GTPase in physiology and disease. *Small GTPases*, 2018, 9: 384-393.

34. Adini I, Rabinovitz I, Sun JF, Prendergast GC, Benjamin LE. RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev*, 2003, 17: 2721-2732.

35. Liu A, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Prendergast GC. RhoB is required to mediate apoptosis in neoplastically transformed cells after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 6192-6197.

36. Liu A-x, Prendergast GC. Geranylgeranylated RhoB is sufficient to mediate tissue-specific suppression of Akt kinase activity by farnesyltransferase inhibitors. *FEBS Letters*, 2000, 481: 205-208.

37. Calvayrac O, Mazières J, Figarol S, Marty-Detraves C, Raymond-Letron I, Bousquet E, Farella M, Clermont-Taranchon E, Milia J, Rouquette I, Guibert N, Lusque A, Cadranel J, Mathiot N, Savina A, Pradines A, Favre G. The RAS-related GTPase RHOB confers resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer via an AKT-dependent mechanism. *EMBO Mol Med*, 2017, 9: 238-250.

38. Bhavsar PJ, Infante E, Khwaja A, Ridley AJ. Analysis of Rho GTPase expression in T-ALL identifies RhoU as a target for Notch involved in T-ALL cell migration. *Oncogene*, 2013, 32: 198-208.

39. Huang GX, Pan XY, Jin YD, Wang Y, Song XL, Wang CH, Li YD, Lu J. The mechanisms and significance of up-regulation of RhoB expression by hypoxia and glucocorticoid in rat lung and A549 cells. *J Cell Mol Med*, 2016, 20: 1276-1286.

40. Cancer Research UK, All cancers combined Key Stats. https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer. 26 Ağustos 2022.

41. Krieghoff-Henning E, Folkerts J, Penzkofer A, Weg-Remers S. Cancer – an overview. *Med Monatsschr Pharm*, 2017, 40: 48-54.

42. Cancer Research UK; Cancer Statistics Report. https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Two. 26 Ağustos 2022.

43. Gabriel J. *The Biology of Cancer*. Baskı. Wiley, 2006.

44. Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, 1974, 34: 997-1004.

45. Dünya Sağlık Örgütü, International Agency for Research on Cancer. Estimated number of new cases in 2020, all cancers, both sexes, all ages. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0. 26 Ağustos 2022.

46. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 535-546.

47. Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 2013, 143: e278S-e313S.

48. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 2003, 123: 21s-49s.

49. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*, 2011, 32: 605-644.

50. Moyer VA. Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*, 2014, 160: 330-338.

51. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*, 2010, 46: 765-781.

52. Gabrielson E. Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology*, 2006, 11: 533-538.

53. Paone G, De Angelis G, Munno R, Pallotta G, Bigioni D, Saltini C, Bisetti A, Ameglio F. Discriminant analysis on small cell lung cancer and non-small cell lung cancer by means of NSE and CYFRA-21.1. *Eur Respir J*, 1995, 8: 1136-1140.

54. Beadsmoore CJ, Screaton NJ. Classification, staging and prognosis of lung cancer. *Eur J Radiol*, 2003, 45: 8-17.

55. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB, Geisinger K, Hirsch FR, Ishikawa Y, Kerr KM, Noguchi M, Pelosi G, Powell CA, Tsao MS, Wistuba I. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*, 2015, 10: 1243-1260.

56. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 778-790.

57. Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD. Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17: 725-737.

58. Liao W. Targeting PI3K pathway to enhance cisplatin cytotoxicity in lung cancer models. Department of Cancer Studies PhD, Leicester: University of Leicester, 2016.

59. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*, 2011, 12: 175-180.

60. Yip PY. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, 2015, 4: 165-176.

61. Zhang Y, Lu H, Xu G. [Effect of PI3K/AKT pathway on cisplatin resistance in non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2014, 17: 635-642.

62. Heavey S, Godwin P, Baird AM, Barr MP, Umezawa K, Cuffe S, Finn SP, O'Byrne KJ, Gately K. Strategic targeting of the PI3K-NFκB axis in cisplatin-resistant NSCLC. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15: 1367-1377.

63. Niederst MJ, Engelman JA. Bypass mechanisms of resistance to receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer. *Sci Signal*, 2013, 6: re6.

64. Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst*, 2015, 11: 1946-1954.

65. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem*, 2016, 109: 314-341.

66. Sobočan M, Bračič S, Knez J, Takač I, Haybaeck J. The Communication Between the PI3K/AKT/mTOR Pathway and Y-box Binding Protein-1 in Gynecological Cancer. *Cancers (Basel)*, 2020, 12.

67. Ma XL, Shen MN, Hu B, Wang BL, Yang WJ, Lv LH, Wang H, Zhou Y, Jin AL, Sun YF, Zhang CY, Qiu SJ, Pan BS, Zhou J, Fan J, Yang XR, Guo W. CD73

promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis via activating PI3K/AKT signaling by inducing Rap1-mediated membrane localization of P110β and predicts poor prognosis. *J Hematol Oncol*, 2019, 12: 37.

68. Gallyas F, Jr., Sumegi B, Szabo C. Role of Akt Activation in PARP Inhibitor Resistance in Cancer. *Cancers (Basel)*, 2020, 12.
69. Smith U, Carvalho E, Mosialou E, Beguinot F, Formisano P, Rondinone C. PKB inhibition prevents the stimulatory effect of insulin on glucose transport and protein translocation but not the antilipolytic effect in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268: 315-320.
70. Reuveni H, Livnah N, Geiger T, Klein S, Ohne O, Cohen I, Benhar M, Gellerman G, Levitzki A. Toward a PKB inhibitor: modification of a selective PKA inhibitor by rational design. *Biochemistry*, 2002, 41: 10304-10314.
71. Kozikowski AP, Sun H, Brognard J, Dennis PA. Novel PI Analogues Selectively Block Activation of the Pro-survival Serine/Threonine Kinase Akt. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125: 1144-1145.
72. Van Ummersen L, Binger K, Volkman J, Marnocha R, Tutsch K, Kolesar J, Arzoomanian R, Alberti D, Wilding G. A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 7450-7456.
73. Gambardella V, Tarazona N, Cejalvo JM, Lombardi P, Huerta M, Roselló S, Fleitas T, Roda D, Cervantes A. Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*, 2020, 12.
74. Catley L, Hideshima T, Chauhan D, Neri P, Tassone P, Bronson R, Song W, Tai YT, Munshi NC, Anderson KC. Alkyl phospholipid perifosine induces myeloid hyperplasia in a murine myeloma model. *Exp Hematol*, 2007, 35: 1038-1046.

75. Chiarini F, Del Sole M, Mongiorgi S, Gaboardi GC, Cappellini A, Mantovani I, Follo MY, McCubrey JA, Martelli AM. The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia*, 2008, 22: 1106-1116.

76. Nyåkern M, Cappellini A, Mantovani I, Martelli AM. Synergistic induction of apoptosis in human leukemia T cells by the Akt inhibitor perifosine and etoposide through activation of intrinsic and Fas-mediated extrinsic cell death pathways. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 1559-1570.

77. Hennessy BT, Lu Y, Poradosu E, Yu Q, Yu S, Hall H, Carey MS, Ravoori M, Gonzalez-Angulo AM, Birch R, Henderson IC, Kundra V, Mills GB. Pharmacodynamic markers of perifosine efficacy. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 7421-7431.

78. Momota H, Nerio E, Holland EC. Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res*, 2005, 65: 7429-7435.

79. Zhang L, Lee KC, Bhojani MS, Khan AP, Shilman A, Holland EC, Ross BD, Rehemtulla A. Molecular imaging of Akt kinase activity. *Nat Med*, 2007, 13: 1114-1119.

80. Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs*, 2003, 14: 167-173.

81. Gills JJ, Dennis PA. Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Curr Oncol Rep*, 2009, 11: 102-110.

82. Huang M, Duhadaway JB, Prendergast GC, Laury-Kleintop LD. RhoB regulates PDGFR-beta trafficking and signaling in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 2597-2605.

83. Sandilands E, Brunton VG, Frame MC. The membrane targeting and spatial activation of Src, Yes and Fyn is influenced by palmitoylation and distinct RhoB/RhoD endosome requirements. *J Cell Sci*, 2007, 120: 2555-2564.

84. Huang M, Prendergast GC. RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol*, 2006, 21: 213-218.

85. Ridley AJ. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J Microsc*, 2013, 251: 242-249.

86. Prendergast GC, Khosravi-Far R, Solski PA, Kurzawa H, Lebowitz PF, Der CJ. Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*, 1995, 10: 2289-2296.

87. Ma Y, Gong Y, Cheng Z, Loganathan S, Kao C, Sarkaria JN, Abel TW, Wang J. Critical functions of RhoB in support of glioblastoma tumorigenesis. *Neuro Oncol*, 2015, 17: 516-525.

88. Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer*, 2002, 87: 635-644.

89. Couderc B, Pradines A, Rafii A, Golzio M, Deviers A, Allal C, Berg D, Penary M, Teissie J, Favre G. In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15: 456-464.

90. Jähner D, Hunter T. The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 1991, 11: 3682-3690.

91. Vasilaki E, Papadimitriou E, Tajadura V, Ridley AJ, Stournaras C, Kardassis D. Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF{beta}-induced signaling pathways. *Faseb j*, 2010, 24: 891-905.

92. Fritz G, Kaina B. Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 792-798.

93. Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, Favre G. RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem*, 2005, 280: 43257-43263.

94. Li YD, Liu YP, Cao DM, Yan YM, Hou YN, Zhao JY, Yang R, Xia ZF, Lu J. Induction of small G protein RhoB by non-genotoxic stress inhibits apoptosis and activates NF-κB. *J Cell Physiol*, 2011, 226: 729-738.

95. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 2011, 147: 742-758.

96. Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2011, 30: 87.

97. Pistritto G, Trisciuoglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8: 603-619.

98. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Biochem*, 2008, 104: 1124-1149.

99. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer*, 2009, 124: 511-515.

100. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-674.

101. Giménez-Bonafé P, Tortosa A, Pérez-Tomás R. Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9: 320-340.

102. Fulda S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 2015, 31: 84-88.

103. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *Faseb j*, 2009, 23: 1625-1637.

104. Fulda S, Debatin KM. Death receptor signaling in cancer therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2003, 3: 253-262.

105. Doğan AL. Apoptozis ve ürolojik tümörler açısından önemi. *Üroonkoloji*, 2007: 25-33.

106. Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477: 299-306.

107. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 2004, 305: 626-629.

108. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 2007, 87: 99-163.

109. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, 2004, 116: 205-219.

110. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*, 1999, 6: 1067-1074.

111. Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS. What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biol Ther*, 2006, 5: 763-765.

112. Luo S, Rubinsztein DC. BCL2L11/BIM: a novel molecular link between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 2013, 9: 104-105.

113. Dasmahapatra GP, Didolkar P, Alley MC, Ghosh S, Sausville EA, Roy KK. In vitro combination treatment with perifosine and UCN-01 demonstrates synergism against prostate (PC-3) and lung (A549) epithelial adenocarcinoma cell lines. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 5242-5252.

114. Tuncer S. Çoklu İlaca dirençli kanser hücre hattına nanopartiküllerle ilaç aktarımı. Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı. Yüksek lisans tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2014.

115. Avrameas S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, 1969, 6: 43-52.

116. Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer*, 2020, 11: 511-518.

117. Sato N, Fukui T, Taniguchi T, Yokoyama T, Kondo M, Nagasaka T, Goto Y, Gao W, Ueda Y, Yokoi K, Minna JD, Osada H, Kondo Y, Sekido Y. RhoB is frequently downregulated in non-small-cell lung cancer and resides in the 2p24 homozygous deletion region of a lung cancer cell line. *Int J Cancer*, 2007, 120: 543-551.

118. Khan Z, Bisen PS. Oncoapoptotic signaling and deregulated target genes in cancers: special reference to oral cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1836: 123-145.

119. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 501-507.

120. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo j*, 1998, 17: 384-395.

121. Richardson PG, Eng C, Kolesar J, Hideshima T, Anderson KC. Perifosine , an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2012, 8: 623-633.

122. Nuutinen U, Ropponen A, Suoranta S, Eeva J, Eray M, Pellinen R, Wahlfors J, Pelkonen J. Dexamethasone-induced apoptosis and up-regulation of Bim is dependent on glycogen synthase kinase-3. *Leuk Res*, 2009, 33: 1714-1717.

123. Feng XL, Fei HZ, Hu L. Dexamethasone induced apoptosis of A549 cells via the TGF-β1/Smad2 pathway. *Oncol Lett*, 2018, 15: 2801-2806.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Medeni Hali:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	
Yüksek lisans:	
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
İlgi Alanları ve Hobiler	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU[1]

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Nurullah AKGÜN
Öğrencinin Numarası	
Ana Bilim Dalı	**Tıbbi Farmakoloji**
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	**Benzerlik Oranı**	**Maksimum Benzerlik Oranları**
I. Giriş	%6	% 15
II. Genel Bilgiler	%15	% 35
III. Materyal ve Metod	%21	% 35
IV. Bulgular	%8	% 15
V. Tartışma	%0	% 20

Not: *Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.*

Tez Yazarı (Öğrenci) **Tez Danışmanı**

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		**Prof.Dr.Zekai HALICI**
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		**Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılan Akt İnhibisyonunun Anti-Tümör Aktivitesinde RhoB Molekülünün Regülatif Rolünün İncelenmesi**
KARAR BİLGİLERİ	**Toplantı Sayısı: 07 Karar No: 74**	**Tarih:** 26.06.2020
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin **BAP tarafından** karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. **Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.** Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	