

**T.C.**  
**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**  
**MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BETULİNİK ASİT'İN ANTI-PROLİFERATİF**  
**ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**HÜSEYİN GÜL**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2014**

**T.C.**  
**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**  
**MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BETULİNİK ASİT'İN ANTI-PROLİFERATİF**  
**ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**HÜSEYİN GÜL**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI**  
**YRD. DOÇ. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU**

**GEBZE**

**2014**



**GEBZE YÜKSEK  
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

## YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20.01.2014 tarih ve 2014/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 22/01/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Hüseyin GÜL'ün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Can Murathan ERİŞTİ

ÜYE

: Melek ÖZKAN

### ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Malignant Mezotelyoma (MM), mezotel hücrelerinin karsinogenezi sonucu oluşan ve genellikle plevrada görülen bir tümör çeşididir. Çevresel ya da mesleki olarak asbestosa maruz kalınması bu hastalığın oluşumuna neden olmaktadır. Hastalığın diğer nedenleri arasında genetik yatkınlık, SV40 virüsü enfeksiyonu, radyoterapi, karbon nanotüpleri, erionit ve diğer bazı mineral fiberleri sayılmaktadır. Birçok büyüme faktörü ve ilgili reseptörlerin aşırı ifade edilmesi hastalığın ortaya çıkışında rol oynamaktadır. Çalışmamızda, tropik iklimlerde yetişen bitkilerden izole edilen Betulinik asit (BA)'in hücre proliferasyonuna etkisi ve MM'nin tedavisinde kullanılabilirliği *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Tez çalışmasının ilk kısmında BA'nın mezotelyoma ve MM hücre hatlarındaki proliferatif etkisi araştırılmıştır. Proliferasyon deneyleri sonucunda BA'nın SPC212 mezotelyoma kanser hücre hattı üzerinde proliferasyonu doza ve zamana bağlı olarak azalttığı görülmüştür. BA, kontrol Met5A hücreleri üzerinde SPC212 hücrelerinden daha az stotoksik bulunmuştur. Takibinde SPC212 hücrelerinde, proliferasyonla ilişkili mekanizmada rol aldığı düşünülen Epidermal Büyüme faktörü reseptörü (EGFR), ekstrasellüler regüle edilmiş kinaz/mitogen aktive edilmiş protein kinazlar (ERK/MAPKs), stresle aktive olan protein kinaz/c-jun terminal kinazlar (SAPK/JNK), p38 MAPK'lar ve PI3K/Akt kinaz aktivasyonları ve total protein seviyeleri araştırılmıştır. Protein analiz sonuçlarına göre BA, doza ve zamana bağlı olarak, EGFR, ERK1/2 ve AKT aktivitesini baskımlarken p38 ve JNK aktivitelerini indüklemiştir. Ayrıca EGFR, p38, JNK ve AKT ifadelerinde de yine doza ve zamana bağlı olarak azalma gözlenmiştir. Yapılan RT PCR çalışmalarında ise BA'nın JUN, STAT1, STAT3, STAT5a ve ELK1 ifadelerini baskıladığı görülmüştür. BA'nın hücre proliferasyonu inhibe ettiği ve normal hücrelerden çok kanser hücrelerine seçici etki gösterdiği yapılan bu çalışmayla ve daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Betulinik asit bilgilerimiz doğrultusunda MM hücre hatlarında ilk kez denenmiştir. BA'nın genel etkisi de değerlendirildiğinde EGFR pozitif MM hücrelerinin tedavisinde potansiyel kullanımı olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler: Betulinik Asit (BA), Malignant Mezotelyoma (MM), Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), SPC212, Met5A.**

## SUMMARY

Malignant Mesothelioma (MM) is the carcinogenesis of a mesothelium, which generally occurs in the pleural cavities. Environmental and/or occupational exposure to asbestos fibers play key role in the development of the disease. Among the other causes of MM are genetic predisposition, SV40 virus infection, radiotherapy, carbon nanotubes, erionite and some other fibrous minerals. Overexpression of particular growth factors and associated receptors have a role in the development of the disease. Late diagnosis, difficulty of surgery and limited chemotherapeutic agent applications lead to search for alternative treatments or agents. Combined use of pemetrexed and cisplatin is the common chemotherapeutic treatment, however the existence of side effects requires further research for harmless agents. In this study, the anti-proliferative effect of betulinic acid (BA) on MM cells was investigated.

In the first part of this study, the cytotoxic effects of BA on Met5A mesothelioma and SPC212 MM cell lines were analysed. BA inhibited the SPC212 cell proliferation in a dose- and time-dependent manner. BA also inhibited Met5A cell proliferation, but only at high dose and late time periods. The effect of BA on the proliferation of SPC212 cells was more potent than that of Met5A. Next, the activation and the expression of the key molecular players involved in the signaling pathways, (EGFR, ERK, JNK, p38, AKT) were analysed. BA, in a dose- and time-dependent manner, inhibited the activation of EGFR, ERK1/2 and AKT, but induced the activation of p38 and JNK. The total protein levels of EGFR, AKT, p38 and JNK, but not ERK 1/2, were reduced after the BA treatment. In addition, RT-PCR results showed that BA repressed JUN, STAT1, STAT3, STAT5a and ELK1 mRNA levels. With this study, BA has been tested on MM cells for the first time. Our results suggest that BA inhibits cell proliferation and is more cytotoxic in tumor cells than normal cells. Thus, BA can be thought of as a promising chemotherapeutic agent with potential future use in the treatment of EGFR positive MM.

**Key Words: Betulinic Acid (BA), Malignant Mesothelioma (MM), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), SPC212, Met5A.**

## TEŞEKKÜR

BaŐta t¼m alıŐmam boyunca her konuda bana yardımcı olan tez danışmanım Yrd.Do.Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU hocama, olmasalardı olmazdım dediğim canım aileme, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim laboratuvar arkadaşlarıma ve tabiki iyiki tanı mıŐım dediğim ve her zaman seveceğim güzel insana (iyiki varsın), en içten teŐekk¼rlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. MEZOTELYOMA	4
2.1. Asbest İle İlişkili Mezotelyoma	4
2.2. Asbest İle İlişkili Olmayan Mezotelyoma	5
2.2.1. Erionit ve Diğer Mineral Fiberleri	6
2.2.2. Karbon Nanotüpleri	6
2.2.3. Radyoterapi	7
2.2.4. Virüsler	7
2.3. Mezotelyoma Tedavisinde Hedeflenmiş Terapi	8
2.3.1. EGFR İnhibitörleri	8
2.3.2. Anjiyogenez İnhibitörleri	9
2.3.3. Proteozom Modifikasyon Tedavileri	9
2.3.4. Histon Deasetilaz İnhibitörleri	9
2.3.5. Diğer Hedeflenmiş Ajanlar	10
2.4. Mezotelyomada Sinyal İletimi	11
2.4.1. EGFR	11
2.4.2. MAPK Yolağı	18
2.4.2.1. ERK	20
2.4.2.2. JNK	21
2.4.2.3. p38	22
2.4.2.4. AKT	23

3. BETULİNİK ASİT	26
4. MATERYAL VE METOD	29
4.1. Materyal	29
4.1.1. Kimyasal Maddeler	29
4.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler	29
4.1.3. Kullanılan Solüsyonlar	30
4.2. Metod	32
4.2.1. Hücre Kültürü ve Alt Kütürleme	32
4.2.2. Hücre Stoklama	32
4.2.3. MTS Hücre Proliferasyon Testi	32
4.2.4. Protein İzolasyonu	33
4.2.5. Protein Miktar Tayini	34
4.2.6. SDS-PAGE ve Western Blotting	34
4.2.7. Total RNA İzolasyonu	36
4.2.8. cDNA Sentezi	37
4.2.9. RT-PCR	38
5. BULGULAR	39
5.1. BA'nın Met5A ve SPC 212 Hücre Proliferasyonuna Etkisi.	39
5.2. BA'nın EGFR MAPK Yolaklarına Etkisi	40
5.3. BA'nın PI3K/AKT yolağı üzerine olan etkisi.	42
5.4. RT-PCR Sonuçları	43
6. TARTIŞMA	45
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	73

# SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b><u>Simgeler ve</u></b>	<b><u>Acıklamalar</u></b>
<b><u>Kısaltmalar</u></b>	
BA	: Betulinik Asit
MM	: Malignant Mezotelyoma
MPM	: Malignant Plevral Mezotelyoma
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	: Hücre dışı Sinyal Regüle Kinaz
JNK	: c-Jun N <sub>2</sub> -Terminal Kinaz
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Tirozin Kinazlar
RTK	: Reseptör Tirozin Kinazlar
PI3K	: Fosfatidil İnositol 3-Kinaz
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörleri
MEK	: Mitojenle Aktive Olan Tirozin Kinaz Kinaz
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
HDAC	: Histon Deasetilaz
CNT	: Karbon Nanotüpleri
EE	: Erken Endozom
Tag	: Büyük t antijeni
tag	: Küçük t antijeni
MKP-1	: MAPK Fosfataz-1
PAK	: P21 Tarafından Aktive Edilmiş Protein Kinaz
SDS-PAGE	: SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez
RT-PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1: EGFR reseptörü yapısı ve domainleri.	12
2.2: HER ailesi üyeleri ve spesifik ligandları.	13
2.3: EGFR reseptörünün yer aldığı moleküler sinyal yolları ve etkileşime girdiği moleküller	14
2.4: EGFR reseptörünün internalizasyonu, ubiquitinasyonu ve yeniden hücre yüzeyinde ifade edilmesi.	15
2.5: EGFR reseptörünün nükleer lokalizasyonunun moleküler mekanizması.	17
2.6: EGFR için geliştirilen monoklonal antikorlar ve tirozin kinaz inhibitörleri (TKI).	18
2.7: JNK ve p38 MAPK yolağı moleküler mekanizması.	19
2.8: ERK MAPK sinyal yolağı moleküler mekanizması.	21
2.9: AKT sinyal yolağı moleküler mekanizması.	25
3.1: Betulinik asitin kimyasal yapısı.	26
5.1: BA'nın Met5a (a) ve SPC212 (b) hücre proliferasyonuna etkisi. MTS testi 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde uygulanmıştır. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin çiftli tekrarları şeklinde yapılarak ortalamaları alınmıştır. p değeri SPSS programında Dunnett ve Benforoni testleri ile hesaplanmıştır. p değeri *P<0,05 ve #p<0,01 olarak belirlenmiştir.	40
5.2: BA'nın EGFR ve ERK1/2 fosforilasyonu ve ifadenmesi üzerine etkisinin doza (0-100 µM ) ve zamana (0-24 saat) bağlı olarak incelenmesi. Deneyler en az 3 kez tekrar edilerek Image lab. Software ile analiz edilmiştir. Yükleme kontrolü olarak aktin proteini kullanılmıştır.	41
5.3: BA'nın p38, JNK1/2 ve c-JUN fosforilasyonu ve ifadenmesi üzerine etkisinin doza (0-100 µM ) ve zamana (6-24 saat) bağlı olarak incelenmesi. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir ve image lab. Software ile analiz edilmiştir. Yükleme kontrolü olarak aktin kullanılmıştır.	42
5.4: BA'nın AKT fosforilasyonu ve ifadenmesi üzerindeki etkisinin	42

doza (0-100  $\mu\text{M}$ ) ve zamana (6-24 saat) bağı olarak incelenmesi. Deneyle en az 3 kez tekrar edilmiştir ve image lab. Software ile analiz edilmiştir. Yükleme kontrolü olarak aktin kullanılmıştır.

5.5:	BA'nın 75 $\mu\text{M}$ konsantrasyonda JUN ve ELK1 ifadesi üzerine etkisinin zamana (3-24 saat) bağı olarak incelenmesi. Deneyle en az 3 kez tekrar edilmiştir. p değeri SPSS programında Dunnett ve Benforoni testleri ile hesaplanmıştır. p değeri *P<0,05 olarak belirlenmiştir.	43
5.6:	BA'nın 75 $\mu\text{M}$ konsantrasyonda STAT1, STAT3 ve STAT5a ifadesi üzerine etkisinin zamana (3-24 saat) bağı olarak incelenmesi. Deneyle en az 3 kez tekrar edilmiştir. p değeri SPSS programında Dunnett ve Benforoni testleri ile hesaplanmıştır. p değeri *P<0,05 olarak belirlenmiştir.	44
6.1:	Stress ile aktive olan p38 yolağı.	47
6.2:	ERK ve p38 yolağının protein fosfatazlar aracılığı ile çapraz etkileşimi.	48
6.3:	Oksidatif stres sonucu PKC $\delta$ aktivitesinin gerçekleşmesi ve JNK fosforilasyonunun negatif düzenlenmesinin inhibisyonu.	49
6.4:	JNK aktivasyonunun c-JUN üzerinden kendi genini regüle etmesi ve c-JUN fosforilasyonunun p21 tarafından aktive edilen PAK2 üzerinden baskılanması.	50
6.5:	Akt'nin Mdm2 üzerinden p53'ü inhibe etmesi sonucu p21 transkripsiyonunun baskılanması.	51
6.6:	BA'nın JNK ve p38 stres yolakları, ve AKT sağkalım yolağı üzerine etkisi.	52

## TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>		<b><u>Sayfa</u></b>
2.1:	Çeşitli kanser türlerindeki JNK ve p38 MAPK ekspresyon seviyeleri.	22
3.1:	BA'nın çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan çalışmalardaki kullanılan doz miktarı.	27
4.1:	%10'luk ayırma jeli ve %4.5'lik paketleme jeli hazırlamak için kullanılacak maddeler ve miktarları	35
4.2:	Westen Blotting'de ilgili proteinlerin saptanması amacıyla kullanılan primer ve sekonder antikorlar ile kullanılan seyreltme oranları.	36
4.3:	RT-PCR reaksiyon değerleri.	38

# 1. GİRİŞ

Malignant mezotelyoma (MM), plevral ve peritoneal boşlukların mezotelyal yüzeyinden ortaya çıkan agresif bir neoplazmadır. MM'nin %80'inden fazlası plevra kaynaklıdır ve en büyük oluşum nedeni asbeste maruz kalmaktır. Moleküler düzeyde asbestin MM'ya nasıl sebebiyet verdiği henüz tam olarak açıklığa kavuşmamakla beraber, asbest'in DNA hasarına neden olduğu ve TNF- $\alpha$  yolağı üzerinden dolaylı şekilde NFk- $\beta$  yolağını aktifleştirip mezotelyoma hücrelerinin sağ kalımını uyardığı ve tümör oluşturduğu belirlenmiştir [1].

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) hücre dışı ligand bağlama, transmembran ve tirozin kinaz aktivitesine sahip hücre içi domainden oluşan bir reseptör tirozin kinazdır. Bu reseptör özellikle hücre proliferasyonu ve hücre sağkalımı gibi yolların tetiklenmesinde rol alır. MM'li bireylerde EGFR'nin aşırı ifade edilmesi nedeniyle spesifik EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (erlotinib ve gefitinib) tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır [2], [3]. Benzer şekilde MM'li bireylerde aşırı ifade edildiği bilinen PDGFR, VEGFR, c-kit reseptörlerine özgü inhibitörler ve/veya monoklonal antikolar da kullanılmaktadır. Bunlara ilaveten, histon deasetilaz inhibitörleri, gen terapi ve immün terapi yöntemleri de denenmektedir [4]. Diğer kanser tedavileri ve MM tedavisinde de kullanılan başka bir ajan Cisplatindir. Cisplatin DNA'ya hasar vererek apoptozu tetikler. Cisplatin kullanımı ile MM hastalarının yaşama oranlarında artış gözlenmiştir. Cisplatin, Carboplatin veya Pemetrexed gibi ilaçlarla birlikte uygulandığında ise hastaların yaşama oranlarındaki artışın daha da fazla olduğu belirlenmiştir. Tüm bu araştırma ve uygulamalara rağmen MM tedavisinde tam etkin bir ajan ya da birleşim henüz bulunmamaktadır.

Betulinic asit (BA), *Tryphillum peltatum*, *Ancistrocladus heyneaus*, *Diospyros leucomelas*, *Tetracera boliviana*, *Zizyphus joazeiro* ve *Syzygium formosanum* gibi tropik iklimlerde yetişen bitkilerden izole edilen pentasiklik triterpendir ve önemli biyolojik aktivitelere sahiptir.

BA'nın antitümör etkisi son yıllarda çeşitli kanser hücreleri üzerinde araştırılmıştır. BA'nın melanoma, nöroblastoma, glioblastoma, medulloblastoma, baş-boyun, kolon, meme, hepatoselüler, akciğer, prostat, renal hücre, ovaryum kanserleri ve lösemiye karşı antitümör etki gösterdiği belirlenmiştir [5], [6]. Bunlara

ek olarak, BA'nın metastatik olmayan melanomalara kıyasla metastatik melanomaya karşı seçici sitotoksosite gösterdiği [7], farklı orjinlere sahip transforme olmamış hücelere (örn; fibroblastlar, melanositler, nöronal hüceler ve periferel kan lenfositleri) kanser hücelerine göre daha az sitotoksosite gösterdiği de belirlenmiştir [8].

BA'nın mitokondriyel yolak üzerinden apoptozu tetikleyerek etki gösterdiği saptanmıştır [9], [10], [11]. Hücelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumu [12], bcl-2, bax seviyelerinin [10] ve topoizomerez I $\alpha$  ve II $\alpha$  modülasyonu [13]. BA'nın diğer hücesel aktiviteleri arasında bulunmaktadır. Ayrıca kesin olmamakla birlikte, BA'nın G1/S geçişinde rol alan siklin-D1 geninin ekspresyonunu azalttığı [14] ve Siklin-B1 proteinini inhibe ederek G2/M safhasında hücre döngüsünü tutukladığı [15] ifade edilmektedir.

Mitojenle Aktive olan Tirozin Kinazlar (MAPK) sitoplazmik ve nükleer hedefleri fosforilleyen serin/treonin protein kinazları içeren bir ailedir. MM'de MAPK'lerin aşırı ifade edildiği belirlenmiştir. MAPK proteinleri, çeşitli hücre dışı sinyallerle aktive olarak hücre sağkalımı, proliferasyonu ve adaptasyonu gibi hücre içi süreçleri düzenlerler. p38 ve JNK molekülleri hücesel stres karşısında aktive olan diğer MAPK ailesi üyeleridir. Sağ kalım ve proliferasyonda ERK yolağı etkinken; p38 ve JNK yolakları apoptozun uyarımıyla bağlantılıdır. BA'in bu proteinler üzerine etkisi metastatik melanoma hastalarından izole edilen hücelerde incelenmiş ve melanoma hücelerinin sağkalımının p38 ve JNK üzerinden baskılandığı gösterilmiştir [16].

AKT ailesi serin/treonin kinaz görevi yapan ara sinyalizasyon molekülleridir. AKT ailesi üyeleri hücre sağkalımı, proliferasyonu, invazyonunda ve glukoz metabolizması ve anjiyogenezde rol alırlar. MM hücelerinde PTEN baskılandığı için AKT sıklıkla aktive olmaktadır [17], [18]. Bu nedenle PI3K/AKT yolağının baskılanması MM terapisinde önemli bir stratejidir.

## 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İÇeriği

Bu tez çalışmasında bazı kanser hücrelerinde proliferasyonu ve hücre siklusunu durduran ve hücreleri apoptoza uğratan BA'nın; EGFR ve bağımlı yollar üzerine etkinliğinin moleküler seviyede araştırılması planlanmıştır. Öncelikle *in vitro* koşullarda BA'nın MM hücre proliferasyonuna etkisi belirlenerek BA uygulanmasının, EGFR ile EGFR alt yolağında rol alabilecek JNK ve p38, ERK, AKT moleküllerinin fosforilasyonu ile total protein seviyelerine etkisinin doz ve zaman bağımlı olarak incelenmesi amaçlanmıştır . Ayrıca BA uygulamasının takibinde bu yollarla bağlantılı transkripsiyon faktörlerinin gen ifade düzeylerindeki değişimin analiz edilmiştir.

Targeted terapi, immunterapi, gen terapi ve kemoterapi ile MM tedavisinde olumlu sonuçlar henüz alınamamıştır. Bu nedenle yeni alternatif ajanların araştırılması gerekmektedir. BA'nın apoptozu tetikleme, proliferasyonu ise inhibe etmesi gibi antikanser özellik sergilemesi ve bununla birlikte normal hücrelerden çok kanser hücrelerine seçici etki göstermesi kemoterapide kullanılabilecek potansiyel bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde BA'nın EGFR'ye aşağı akışındaki moleküllere olan etkisi ile ilgili henüz çok az veri bulunmaktadır. BA'nın etkisi malignant mezotelyomada henüz incelenmemiştir. Tezimizde BA'nın anti-kanser etki gösterdiği yollarla yer alabilecek bazı moleküllerin gen ve protein seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi hedeflenmektedir.

## 2. MEZOTELYOMA

Mezotelyoma plevral ve peritoneal dokuların mezotelyal hücrelerinden köken alan bir malignansidir. Oldukça nadir görülen bir tümör çeşididir. Mezotelyoma lokal olarak istila etmeye meyillidir, ancak nadirde olsa metastaz yaptığı bilinmektedir. Hastaların hayatta kalma süreleri ortalama olarak 12 aydır. Birçok hasta ilk belirtiler gerçekleşikten 10-17 ay içerisinde hayatlarını kaybetmektedir. Hastalığın tanısı oldukça güçtür. Bunun için ameliyat ile alınan bir kesit histolojik olarak incelenmektedir. Fakat hastaların büyük çoğunluğuna (%80) hastalık seviyesi III/IV iken teşhis konulmaktadır. Bu aşamaya gelmiş hastaların ameliyat ile tedavi edilmesi mümkün değildir. Bu yüzden bu seviyedeki hastaların çoğu sistemik olarak tedavi edilmektedir. Fakat yine de tedavi olasılığı çok düşüktür ve hastalığın kemo- ve radyoterapiye duyarlılığı oldukça zayıftır [37]. Diğer yandan mezotelyomanın moleküler biyolojisini net bir şekilde anlamak hastalığın teşhisi, tedavisi ve önlenmesi için yeni tekniklerin (hedeflenmiş terapi) geliştirilmesi bakımından önemlidir [27], [87].

### 2.1. Asbest İle İlişkili Mezotelyoma

Mezotelyomaya neden olan faktörlerin başında asbeste maruz kalınması gelmektedir. Son yıllarda ABD'de yapılan çalışmalarda, çalışma ortamlarında asbeste karşı alınan önlemlerin artmasıyla birlikte mezotelyomanın görülme sıklığının da düştüğü anlaşılmıştır. Diğer yandan asbest fiberlerinin fazlaca bulunduğu iş ortamlarında çalışan kişilerde mezotelyoma oluşumu aynı sıklıkta kalmıştır [28]. Asbest bulunan ortamlarda çalışan işçilerin sadece kendileri mezotelyoma riski taşımamaktadır. Aynı zamanda aile bireyleri de çalışanın kıyafet vb. yollarla beraberinde getirdiği asbest fiberlerinden dolayı mezotelyoma olma riski altındadır.

Asbestin solunum sistemi ile ilişkisi yıllarca araştırılmıştır. Bu konuda 1980 yılında yapılan bir çalışma ile asbest çalışanlarının %8'inin solunum sisteminde meydana gelen bozukluk sonucu hayatını kaybettiği anlaşılmıştır [39]. Bunun yanı sıra asbest çalışanlarının %10'unun mezotelyoma olma riski taşıdıkları ve mezotelyoma vakalarının %70'inin asbeste maruz kalmadan kaynaklandığı tespit edilmiştir [28].

Solunum yoluyla alınan asbest fiberleri perital plevrada birikmeye başlar. Daha sonra, plevrada biriken asbest fiberleri inflamasyona sebep olur. Kronik inflamasyon süreci ve devamında meydana gelen ve sürekli devam eden doku onarımı nedeniyle birçok hücre bölünmesi gerçekleşir. İnflamasyon sürecinde asbest fiberleri mezotelyal hücrelerde fagositozla parçalanır ve oluşan asbest ürünleri EGFR'a bağlanarak c-myc ve c-jun gibi onkojenik kaskatta yer alan proteinleri aktive ederler. Bununla birlikte Bcl-x1 gibi antiapoptotik proteinlerin uyarımı da gerçekleşir [88]. Ayrıca doku onarımı sürecinde meydana gelen sayısız hücre bölünmesi esnasında mitozun S fazında gerçekleşen DNA sentezi işleminde kalıtsal faktörlere bağlı olarak mutasyon birikimi olacaktır. Bu aşamada bireylerin kansere yatkınlıkları ne kadar fazla ise mutasyon birikimi de o denli fazla olacaktır. Mezotelyoma vakalarında sıklıkla görülen mutasyon, inflamasyonla ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan ve antiapoptotik süreçte görev alan Nf-kB'dir. Mezotelyomada görülen diğer genetik değişimler ise kromozomal delesyonlardır (9q ve 22q). Bu değişimler asbest fiberlerinin mitotik iğ iplikleri ile etkileşime girmesi sonucu kromozom ayrılmasının sağlıklı gerçekleşmemesinden kaynaklanmaktadır. Meydana gelen delesyonlar NF2 ve INK4/ARF genleri ile ilişkilidir. Bu gen ürünleri hücre döngüsüne girişin düzenlenmesinde önemlidir. Dolayısıyla bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, hücre döngüsünü düzenleyen p16, p53 ve retinoblastoma (Rb) aktivitelerinde değişime neden olmaktadır [43].

## **2.2. Asbest İle İlişkili Olmayan Mezotelyoma**

Bütün mezotelyoma vakaları asbest ile ilişkili değildir. Asbest dışında birtakım ajanların da malignant mezotelyomaya neden olduğu görülmüştür. Bu ajanlar arasında en iyi bilineni erionit ve terapik radyasyondur. Bunun yanında SV40 virüsünün kanserojen veya kokanserojen olduğuna dair güçlü deneysel, epidemiyolojik moleküler kanıtlar bulunmaktadır [45]. Ayrıca erionit dışında birtakım mineral fiberlerinin, insan yapımı karbon nanotüplerin ve MC29 lökosis kuş virüsünün mezotelyoma oluşumuna neden olduğu bilinmektedir [45].

### **2.2.1. Erionit ve Diğer Mineral Fiberleri**

Türkiye'de Kapadokya'nın bazı köylerinde çevresel olarak veya başka yollardan asbeste maruz kalınmadığı halde MM vakaları görülmektedir. Bu bölgede MM'nin asbest ile değil, volkanik taşlarda bulunan ve bir zeolit olan erionit ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Roma döneminden beri bu bölgede evler, yollar ve kanalizasyon sistemleri erionit içeren taşlardan yapılmaktadır. Bu nedenle Kapadokya köylerinde erionit ile ilişkili hastalıklar belkide yüzyıllardır görülmektedir [45]. Yapılan deneysel bir çalışmada Türkiye ve Oregon'dan alınan erionit örnekleri farelere soluk yolundan verilmiş ve bunun sonucunda farelerde yüksek oranda MM oluşumu gözlenmiştir [46]. Diğer bir çalışmada ise erionit, farelerin plevral ve peritoneal bölgelerine enjekte edilmiş (0,5 veya 1 mg) ve farelerin %90 oranında MM olduğu görülmüştür [57], [60]. Bu oranlar asbest fiberlerinde görülen oranlardan daha fazladır. Erionitin asbest fiberlerinden daha kanserojen olmasının temel nedeni, erionitin asbest fiberlerinden daha büyük iç yüzey alanına sahip olmasıdır [60].

Biancavilla ve doğu Sicilya bölgelerinde flora-adenit fiberlerinin malignan mezotelyomaya neden olduğu görülmüştür [61]. Ayrıca şekerkamışı çalışanlarında bitki kökenli olan kristalin silika fiberlerinin MM'ye neden olduğu vakalar da görülmüştür.

### **2.2.2. Karbon Nanotüpleri**

Son zamanlara kadar insan yapımı hiçbir mineral fiberinin mezotelyomaya neden olduğu bir durum gözlenmemiştir. Fakat nanoteknoloji biliminin gelişmesiyle birlikte silika, gümüş ve nikel gibi materyallerden elde edilen karbon nanotüplerinin (CNT) mezotelyoma için yüksek risk taşıdıkları tespit edilmiştir [64]. Yapılan deneysel bir çalışmada uzun CNT fiberleri farelerin peritoneal boşluğuna nakledilmiş ve uzun asbest fiberlerinin neden olduğuna benzer ya da ondan daha fazla inflamasyon ve fibrözise neden olmuştur. Kısa CNT ve asbest fiberleri bu açıdan önemli bir etkiye yol açmamıştır [65].

Karbon nanotüpleri elektronik ve tıp gibi alanlarda kullanılan nanoteknoloji ürünleri için oldukça önemlidir. CNT lerin asbest fiberleri ile benzer şekil ve

büyükte olmaları ve bunun yanında DNA hasarına yol açmaları mezotelyomaya neden olmalarında başlıca etkidir [45]. CNT fiberlerinin hayvanların peritoneal boşluklarında mezotelyoma gelişimi üzerine etkisinin olduğu bilinmektedir. Fakat bu etkinin insanlar üzerinde olup olmadığı ile ilgili henüz bir bilgi bulunmamaktadır.

### **2.2.3. Radyoterapi**

İyonize radyasyonun hematolojik malignansi ve katı tümörleri içeren farklı tipte kanser için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Yapılan epidemiyolojik araştırmaların birçoğunda iyonize radyasyon ve mezotelyoma arasında bir ilişki olduğu istatistiksel olarak kanıtlanmıştır. İnsan ve hayvanlardan elde edilen veriler de iyonize radyasyonun mezotelyoma oluşumunda rol aldığını doğrular niteliktedir [19].

Tedavi için kullanılan ve toryum dioksit içeren Thorotrast uygulamasının sonrasında plevra, periton ve perikardiyumda MM oluşumu gözlenmiştir [66], [78]. Toryum dioksit çözünür değildir ve bir kez vücuda alındıktan sonra geri atılmaz. Bu nedenle çeşitli dokularda kalır ve bozunmaya devam eder. Bunun sonucunda birçok  $\alpha$  partikülü emilimi gerçekleşir. Danimarka, İsviçre, Japonya, Almanya ve ABD'de kontrol ve mezotelyoma popülasyonları üzerine yapılan deneylerde, Thorotrast'a maruz kalmanın plevral ve peritoneal MM riskini arttırdığı açıklanmıştır [67], [68].

### **2.2.4. Virüsler**

SV40 maymunlarda bulunan bir DNA virüsüdür ve malignant plevral mezotelyoma (MPM) ile ilişkilidir [24], [25]. SV40'ın mezotelyoma patojenizindeki rolü tartışmalıdır. Fakat buna rağmen 50 farklı laboratuvarında SV40 ile MPM arasında bir ilişki olduğu rapor edilmiştir. Diğerlerinde ise herhangi bir ilişki gözlenmemiştir [26]. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda SV40 ile MPM arasında bir ilişki olduğu açıkça ortaya konulmuştur. Hamsterların plevra ve kalp içine SV40 enjekte edilmiş ve 6 ay içerisinde MPM gelişimi gözlenmiştir [27].

SV40, büyük T antijeni (Tag) ve küçük t antijeni (tag) olmak üzere iki onkojenik protein üretmektedir. İnsandan alınan doku örnekleri incelendiğinde Tag antijeninin p53 ve pRb'ya bağlanıp tümör baskılayıcı özelliklerini inaktive ettiği

görülmüştür. Ayrıca IGF-I gen promotörüne bağlanarak genin ifadesini ve IGF-I sinyalini durdurarak hücre çoğalmasını arttırdığı tespit edilmiştir [40]. SV40 tag, MAP-kinaz sinyalini ve AP-1 aktivitesini arttırmaktadır. Ayrıca insan mezotelyal hücrelerinden ve MPM biopsi örneklerinden SV40'ın HGF/Met reseptör aktivitesini, telomeraz aktivitesini ve Notch-1 aktivitesini indüklediği anlaşılmıştır [29], [31].

Yapılan birkaç çalışmada asbest ve SV40 virüsünün güçlü kokanserojen etkisi rapor edilmiştir [32], [33]. Yapılan bir hayvan deneyinde asbest, SV40 varyantı olan ve tag antijenini ifade etmeyen, hayvanlarda MPM oluşumuna neden olmayan SV40 dl883 ile kombine halde uygulanmış ve hamsterların büyük bölümünde MPM gelişimi gözlenmiştir. Buna karşın, SV40 dl883 tek başına uygulandığında MPM'ye neden olmamışken, asbest tek başına uygulandığında hamsterların düşük bir yüzdesinde MPM gözlenmiştir [33]. Bu veriler göstermiştir ki SV40 ile enfekte olan bireylerde düşük seviyedeki asbest dahi MPM oluşumuna neden olabilmektedir. Fakat SV40 aşısı ile aşılanmış milyonlarca insan için güvenli bir asbest seviyesi belirlenmiş değildir.

## **2.3. Mezotelyoma Tedavisinde Hedeflenmiş Terapi**

### **2.3.1. EGFR İnhibitörleri**

MM hücrelerinin çoğalması ve yayılması EGFR, PDGF, VEGF gibi büyüme faktörleri ve onların reseptörlerine ilişkilendirilir [34], [35]. Yapılan bir dizi klinik çalışmada bu reseptörleri hedef alan ajanlar uygulanmış ve mezotelyal hücre büyümesi inhibe edilmiştir. Bu reseptörler içerisinde mezotelyoma tedavisi için en ideal olan ise EGFR'dir. Çünkü EGFR MM'de yüksek oranda ifade edilmektedir [35], [36]. Fakat yapılan bir Faz II çalışmasında, gefitinib verilen 43 hastadan (%97'sinde EGFR aşırı ifadesi belirlenmiş) sadece birinde düzelme ve bir hastada ise kısmi düzelme gözlenmiştir [3]. Yapılan ikinci bir Faz II çalışmasında da, gefitinib aktivitesinin sınırlı olduğu doğrulanmıştır [38]. Erlotinib ile yapılan Faz II denemesinde de erlotinibin mezotelyomada yetersiz aktivite gösterdiği belirlenmiştir [2]. Yapılan diğer bir çalışmada erlotinib bevacizumab ile birlikte uygulandığında benzer sonuçlar elde edilmiştir [76]. Bu sonuçlar sadece EGFR inhibitörlerinin MM tedavisinde yeterli olmadığı sonucunu işaret etmektedir [41].

### **2.3.2. Anjiyogenez İnhibitörleri**

Mezotelyoma hastalarında VEGF seviyesinin de yüksek olması nedeniyle, spesifik VEGF inhibitörü (bevacizumab) kullanılmaktadır [42]. Randomize bir Faz II denemesinde cisplatin ve gemcitabine kombine olarak bevacizumabla ve bevacizumab olmadan, daha önce kemoterapi almamış hastalara uygulanmış, fakat tam etkinlik görülmemiştir [42]. Faz II denemelerinde tek başına VEGF tirozin kinaz inhibitörü kullanıldığında çok az aktivite görülebilmıştır. Bunun yanında hem VEGF hem PDGF reseptörünü inhibe eden Vatalanib'in Faz II'de sınırlı aktivite gösterdiği bildirilmiştir [44], [72]. Diğer bir anjiyogenez inhibitörü olan Suitinib de MM hastalarının tedavisinde düşük etki göstermiştir [86]. Bevacizumab'ı da kapsayan kombine çalışmalarda anti-anjiyogenik etki gösteren ajanların MM tedavisinde yeterli olmadığı belirlenmiştir [4].

Özetle yapılan Faz II denemelerinde VEGF tirozin kinaz inhibitörlerinden alınan en iyi sonuçlarda sadece düşük bir aktivite görülebilmıştır [4]. Anti-anjiyogenik ajanlar arasında en eski ve en çok çalışılan Thalidominele yapılan Faz II denemelerinde 40 hastanın 11'inde (%27,5) hastalığı stabil hale getirmiştir [47]. Thalidomine dışında bu açıdan en iyi oran vatalanib ile yapılan Faz II denemesinde alınabilmıştır (%11) [48], [49].

### **2.3.3. Proteozom Modifikasyon Tedavileri**

Preklinik çalışmalar göstermiştir ki NF- $\kappa$ B inhibitörü olan bortezomib hastalara uygulandığında, cisplatin ve pemetraxed tedavisinin aktivitesini arttırmıştır [50], [51]. Klinik öncesi hala devam eden çalışmalarda, proteozom inhibitörlerinin MPM hastalarındaki etkisi araştırılmaktadır. Tek bortezomib, bortezomib/oxaliplatin ve bortezomib /cisplatin birlikte uygulanmaktadır [4].

### **2.3.4. Histon Deasetilaz İnhibitörleri**

Proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları gen transkripsiyonunda önemli rol oynar. Histon deasetilaz (HDAC) enzimleri kromatin yapı ve

fonksiyonunun düzenlenmesinde rol alır. Histonların translasyon sonrası modifikasyonları arasında en çok çalışılan lizin asetilasyonudur. HDAC enzimleri histon dışında, p53, tübin ve çeşitli transkripsiyon faktörleri ve farklı proteinleri de geri dönüşümlü olarak asetillemektedir [52], [53]. Preklinik veriler HDAC enzimlerinin mezotelyomada malignant dönüşüm ve hücrel farklılaşma aşamalarında kritik rol oynadığını göstermiştir [54]. Ayrıca HDAC inhibitörü suberoylanilide hidroksi asit (SAHA)'in pemetrexed hedefi olan timidilat sentaz enzimi genini baskıladığı düşünülmektedir. Yapılan Faz I çalışmasında SAHA (vorinostat) uygulanmış 130 ilerlemiş kanser hastasından ikisinde kısmi cevap alınmıştır [55]. Devam etmekte olan bir Faz III denemesinde ise, daha önce mezotelyoma tedavisi almış 660 hasta üzerinde vorinostat'ın etkisi incelenmektedir. Çalışmanın sonuçlarının pozitif çıkması halinde pemetrexed rejimi yapan hastalarda yeni bir tedavi alternatifi ortaya çıkacaktır [4].

### **2.3.5. Diğer Hedeflenmiş Ajanlar**

Tirozin kinaz olan Src ailesi ve ligantları MPM'de aşırı ifade edilmektedir. Dasatinib SRC ailesi kinazları, EphA2 ve PDGFR için potansiyel bir inhibitördür. Fakat yapılan Faz II denemelerinde hem hastalar dasatinibe karşı düşük tolerans göstermiş hem de herhangi bir dasatinib aktivitesi gözlenmemiştir [56]. Benzer şekilde PDGF ve c-Kit tirozin kinaz inhibitörü olan İmatinib'in tek olarak uygulanması MPM tedavisinde yetersiz bulunmuştur [58], [141]. Devam eden kombinasyon çalışmalarında İmatinib gemcitabine ve cisplatin/pemetrexed ile birlikte uygulanmaktadır. Böylece İmatinibin MPM de bir rolü olup olmadığı belirlenmek istenmektedir [59], [90].

İmatinib dışında, mTOR inhibitörü olan Everolimus ve TGF'in memeli hücrelerindeki bütün formlarına bağlanabilen IgG4  $\kappa$  monoklonal antikörünün Faz II çalışmaları devam etmektedir [4]. Diğer yandan, hücre döngüsü G2 kontrol noktasını durdurmak kanser tedavisinde etkili bir stratejidir. Çünkü G2 kontrol noktasında durdurmak kanser hücrelerini DNA hasarına yol açan antikanser ajanlara karşı duyarlı hale getirmektedir. Ayrıca bu şekilde normal hücrelerde oluşabilecek yan etkilerin de önüne geçilebilmektedir. Bu amaçla MAPKAP-K2, C-Tak1 ve CHK1 aktivitesine karşı CPP501 peptidi üzerinde durulmaktadır [92]. Devam etmekte olan

Faz I/II çalışmalarında CBP501 ve full doz cisplatin ve pemetrexed ile kombine halde denenmektedir [4].

## 2.4. Mezotelyomada Sinyal İletimi

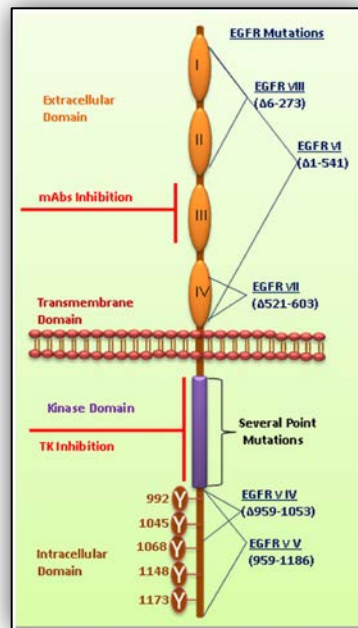
Kanser, kompleks, multifonksiyonel ve öldürücü bir hastalıktır. Son yıllarda yapılan birçok araştırmada, reseptör ve büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonunun, onkojen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunun agresif ve tedaviye dirençli kanser fenotiplerinin temel nedeni olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hücre içi sinyal yollarının fonksiyon bozukluğu da kanser gelişimi ve ilerlemesinde rol almaktadır. Bu nedenle, neoplastik dönüşüm esnasında değişen sinyal yollarının fonksiyonunu anlamak kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilebilmesi için önemli ipuçları vermektedir.

### 2.4.1. EGFR

Reseptör tirozin kinazların (RTK) ailesine ait olan Epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFRs), büyüme, farklılaşma, adezyon, göç ve sağkalım gibi sinyal yollarında görev alırlar. EGFR ve aile üyelerinin bu şekilde çok yönlü sinyal yollarında yer alması ve bu sinyal yollarında meydana gelen değişimlerin kanser gelişiminde önemli rol oynaması, EGFR ile aile üyelerini kanser terapisi için etkin bir aday yapmaktadır [Web 1, 2012], [62].

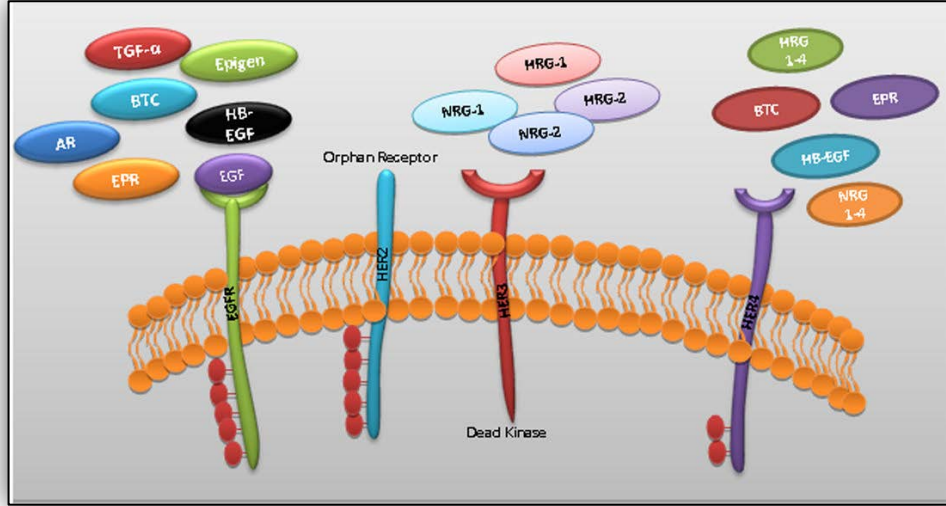
EGFR, ErbB reseptör tirozin kinaz ailesine aittir. ErbB ailesinin bilinen dört üyesi vardır. Bunlar EGFR/ErbB1/HER, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4 reseptörleridir. ErbB ailesi üyeleri, ağırlıkları 170 ile 185 KDa arasında değişen transmembran glikoproteinlerdir [94]. Yapısal olarak ErbB ailesi üyeleri (1) sisteince zengin hücre dışı N-Terminal ligand bağlanma domaini ve dimerizasyon kolu, (2) hidrofobik transmembran domain ve (3) hücre içi, iyi korunmuş, birkaç fosforilasyon bölgesi bulunduran c-Terminal tirozin kinaz domaininden oluşmaktadır. C-Terminal tirozin kinaz domaini oldukça korunmuş olmasına karşın N-Terminal ligand bağlanma domaini farklı ligandların bağlanabileceği bir yapıdadır. İlaveten EGFR'nin hücre dışında kalan bölgesi 4 domaine bölünmüştür (I, II, III and IV) (Şekil 2.1) , [91], [95], [97].

EGFR, HER3 ve HER4 reseptörlerinin kristal yapı analizleri sonucu (1) kapalı inaktif konformasyon ve (2) açık aktif konformasyon olmak üzere iki ayrı konformasyonda buldukları anlaşılmıştır. Kapalı konformasyonda domain II ve domain IV birbirleri ile etkileşim halindedir. Böylece domain I ve III'ün ligandları ile etkileşimi önlenmiş olur [69], [98]. Açık konformasyonda ise domain II ve IV birbirinden ayrılır ve böylece domain I ve II'nin ligand bağlanma domainleri açık hale geldiği için ilgili ligandlara bağlanabilirler. Son olarak domain II'de bulunan dimerizasyon kolu homodimer oluşturmak üzere başka bir reseptörün aynı dimerizasyon koluna bağlanır [91], [95]. Sağlıklı bir hücrede ligand yokluğunda kapalı konformasyon görülmektedir. Ligand bağlanması durumunda kapalı konformasyon bozulur ve açık konformasyon stabil hale gelir. Beraberinde aktif homodimerler bir araya gelerek aktif reseptör sinyali sürdürülür [70], [71]. EGFR diğer HER ailesi üyeleriyle heterodimerizasyon yapabilir. Bu yüzden EGFR homodimerizasyon ile veya diğer HER ailesi üyeleri ile heterodimerizasyon yaparak hücresel sinyal kaskadını başlatabilir. Daha önceden çeşitli ligantların spesifik olarak heterodimerizasyonu uyardığı gösterilmiştir. Örneğin EGF, EGFR ile HER2, HER3 veya HER4'ün heterodimerizasyonunu uyarabilir. Benzer şekilde NRG4, HER4 ile HER1 veya HER2 ile HER3 heterodimerizasyonunu uyarır [103]. Bu nedenle EGF reseptörünün homo ve heterodimerizasyonu kompleks sinyal kaskadlarını kolaylaştırır.



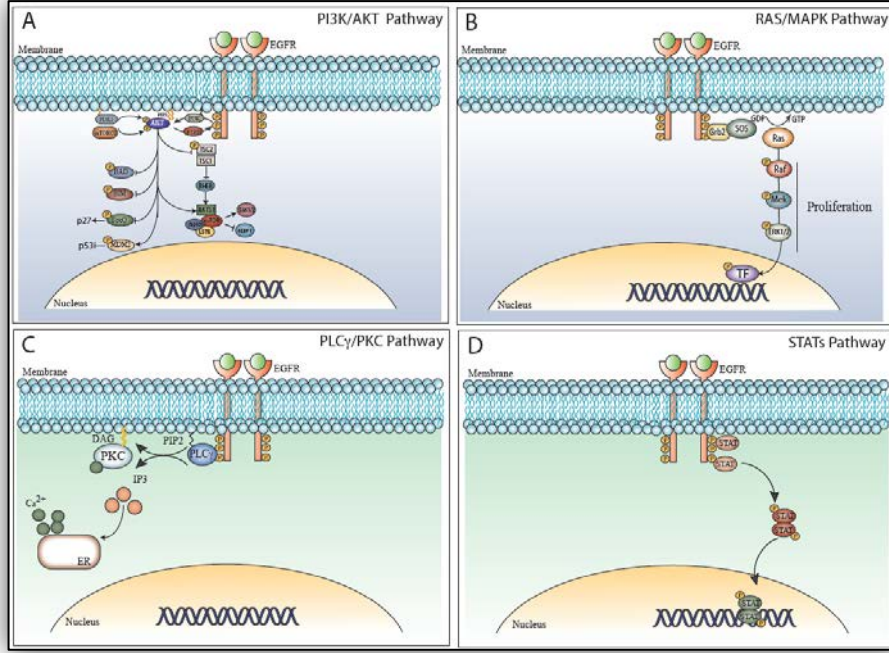
Şekil 2.1: EGFR reseptörü yapısı ve domainleri.

HER ailesi üyeleri 13 bilinen ligand ile aktive olabilirler. Bunlardan bazıları EGF, transforming büyüme faktörü alfa (TGF- $\alpha$ ), amphiregulin (AR), betacellulin (BTC), heparin bağlayan EGF-benzeri büyüme faktörü (HB-EGF), epiregulin (EPR), epigen (EPG) ve neuregulinler 1–6 (NRG)'dir [73], [103]. Bunlar arasında EGF, TGF- $\alpha$ , AR, BTC ve EPR spesifik olarak EFGR'ye bağlanmaktadır (Şekil 2.2), [97].



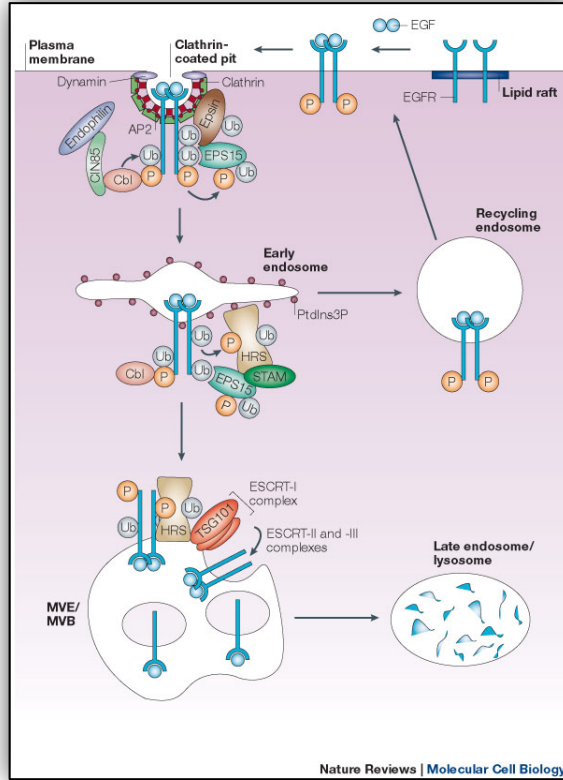
Şekil 2.2: HER ailesi üyeleri ve spesifik ligandları.

EGFR sinyalinin aktivasyonu ligand ile uyarılmış reseptör dimerizasyonu ile tetiklenir. Dimerizasyon sonrası hücre içindeki C-terminal domainleri karşılıklı olarak birbirlerini fosforiller ve efektör proteinler için bağlanma bölgeleri oluştururlar [74], [75]. Bağlanma, efektör proteinlerin taşıdığı src homoloji 2 (SH2) ve fosfotirozin bağlanma (PTB) domainleri sayesinde gerçekleşir. Efektör proteinler aktive olduktan sonra ilgili sinyal kaskadını uyarırlar. Bu yollar arasında RAS/MAPK yolağı, fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT, fosfolipaz C  $\gamma$  protein yolağı ve STAT sinyal yolağı bulunmaktadır. Bu yollar hücre proliferasyonuna, anjiyogeneze, hücre göçüne, adezyona ve sağ kalıma neden olmaktadır (Şekil 2.3), [75], [101], [103]. Malignant hücrelerde bu yollarda yer alan çeşitli genlerde mutasyonlar biriktiği için yolların yer aldığı hücresel süreçler deregüle haldedir.



Şekil 2.3: EGFR reseptörünün yer aldığı moleküler sinyal yollarını ve etkileşime girdiği moleküller.

EGFR'nin “down-regülasyonu” internalizasyon, ubiquitinasyon ve reseptör-ligand kompleksinin degradasyonu ile sağlanır [73]. Sinyal sonlandıktan sonra reseptör-ligand kompleksi (EGF-EGFR) hücre membranından internalize olarak klatrin kaplı oyuk (CCP) içerisine alınır. CCP'ler daha sonra endosit keseciklerini oluşturmak üzere membrandan ayrılır ve erken endozom (EE)'lerle kaynaşır. Böylece reseptör kompleksi EE içerisinde ayrılmış olur. EE içerisine alındıktan sonra reseptörler iki ayrı süreç geçirebilir: (1) tekrardan hücre yüzeyine lokalize olabilir veya (2) intraluminal vezikül (ILV) oluşumu başlar ve lizozomal degradasyon ile yıkımı gerçekleşir. EE içerisinde EGFR klatrin bağlı AP-2 proteini ile etkileşir [77], [138]. Fakat AP-2 ve EGFR'nin doğrudan etkileşimi EGFR'nin internalizasyonu için gerekli değildir [155]. Bu yüzden EGFR'nin plazma membran mikrodomanlarına kolaylıkla tasnif olabilmesi için başka etkileşim partnerleri gereklidir. Ayrıca EGFR kinaz aktivitesi CCP sorting mekanizması için önemlidir [79]. Bu yüzden çeşitli etkileşim partnerlerinin EGFR'nin aktif halinde bulunan modifikasyonlara (örneğin fosforile ya da ubiquitinli rezidüler) bağlanması gerekmektedir (Şekil 2.4), [81], [97].



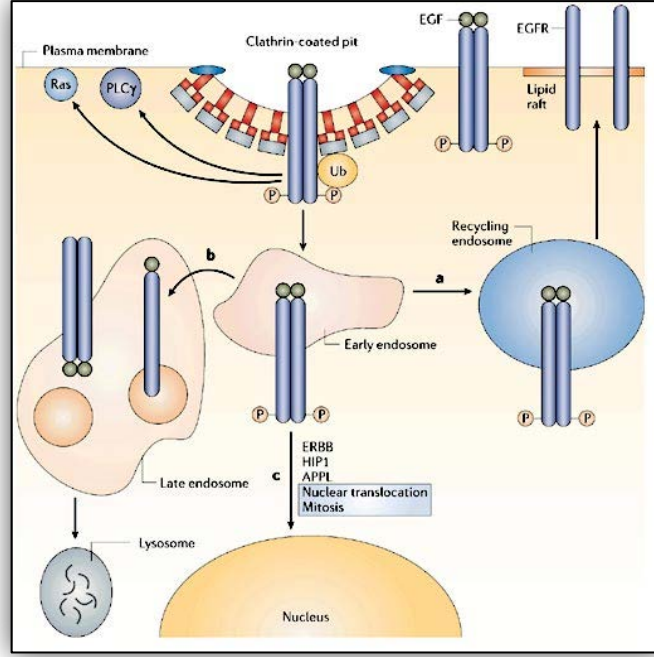
Şekil 2.4: EGFR reseptörünün internalizasyonu, ubikitinasyonu ve yeniden hücre yüzeyinde ifade edilmesi.

C-Terminal efektör bağlanma bölgeleri iki dimerize reseptörün birbirini karşılıklı fosforillemesi sonucu oluşur ve Grb2, Casitas B-nesil lenfoma proto-onkogeni (Cbl) gibi adaptör proteinler bu fosforile bölgelere bağlanarak sinyali aşağı akımdaki proteinlere iletir. Cbl, EGFR'ye mono veya poli ubikitin ekleyerek EGFR'nin ubikitinlenmesini artırır [80].

EE'deki aktif reseptör-ligand kompleksinin stabilitesi çevrenin pH'ı (zayıf asit) ile kontrol edilmektedir. Aktif homodimerler karşılıklı olarak stabildir ve Cbl bağlı haldedir. Cbl sonradan reseptör degradasyonu için lizozoma endositik sortinge neden olur. Buna karşın heterodimerler (EGFR-HER2 gibi) EE içerisinde daha az stabildir ve dimerizasyonun bozulması ile Cbl, reseptör-ligand kompleksinden ayrılır ve reseptör tekrardan hücre yüzeyine lokalize olur [82]. Ayrıca endozomal trafikte farklı EGFR ligandları farklı reseptör akıbetine neden olur. Örneğin EGF-EGFR kompleksi degradasyon ile sonuçlanırken TGF- $\alpha$  reseptör kompleksi geridönüşüm yolağını etkin kılar [83]. Ligand-reseptör kompleksinin stabilizasyonundaki farklılık ve liganda bağlı olarak degradasyon/geridönüşüm yollarının seçimi büyük oranda endozom içerisindeki düşük pH'a bağlıdır [84].

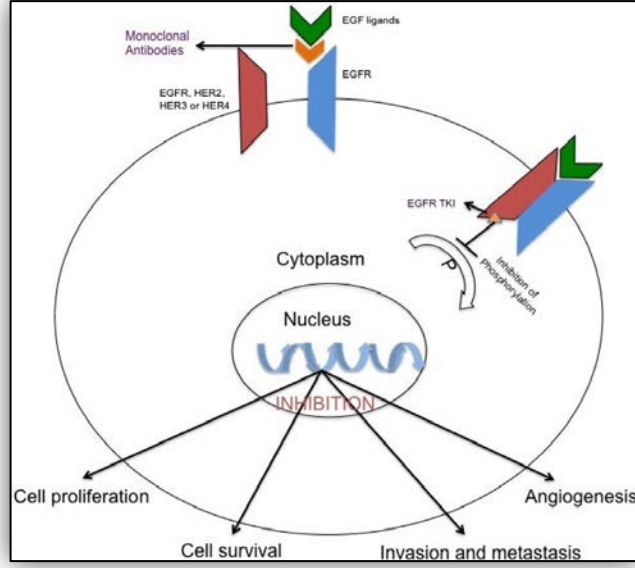
ErbB ailesi üyeleri sinyali hücre membranından başlatır ve sitoplazmik aracılardan yardımıyla çekirdeğe iletir [85]. VEGFR, FGFR ve NGFR gibi bazı reseptör tirozin kinazlar veya onların fragmentlerinin çeşitli mekanizmalar ile hücre membranında nükleusa giriş yaptığı ve nükleusta transkripsiyon faktörü olarak veya kinaz olarak rol aldığı bilinmektedir. Çeşitli organların kanser örneklerinde HER2, rat P185neu, HER3, C-Terminali kesilmiş HER4 ve EGFR reseptörleri çekirdekte tespit edilmiştir [89], [136], [137], [142], [188]. Bazı kanıtlar reseptör internalizasyonunun nükleer translokasyon için ilk adım olduğunu öne sürmektedir (Şekil 2.5), [96], [102], [137]. EGFR ve HER3 nükleusa bütünüyle transloke olan ErbB üyeleridir. HER ailesi üyelerinin nükleusa transloke olabilmeleri nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) bulundurmalarına bağlanmaktadır (HER3,4'ün C-Terminal bölgesinde ve EGFR'nin varsayılan "juxtamembrane" bölgesinde).

Son zamanlarda yayınlanan raporlarda, EGFR reseptörlerinin DNA bağlanma bölgesi içermediği görülmektedir. Bu nedenle EGFR reseptörlerinin nükleusa girmesi sonucu DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girdiği farzedilmektedir (Örneğin STAT3, STAT5A, E2F1, DNA-PK ve PCNA) [99], [133]. Ayrıca EGFR'nin nükleusa girişi ile AT'ce zengin dizilere bağlanarak gen ekspresyonunu düzenlediği öngörülmektedir [85], [93]. Bunun yanında RNA helikaz A (RHA)'nın EGFR'nin DNA bağlanma partneri olduğu ve kanser hücrelerinin nükleusunda hedef genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesinde görev aldığı belirtilmektedir [100].



Şekil 2.5: EGFR reseptörünün nükleer lokalizasyonunun moleküler mekanizması.

EGFR MPM dahil birçok insan malignansisinde aşırı eksprese olmaktadır ve hastaların prognozu ile ilişki göstermektedir [105], [183]. Son zamanlarda prelinik çalışmalarda ve hayvan deneylerinde olumlu sonuçların alındığı EGFR monoklonal antikorları (cetuximab) ve tirozin kinaz inhibitörleri (gefitinib, erlotinib) geliştirilmiştir (Şekil 2.6), [106], [118]. EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (TKIs) (gefitinib ve PD153035) ile mezotelyoma hücre hatları muamele edilmiş ve önemli ölçüde büyümenin inhibe edildiği görülmüştür [107], [108], [109]. Akciğer kanserinde EGFR'ın tirozin kinaz domaininde bulunan somatik mutasyonların TKI hassaslığı ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Daha önceki çalışmalar göstermiştir ki EGFR mutasyonları EGF cevabına karşı TK aktivitesini ve TKI'ya karşı duyarlılığı arttırmaktadır. [110], [111].



Şekil 2.6: EGFR için geliştirilen monoklonal antikorlar ve tirozin kinaz inhibitörleri.

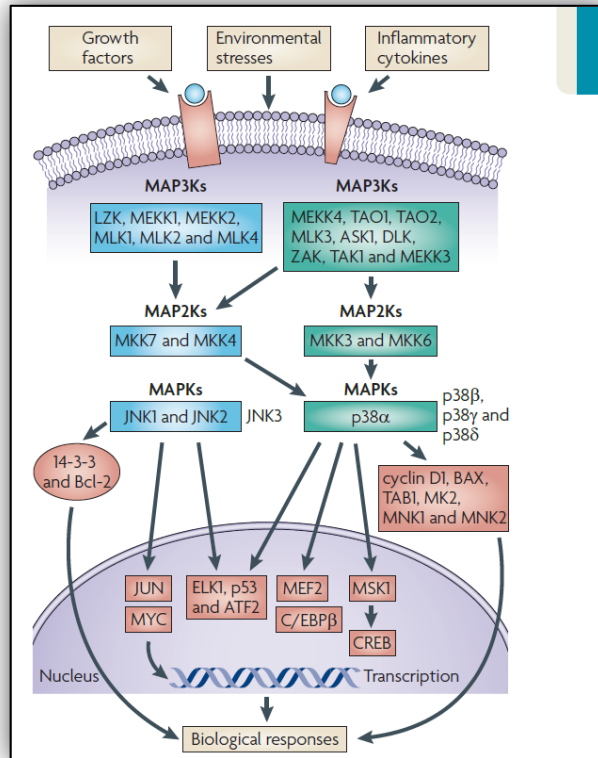
Protein düzeyinde yapılan çalışmalarda EGFR, neoplastik olmayan/reaktif plevral mezotelyum hücrelerde ve MPM'nin önemli bir yüzdesinde immünreaktivite göstermiştir [112], [113], [114], [115], [116]. Fakat EGFR aşırı ekspresyonu MPM hastalarının sağkalımı için bağımsız bir prognostik faktör olarak görülmemektedir [113], [114]. Yapılan son çalışmalarla, EGFR'nin MPM hastalığının biyolojisi ve agresifliğinde önemli rol oynuyor olabileceği önerilmiştir [117].

#### 2.4.2. MAPK Yolağı

Mitojen-aktif protein tirozin kinazlar (MAPKs) hücre dışı sinyali hücre içi cevaba dönüştüren, evrimsel açıdan oldukça korunmuş önemli sinyalizasyon bileşenleridir. ERK1 ve ERK2 MAPK'ler mitojenle aktive olur ve insan tümörlerinde upregüle halde bulunurlar. Bu durum kanser tedavisi için bu yolağı inhibe eden ajanların geliştirilmesi fikrini ortaya çıkarmıştır [157]. Diğer iki önemli MAPK yolağı jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 MAPK yolaklarıdır. Bu yolaklar çevresel ve genetik stres karşısında aktive olan protein kinaz yolakları olarak da bilinmektedir. Ayrıca her iki yolağın spesifik hücre tipleri proliferasyonunu, farklılaşmasını, sağkalımını ve migrasyonunu da kontrol ettiği belirtilmiştir [134], [135], [187]. MAPK üyelerinin aktivasyonları korunmuş Thr-X-Thr motifinden çiftli fosforilasyonla olmaktadır ve MAP2K kinaz tarafından katalizlenir (Şekil 2.7), [139]. Aktivasyon sonrasında MAPK'ler diğer protein kinazları ve transkripsiyon

faktörlerini de içeren hedef proteinlerin serin ve treonin rezidülerini fosforiller. MAPK'lerin deaktivasyonu fosfatazlar ve üç önemli memeli MAPK yolağına özgü iskele proteinleri tarafından düzenlenmektedir [140], [181], [182].

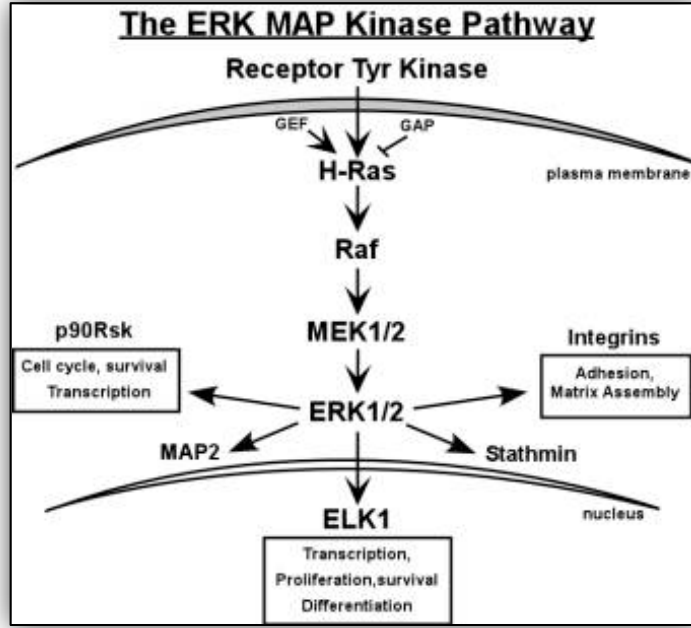
JNK ve p38'in kanser gelişimindeki rolü karmaşıktır. Çok sayıda hücrel yanıtın düzenlenmesinde rol almaktadır. Bazı sağlıklı hücreler bu yolakları hücre proliferasyonunu ve morfolojik transformasyonu antagonize etmekte kullanırlar. Oysa kanser hücreleri proliferasyonu, sağkalımı ve migrasyonu kolaylaştırmak için bu yolakları yıkabilmektedir [139]. JNK ve p38 MAPK ailesi üyelerinin ve izoformlarının (hem onkojenler hem tümör baskılayıcılar) nasıl çalıştığı net olarak bilinmemektedir. Dahası bu sinyal yolakları arasındaki çapraz etkileşim ve fizyolojik implikasyonlar çok az anlaşılabilmiştir. JNK ve p38 MAPK yolaklarının nasıl, nerede ve ne zaman hedefleneceğinin anlaşılması kanser tedavisinde etkili bir strateji geliştirilebilmesi açısından oldukça önemlidir.



Şekil 2.7: JNK ve p38 MAPK yolağı moleküler mekanizması.

### 2.4.2.1. ERK

ERK, yaralanma, sağkalım, farklılaşma, hücre iskeleti dinamiği ve onkojen ve büyüme faktörü cevabı gibi temel birtakım hücre süreçlerinde yer almaktadır (Şekil 2.8), [Web 1, 2012], [120], [121]. ERK ailesi en az 8 üyeden oluşur ve ERK1 ve ERK2 memelilerde en yaygın görülen aile üyeleridir. Yapılan birçok çalışmada ERK1 ve ERK2'nin üst yolakta bulunan mitojen-aktive protein kinaz kinaz (MEK 1/2) ve substrat çeşitliliği için yarış halinde oldukları öngörülmüştür [122]. ERK1/2 fosforilasyonu (aktivasyonu)'nun artışı malignan mezotelyomada [123] ve çeşitli kanser türlerinde görülmektedir. Kemirgen mezotelyal hücreleri *in vitro* olarak kanserojen asbest fiberlerine maruz bırakıldıktan sonra ERK1/2 aktivasyonunun devamlı olarak arttığı fakat kimyasal olarak benzer, patojenik olmayan partiküllere maruz bırakıldıktan sonra ERK aktivitesinde bir değişim olmadığı görülmüştür [124]. ERK1/2 fosforilasyonu ayrıca fibrogenezin mürin modellerinde krisotil asbest fiberlerinin solunması sonucu da gerçekleşmektedir [125]. Bu ve benzeri yapılan çalışmalar [126], ERK1/2 aktivasyonu asbest ile uyarılmış inflamasyonun gelişimi ile ilişkili olabildiğini düşündürmüştür. Bazı tümör tiplerinde ERK aktivasyonu potensiyel sağkalım yolağı olarak tanımlanmıştır. Ayrıca son zamanda yapılan çalışmalarda, ERK'lerin kemoterapik ilaç kullanımı sonucu [127] veya mTOR inhibitörlerinin kullanımı [128] sonucu aktive olabileceği öngörülmektedir. ERK1 ve ERK2 hücre döngüsü tutuklanmasında [129] ve replikasyonda [130], [131] her ne kadar farklı fonksiyonlara sahip olsa da MM gelişiminde kritik rol oynamaktadırlar. Hem ERK1 hem ERK2 MM hücrelerinin proliferasyonuna katkı yapmaktadır [132]. Fakat ERK2, soft agarda MM hücrelerinin artmış migrasyon, invazyon ve otonom büyümesinde tek başına görevlidir. Bu hücre hatları ile yapılan microarray ve qRTPCR çalışmalarında ERK2 inhibisyonunun proliferasyon, sağkalım ve anjiyogenez ile ilişkili genlerin mRNA seviyelerindeki azalmayla bağlantılı olduğu, bunun yanında apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonunda artışından sorumlu olduğu öngörülmektedir. SCID fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ERK'in MM proliferasyonu için önemli olduğu görülmüştür. Burdan yola çıkarak araştırmacılar ERK1/2'nin MM veya asbest ile ilişkili diğer hastalıkların tedavisinde targeted terapi için uygun bir hedef olabileceğini belirtmektedir [132].



Şekil 2.8: ERK MAPK sinyal yolağı moleküler mekanizması.

#### 2.4.2.2. JNK

JNK proteinleri, JNK1'i kodlayan MAPK8, JNK2'yi kodlayan MAPK9'u ve JNK3'ü kodlayan MAPK10 genleri ile en az on splice izoformu kullanan üç gen tarafından kodlanmaktadır [143]. JNK1 ve JNK2 hemen her hücrede eksprese edilmektedir. JNK3 ise temel olarak beyinde bulunmaktadır [30], [144]. JNK'ler MKK4 ve MKK7 kinazlara aktive edilebilmektedir (Şekil 3.7), [139]. JNK'lerin başlıca substratı, Fos ve Jun aile üyelerinden oluşan AP1 transkripsiyon faktörüdür [146]. JNK'ler hem onkojenik hem tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren moleküllerdir. JNK'lerin onkojenik aktivitesi temelde Jun'u fosforilleyerek AP1'i aktive etmesindedir. Tümör baskılama özellikleri ise pro-apoptotik aktiviteleri ile ilgilidir. JNK/Jun yolağı AP1 bağlanma bölgesi içeren genleri hedef almaktadır. Bu genler arasında; hücre döngüsü kontrol genleri, sağkalım ve apoptoz genleri, metaloproteinaz ve nükleer hormon reseptör genleri bulunmaktadır [147]. Bunun yanında sinyal yoğunluğu ve farklı JNK izoformları arasındaki crosstalk gibi faktörler, JNK aktivitesinin tümör gelişimi üzerindeki etkisi için önemlidir [136], [30], [186].

İnsan tümörlerinde yapılan sekans analizleri sonucu JNK1, JNK2 ve kinaz MKK7'yi aktive eden JNK yolağında somatik mutasyonlar bulunmuştur [148], [149].

Bir çok insan kanserinde JNK onkojenik veya tümör baskılayıcı özellik sergileyebilmektedir. Örneğin insan hepatoselüler kanserinde (HCC) JNK, onkojenik aktivite göstermektedir. JNK'nin kinaz aktivitesinin artması ile tümör artışı bağlantılıdır (Tablo 2.1), [139], [150]. Dahası sürekli JNK aktivitesi HCC'lerde histon H3 metilasyonundaki değişim ile ilişkilidir [151]. Fakat ilginç bir şekilde JNK3 fonksiyon kaybı mutasyonları tümör oluşumunu arttırmaktadır. Örneğin 19 insan beyin tümörünün 10'unda JNK3 kodlayan MAPK10 geninde mutasyon gözlenmiştir [152].

Tümör baskılayıcı olan PTEN genindeki mutasyonlar, insan kanserlerindeki tümör baskılayıcı gen mutasyonları arasında ikinci sırada gelmektedir. Çeşitli insan kanser hücre hatlarında PTEN kaybı AKT aktivasyonuna ve JNK aktivitesinde artışa neden olmaktadır [153]. PTEN eksikliği hücreleri JNK inhibisyonuna karşı hassaslaştırmakta ve bu yüzden JNK'ler hem PTEN-PI3K yolağının önemli bir bileşeni hem de potansiyel bir terapötik ajan olarak görülmektedir.

Tablo 2.1: Çeşitli kanser türlerindeki JNK ve p38 MAPK ekspresyon profilleri.

Human Cancer:	MAPK implication:
Liver cancer (hepatocellular carcinoma)	JNK1 highly activated p38 $\alpha$ activity downregulated
Brain tumors	JNK3 loss-of-functions
Prostate cancer	JNK1 upregulated
Lymphoma, glioma, lung, thyroid, breast, head and neck squamous cell carcinomas	p38 $\alpha$ activity upregulated

### 2.4.2.3. P38

P38 MAPK'leri kodlayan dört gen bulunmaktadır: p38 $\alpha$  kodlayan MAPK14, p38 $\beta$  kodlayan MAPK11, p38 $\gamma$  kodlayan MAPK12, p38 $\delta$  kodlayan MAPK13. Ayrıca MAPK14'ün iki alternatif splice formu bulunmaktadır [154], [185]. p38 $\alpha$  ve p38 $\beta$  yakından ilişkili proteinlerdir ve ortak fonksiyonlara sahiplerdir. Buna karşın p38 $\alpha$  birçok hücre tipinde yaygın olarak bulunurken p38 $\beta$  çok düşük seviyede

eksprese edilmektedir ve p38 MAPK yolağındaki rolü pek bilinmemektedir. p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$  sınırlı ekspresyon paternine sahiptir ve muhtemelen özelleşmiş fonksiyon göstermektedirler. Bütün bunların yanında p38 MAPK'ler üzerinde yayınlanan yayınların çoğu p38 $\alpha$  üzerinedir [156], [194].

p38 MAPK'ler MKK3, MKK6 ve bazen MKK4 tarafından aktive edilirler (Şekil 2.7), [139]. Bunun dışında otofosforilasyon p38 aktivitesine katkı yapabilmektedir [158], [194]. p38 MAPK aracılıklı fosforilasyon tarafından düzenlenen başlıca iki protein grubu; transkripsiyon faktörleri (p53, ATF2, ELK1, MEF2 ve C/EBP $\beta$ ) ve protein kinazlar ( MAPK2, MSK1, MNK1 ve MNK2)'dir (Şekil 2.7), [139], [154], [185]. p38 $\alpha$ 'nın tümör baskılayıcı fonksiyonuna dair birçok kanıt bulunmaktadır ve bu fonksiyon büyük oranda hücre döngüsünün negatif düzenlenmesi ve apoptozun uyarılması üzerinedir [158], [159], [160]. Fakat p38 $\alpha$  'nın aynı zamanda invazyon, inflamasyon ve anjiyogenez gibi kanser süreçlerinde kilit rol oynayan onkojenik aktiviteye sahip olabileceği de düşünülmektedir [139].

Yapılan sekans analizleri sonucu az sayıda insan tümöründe p38 MAPK yolağında somatik mutasyon görülmüştür [152], fakat bulunan mutasyonların önemi henüz araştırılmaktadır. İlginç bir şekilde, HCC gibi bazı insan tümörlerinde P38 MAPK ve MKK6 aktivitesi tümörigenik dokulardakinden daha düşük seviyededir (Tablo2.1), [139], [162]. Artmış seviyedeki p38 $\alpha$  çeşitli kanserlerde malignansi ile ilişkilendirilmektedir (Tablo 2.1), [139]. Yapılan bu gözlemler p38 MAPK yolağındaki mutasyonların kanser hücrelerinde avantaj sağladığı fikri ile tutarlılık göstermektedir.

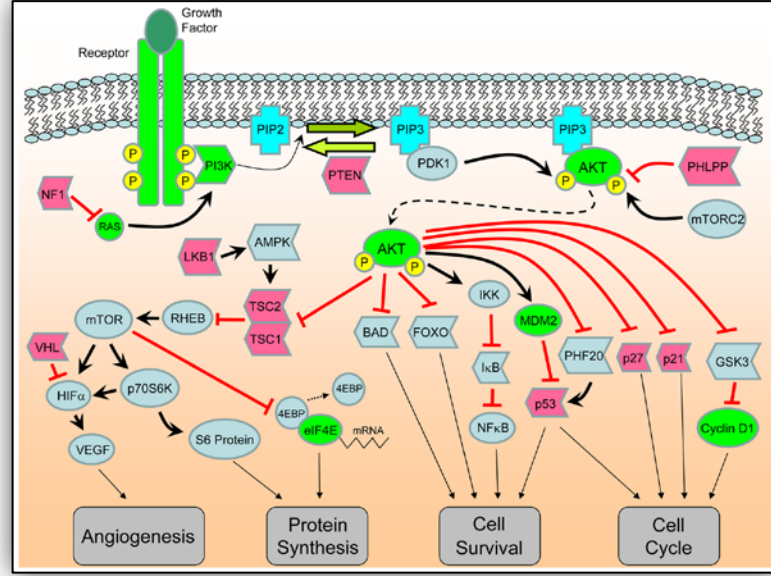
Özet olarak ERK, JNK ve p38 MAPK yolaklarının aktivitesi (onkojenik veya tümör baskılayıcı) hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. Bu nedenle bu yolakların hedef alınmasına yönelik tedavi çalışmaları hücre tipi göz önüne alınarak yapılmalıdır. Ayrıca hücre içeriği ve tümörün hangi aşamada olduğu da hedeflenmiş terapide dikkate alınması gereken parametreler arasında yer almaktadır.

#### **2.4.2.4. AKT**

AKT ailesi serin/treonin kinaz görevi yapan ara sinyalizasyon molekülleridir. AKT ailesi üyeleri hücre sağkalımı, proliferasyonu, invazyonunda ve glukoz metabolizması ve anjiyogenezde rol alırlar. Literatürde AKT'nin solid tümörlerde ve

lösemilerde aşırı aktivite gösterdiği üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır [164]. Ayrıca fareler üzerinde yapılan genetiksel denemelerde AKT'nin tek başına veya diğer genetik değişimlerle birlikte tümör gelişiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir [165], [166]. AKT sinyalizasyon yolağı tümör gelişiminde, hastalığın agresifliğinde ve ilaç direncinde önemli olduğu için, bu yolağı hedef alan bileşiklerin geliştirilmesi sonraki yıllarda önemli bir odak noktası olacaktır. AKT bilindiğı üzere sinyal yolağında merkezde bulunan bir moleküldür. Üst yolağında PI3K ve PTEN, alt yolağında ise TSC2, FOXO ve eIF4E molekülleri görev yapmaktadır (Şekil 2.9), [167]. Bu moleküllerden bazıları onkojenik aktivite gösterirken (AKT, PI3K p110 $\alpha$ katalitik alt ünitesi ve eIF4E) bazıları tümör baskılayıcı aktivite göstermektedir (PTEN, FOXO, LKB1, TSC1/2, NF1 ve VHL). Aktif AKT kanserde iyi yapılanmış bir sağkalım faktörüdür. AKT apoptozu düzenleyen bazı proteinleri fosforilleyerek aktivite göstermektedir. Örneğin AKT, proapoptotik protein olan BAD'ı ve prokaspaz 9'u fosforilleyerek inaktive eder [168]. Dahası AKT, FOXO transkripsiyon faktörünün fosforilleyerek inaktive eder ve böylece FOXO'nun proapoptotik genlerin ekspresyonunu aktive etmesini engellemiş olur. AKT ayrıca NF- $\kappa$ B negatif düzenleyicisi olan I $\kappa$ B kinaz (IKK)'ı aktive ederek antiapoptotik genlerin transkripsiyonunu indükleyebilmektedir [169]. Bunun yanında AKT, p53 negatif düzenleyicisi olan Mdm2'yi fosforilleyerek nükleusa translokasyonuna ve böylece p53'degradasyonuna neden olur [170], [171]. Alternatif olarak AKT, PHF20/TZP transkripsiyon faktörünü fosforilleyerek p53 mRNA'sının negatif regülasyonuna sebep olur. Fosforillenen PHF20/TZP transkripsiyon faktörü çekirdekten sitoplazmaya geçer ve böylece p53 geninin trans aktivasyonu azalır [172].

AKT siklin D1 fosforilasyonundan ve devamında degradasyonundan sorumlu olan glikojen sentaz kinaz 3'ü inhibe ederek hücre döngüsü sürecinde pozitif düzenleyici olarak rol almaktadır. Ayrıca AKT hücre döngüsü inhibitörleri olan p21 ve p27 proteinlerini fosforilleyerek stoplazmada tutulmalarına neden olur. Sitoplazmada tutuklanan p21 ve p27 proteinleri siklin D1/CDK kompleksine bağlanamadığı için kompleksin inhibisyonu da gerçekleşmemektedir [164], [173].



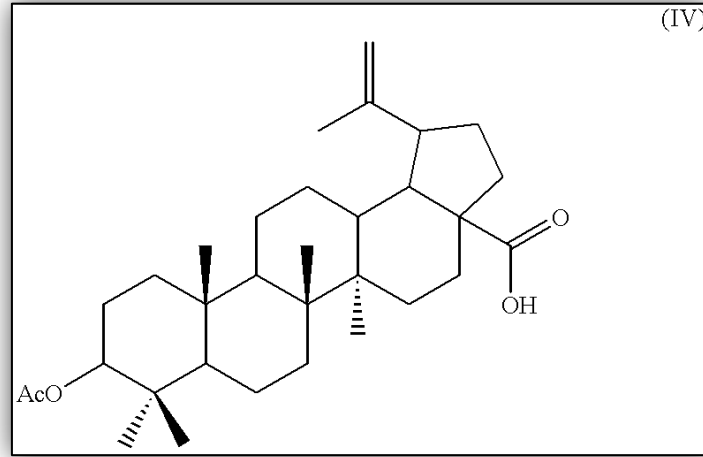
Şekil 2.9: AKT sinyal yolağı moleküler mekanizması.

Reseptör tirozin kinazların aktivasyonu (EGFR), MAPK yolağının ve AKT sinyalizasyonunun kaskadının deregülasyonu birçok MM hücresinde görülmüştür [174]. Tirozin kinaz inhibitörleri kullanılarak yapılan moleküler analizlerde özellikle EGFR aracılıklı AKT fosforilasyonunun inhibe edildiği görülmüştür [175], [176]. Başka bir çalışmada serumsuz besiyerinde bırakılan 21 MM hücresi incelenmiş ve 13 (%62)'ünde AKT aktivitesi gözlenmiştir [177]. Ayrıca PI3K inhibisyonu sonucu MM hücrelerinde, hücre döngüsünü tutuklandığı ve proliferasyonun baskılandığı gözlenmiştir [178]. Elde edilen bütün bu sonuçlar AKT'nin MM hücrelerinde sıklıkla aktive edildiğini göstermektedir. Bu nedenle AKT sinyalizasyon yolağı MM tedavisinde potansiyel hedefler arasında yer almaktadır.

### 3. BETULİNİK ASİT

Doğal ürünler organik moleküllerdir ve yüksek yapılı bitkiler, mantarlar, mikroblar, denizel canlılar ve hayvanlar gibi yaşayan dokulardan elde edilirler. Bu moleküller oldukça geniş kimyasal çeşitlilik ve biyolojik özellik gösterir ve uzun zaman süresince hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla doğal ürünlerin moleküler etki mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Doğal olarak bulunan bileşikler yeni ilaçların bulunması ve geliştirilmesinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Son yıllarda geliştirilen antikanser ve antienfeksiyöz ilaçların çoğunluğu doğal ürünlerden elde edilmiştir [179].

Betulinik asit (BA) doğal olarak bulunan ve antitümör aktivite gösteren pentasiklik triterpendir (Şekil 3.1), [180], [202]. BA (3 $\beta$ , hidroksi-lup-20(29)-en-28-oik asit), dünya genelinde bitkiler aleminde oldukça yaygın bulunmaktadır [202]. BA'nın indirgenmiş türü olan betulin (3  $\beta$  -lup-20(29)-en 3,28-diol), 1788 yılında bitkilerden izole edilen ilk doğal üründür. Ayrıca BA içerdiği bilinen beyaz huş ağacı kabuğu, *Betula alba*, geçmişte Amerikan yerlileri tarafından ilaç olarak kullanılmıştır



Şekil 3.1: Betulinik asitin kimyasal yapısı.

Son yıllarda BA'nın antitümör sitotoksitesi kanser hücre hatlarında, birincil tümör örneklerinde ve zenograf fare modellerinde geniş çapta araştırılmaktadır (Tablo 3.1), [203]. Yapılan ilk çalışmalarda BA'nın spesifik olarak melanoma hücre hatlarına sitotoksite gösterdiği görülmüştür [5]. Sonraki çalışmalar BA'nın nöroektodermal tümörleri (nöroblastoma, glioblastoma, medulloblastoma, Ewing

tümör) ve diğer malignansileri (lösemi, meme kanseri, kolon kanseri gibi) içeren farklı tipteki insan kanserlerine karşı da antikanser aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur [184], [185], [186], [187]. BA sadece belirlenmiş kanser hücre hatlarına karşı değil, aynı zamanda farklı orjinlerden izole edilmiş birincil kanser hücrelerine karşı da sitotoksikite göstermektedir [184], [185], [186], [187]. Dahası BA, birincil ya da sonradan kazanılmış direnç gösteren bazı tümör örneklerinde de hücre ölümüne neden olmaktadır [184], [185]. Örneğin nöroblastoma hücreleri CD95- ve doxorubicin aracılıklı apoptoza dirençlidir fakat BA uygulamasına karşı duyarlılık göstermektedir [185]. Birincil çocukluk akut lenfoma örnekleri ve nüksetmiş tümörlerde yapılan *in vitro* etkinlik karşılaştırmasında BA, ticari olarak kullanılan ilaçların on tanesinin dokuzundan daha fazla etkinlik göstermiştir [184]. Bu durum BA ve ticari ilaçlar arasında çapraz direnç olmadığını göstermektedir. Bu nedenle bazı ilaca dirençli kanser hücreleri BA uygulamasına karşı duyarlılık göstermektedir. Dahası BA'nın, metastatik melanoma hücrelerine metastatik olmayanlardan daha fazla sitotoksikite gösterdiği belirtilmektedir [7]. Bunun yanında transforme olmayan hücreler BA sitotoksikitesine karşı kanser hücrelerinden daha dirençlidir [186], [187], [189], [190]. Fakat neoplastik hücrelerin BA'ya karşı daha duyarlı olmasının moleküler mekanizması henüz aydınlatılmış değildir.

Tablo 3.1: BA'nın çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan çalışmalardaki kullanılan konsantrasyon miktarı.

Cancer type	ED50 ( $\mu\text{g/ml}$ )
melanoma	1.1-4.8
neuroblastoma	2-10
medulloblastoma	3-15
glioblastoma	5-16
head & neck cancer	8
ovarian carcinoma	1.8-4.5
cervix carcinoma	1.8
lung carcinoma	1.5-4.2
leukemia	2-15

BA'nın çeşitli kanser hücreleri üzerindeki *in vitro* antikanser aktivitesinin yanında hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda da tümör gelişimini baskıladığı tespit edilmiştir. Nude farelerle yapılan bir çalışmada BA, farenin karın içine enjekte edilmiş ve tümör kitlesinde önemli azalma gözlenmiştir [5]. Benzer olarak zenograft fare modelinde ovaryum kanserine BA uygulaması sonucu farelerin yaşam sürelerinde artma gözlenmiştir [189].

BA, vincristin gibi başka bir kemoterapik ajanla birlikte uygulandığında da *in vivo* sitotoksik aktivite sergilemiştir . Metastatik melanoma kanserinde yapılan *in vivo* bir çalışmada vincristin uygulanmış farelere BA verildiğinde melanoma hücrelerinin akciğer metastazında, tek başına vincristin uygulanmış farelere kıyasla daha hızlı baskılanma görülmüştür [180]. Bu sonuçtan anlaşılmaktadır ki BA, metastatik melanoma hücreleri üzerinde vincristinin kemoterapik etkisini arttıran tamamlayıcı bir özelliğe sahiptir. Buna ilaveten BA uygulanmış farelerde sistemik sitotoksisite ve kilo kaybı görülmemiştir [5], [189]. Melanoma zenograft fare modellerinde yapılan farmakokinetik çalışmalar, BA'nın tümör içerisine yüksek konsantrasyonlarda absorbe olabildiğini ve dağıldığını göstermiştir [191], [192].

BA'nın antikanser ajan olarak özellikle radyoterapi ve ticari kemoterapiklerle birlikte kullanımı gelecek vaadeden etkin bir yöntemdir. Ayrıca BA, ilaca dirençli tümörlerde direncin bypass edilmesi için tek başına veya kombine halde kullanım için uygundur. Bunlara ilaveten BA neoplastik hücrelere karşı seçici sitotoksisite gösterdiği için insan kanserlerinin klinik uygulamalarında kullanılabilir umut vaadedici bir ajandır.

## **4. MATERİYAL ve METOD**

### **4.1. MATERİYAL**

#### **4.1.1. Kimyasal Maddeler**

BA (Sigma, B8936), Fetal Bovine Serum (Lonza, DE14-802F; HyClone, SV30180.03), 10X Tyrpsin (Lonza, BE17-160E), Penicillin-Streptomycin (HyClone, SV30010), Yağsız süt tozu (%5), Agarose (Sigma, A9539), Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (Intron, 21141), ECL (Thermo Scientific 32106; Thermo Scientific Plus, 32132), RT-PCR (Qiagen RNeasy Mini Kit, 74104), DEPC (AppliChem A0881,0100), RNaseZAP (Sigma R2020), DMSO (Sigma D5879), RPMI 1640 (Sigma Aldrich R6504), Page Ruler Prestained (Thermo Scientific 26616), Akrilamit/bisakrilamit (MP BIAC3752, %40; Medium 199 (Sigma Aldrich M5017), BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227), EGF (Epidermal Growth Factor Receptor), EGFR (Cell Signaling 4267), P-EGFR (Cell Signaling 3777), ERK1/2 (Santa Cruz sc-94), P-ERK (Santa Cruz sc7383), p38 (Cell Signaling 9212), p-p38 (Cell Signaling 4511), JNK (Santa Cruz sc-7345), P-JNK( Cell Signaling 4668), AKT (Cell Signaling 4891), P-AKT (Cell Signaling 4060) ve  $\beta$  Aktin (Santa Cruz sc47778) antikorları, anti-rabbit (Cell Signaling 7075) ve anti mouse antikorları (Santa Cruz sc2005).

#### **4.1.2. Cihaz ve Diğer Malzemeler**

CO<sub>2</sub> inkübatörü (ThermoForma), Laminar Akım Kabini (Hera Safe), Su banyosu (Memmert), Plate Reader (Varioskan Flash), Işık Mikroskobu (Nikon TMS), Floresans Mikroskobu (Nikon, Eclipse Ti-S), Dikey Elektroferez ve Transfer Sistemi (BioRad Mini Protean), Soğutmalı Mikrosantrifüj (Beckman Coulter 22R), Mikrosantrifüj, (Eppendorf Mini Spin), Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22, Eppendorf Centrifuge 5810R), Sıcaklık İnkübatörlü Çalkalayıcı (BioSan, ES-20), Gerçek Zamanlı Termal Döngü Cihazı (Roche, LC480II), -80°C Dondurucu (Symphony), Jel Görüntüleme Sistemi (BioRad, ChemiDoc XRS+), Sıvı Azot Tankı

(Arpege 140), Otoklav (Hirayama, HVE-50), Orbital Shaker (IKA, Yellow line), Nano Drop (BioSpec- nano).

### 4.1.3. Kullanılan Solüsyonlar

M199; 500ml besiyeri için M5017 Sigma besiyerinden 4.75 gr tartılır 50 ml suda çözülür, 0.62 gr NaHCO<sub>3</sub> 50 ml suda çözünür , 100 ml'lik karışım 0,22 µM'lık filtreden geçirilir. Karışım otoklavlanmış 333 ml distile suya eklenir, 5 ml pen/strep, 50 ml FBS, 10 ml HEPES (20 mM), 2 ml L-glutathione (0,75 mM), EGF (10µl, 3.3nM), Hidrokortizon (1445 µl, 400nM), insülin (250 µl, 870nM) eklenerek besi yerinin pH'ı 7.2-7.4 arasında olacak şekilde ayarlanır.

RPMI; R6504 Sigma besiyerinden 5.2 g tartılır 50 ml suda çözülür, 1g NaHCO<sub>3</sub> 50 ml suda çözülür, her iki karışım 0,22 uM'lık filtreden geçirilir ve otoklavlanmış 345 ml distile suya eklenir. 5 ml pen/strep ve 50 ml FBS eklenerek besi yerinin pH'ı 7.2-7.4 arasında olacak şekilde ayarlanır.

EGF; (Sigma, E 9644) asetik asit ile çözülür. 0,2 mg (toz) stok EGF'e 0,2 ml (10mM ) asetik asit karıştırılarak 1 mg/ml EGF stok hazırlanır. Deneylerde kullanılan EGF serumsuz besiyeriyle 100 µM olacak şekilde seyreltilir.

10X PBS; 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> son hacim 1 L olacak şekilde distile su içerisinde çözülür ve 0,22 µM'lık filtreden geçirilir. pH 7.4'e ayarlanır. Hücre kültürü çalışmalarında 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek 1X PBS olarak kullanılır.

1X Tripsin; Ticari olarak elde edilen 10X Tripsin, steril 1X Pack Saline ile 1:10 oranında seyreltilerek (1X ) hücre pasajlamada kullanılır.

1X Puck's Saline A: 6 g NaCl, 0.4 g KCl, 10 g Glukoz (D- Glukoz), 0.0005 g Fenol Red, 0.35 g NaHCO<sub>2</sub> ya da NaHCO<sub>3</sub> 100 ml suyun içinde çözülüp 0,22 µM'lık filtreden geçirilir. pH 7.2'ye ayarlanır. Sonrasında 1 lt'ye steril dH<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

Hücre Dondurma/Stok Medyumu; FBS'e %5 (v/v) olacak şekilde DMSO eklenip -20°C'de muhafaza edilir.

10X SDS-Yürütme Tamponu; 30.3 g Tris Base, 144.1 g Glisin ve 10 g SDS tartılarak toplam hacim 1 L olacak şekilde distile su (dH<sub>2</sub>O) içerisinde çözülür ve SDS-PAGE için kullanılacağı zaman distile su ile 1:10 seyreltilerek (1X) kullanılır.

10X Transfer Tamponu; 30.3 g Tris Base, 144.1 g Glisin tartılarak distile su ile 1 L total hacim içerisinde çözülür.

1X Transfer Tamponu; Hazırlanacak toplam hacmin %10'u 10X Transfer tamponu, %20'si metanol içerecek şekilde solüsyonlar mezür ile ölçülür ve hacmin geri kalanı dH<sub>2</sub>O ile tamamlanır. (1 L 1X Transfer Tamponu için; 100 ml 10X Transfer Tamponu + 200 ml metanol + 700 ml dH<sub>2</sub>O).

4X SDS Yükleme (Laemmlı) Boyası; 0,134 ml Tris-HCl (0,2 M pH 6.8), 0.8 g SDS (%40 SDS'ten 0,4 ml), %40 Gliserol (0,8 ml %100), %0.4 (w/v) Bromophenol Blue (%3 'lükten 0,267 ml), %20 β-Mercaptoethanol(%100'lükten 0,4 ml), toplam hacim 2 ml olacak şekilde dH<sub>2</sub>O eklenerek falkon tüpte birbirlerine iyice karışması sağlanır. Karışım homojen hale getirildikten sonra alüminyum folyo ile sarılarak -20°C'de muhafaza edilir.

10X TBS; 0,5 M Tris-HCl (250 ml %100 Tris-HCl'den, pH 7.4), 1,5 M NaCl (187,5 ml ,4 M NaCl'den ) yaklaşık 800-900 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülür ve HCl ile pH aralığı 7.4-7.6'ya ayarlanarak final hacim 1 litreye tamamlanır.

1X TBS-T; 10X TBS tamponu distile su ile 1:10 oranında sulandırılarak 1X TBS hazırlanır. Elde edilen 1X TBS içerisine ise %0.1 (v/v) olacak şekilde Tween 20 eklenir.

Membran Bloklama Solüsyonu; %5 (w/v) olacak şekilde yağsız süt tozu tartılarak 1X TBS-T içerisinde çözülür.

Tris-HCl Çözeltileri; SDS-Poliakrilamid jel için iki ayrı Tris-HCl çözeltisi (1.5 M pH 8.8 ve 1 M pH 6.8) kullanılmaktadır. İstenilen hacim için 1.5 M olacak şekilde Tris tartılır ve bir miktar dH<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülür. Derişik (12.2 M) HCl ile pH'sı 8.8'e diğer Tris çözeltisinin pH'sı 6.8'e ayarlandıktan sonra dH<sub>2</sub>O ile son hacime tamamlanır.

RNase'sız Su; Ticari olarak alınan 1ml DEPC, koyu şişe içerisinde 1 litre çift distile suya (ddH<sub>2</sub>O) eklenerek gece boyu karıştırılır ve 121°C'de 20 dk otoklav edilir.

Liziz Tamponu; 150 mM NaCl (15 ml, 1 M NaCl'den), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (0,1 ml, 1 M MgCl<sub>2</sub> 'den), %10 gliserol (10 ml), 20 mM Tris (2 ml, 1 M Tris-HCl, pH 7,5-8), %1 Triton X-100 (1 ml), 71,9 ml dH<sub>2</sub>O karıştırılarak çözdürülür.

## **4.2. METOD**

### **4.2.1. Hücre Kültürü ve Alt Kültürleme**

Met5A hücreleri (insan kaymaklı transforme olmayan mezotelyal hücre hattı) ve SPC-212 hücreleri (asbeste maruz kalma sonucu oluşan insan kaynaklı mezotelyal hücre hattı) %10 (v/v) FBS ve %1 Pen/Strep içeren sırasıyla M199 ve RPMI besiyerlerinde 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübatörde büyütülmüştür. Hücrelerin besiyeri ortalama 2-3 günde bir taze besiyeri ile değiştirilirken, yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler ise pasajlanmıştır.

Hücrelerin yoğunluğu (confluency), büyütüldükleri flaskta yaklaşık %90-100 oranına ulaştığında alt kültürleri (pasaj) yapılmıştır. Flasktaki besiyeri vakum yardımıyla çekildikten sonra yaklaşık 1-2 ml (25 cm<sup>2</sup>'lik petri için) 1X PBS ile yıkanan hücrelere, hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantılarını ayırmak için 1-1.5 ml 1X Tripsin eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk santrifüjün ardından üst sıvı çekilmiş (tripsin ve besi yeri) ve belirlenen oranda (1:3) seyreltmek amacıyla tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstüne taze besiyeri eklenmiştir. Hücre çökeltisi, homojen olarak dağıtıldıktan sonra taze besiyeri bulunan flaslara nazikçe ilave edilmiş ve 37°C'de nemli, %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe büyümesi sağlanmıştır.

### **4.2.2. Hücre Stoklama**

1X tripsin ile flasktan kaldırılan hücreler üzerlerine 5:1 oranında besiyeri eklenerek tripsinin etkinliği azaltılmıştır. Hücreler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çökteldikten sonra üst kısımdaki sıvı atılarak pellet 1 ml hücre dondurma solüsyonu ile süspanse edilmiş ve kriyo tüplere aktarılarak hızlı bir şekilde buzda -80°C'ye ve 24 saat sonra -196 °C'a kaldırılmıştır.

### **4.2.3. MTS Hücre Proliferasyon Testi**

Hücre canlılığını belirlemek amacıyla kullanılan MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium salt), canlı hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri sonucu, tetrazolium tuzunun, renkli bir ürüne

dönüştürülmesi temeline dayanır. Dehidrogenaz enzimlerinin ürettiği formazan miktarı, kültürdeki canlı hücre sayısı ve mitokondriyel aktivite ile doğru orantılıdır ve spektral yöntemler kullanılarak 490 nm’de formazan miktarı ölçülebilir.

SCP212 ve Met5A hücre hatları,  $5 \times 10^3$  hücre/kuyu olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekilerek, FBS içeren besiyerinde 24 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında 0-100  $\mu\text{M}$ ’lik BA ile muamele edilen hücreler farklı sürelerde (0-96 saatlerinde) inkübasyona bırakılmıştır. MTS deneyi için CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferasyon Assay kiti (Promega) kullanılmıştır. 20  $\mu\text{l}$  MTS bileşiği, 200  $\mu\text{l}$  besiyeri içeren her bir kuyuya eklendikten sonra,  $37^\circ\text{C}$ ’de 1 saat inkübasyona bırakılmış, bu sürenin sonunda plate  $25^\circ\text{C}$ ’de 5 dakika bekletilerek reaksiyon içeriğinin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Mikroplate Reader (Thermo, Varioskan Flash) kullanılarak 490 nm dalga boyunda fotometrik ölçüm yapılmıştır. Ortalamalar ve standart sapmalar Mikrossoft Excel programı kullanılarak, istatistiksel hesaplamalar Annova ve Benforoni testleri ile SPSS programında yapılmıştır.

#### **4.2.4. Protein İzolasyonu**

EGFR, ERK, JNK, p38 ve AKT proteinlerinin aktivasyonu ve toplam protein seviyelerinde doza ve zamana bağlı olarak meydana gelen değişimleri karşılaştırmak için, SPC212 hücrelerine 25, 50, 75 ve 100  $\mu\text{M}$  BA uygulamasının 6, 12 ve 24 saat sonrasında total protein izolasyonları yapılmıştır. Hücreler petriye ekildikten 24 saat sonra serum starvation yapılan hücrelere BA uygulaması yapılmış ve belirlenen saatlerde izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Her izolasyondan 15 dk önce petride büyütülen hücrelere 100ng/ml EGF eklenmiştir. 15 dk sonra hücreler inkübatörden alınarak üzerlerindeki besiyeri çekilmiş ve 2 ml 1X PBS ile hücreler kazınmıştır. Kazınan hücreler 15 ml’lik falkona alınmış, 1000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası falkondaki PBS çekilerek, hücrelerin üzerine 200  $\mu\text{l}$  (%1 proteaz-fosfataz inhibitörü içeren) lizis buffer eklenmiş ve hücreler pipet yardımı ile 2 ml’lik ependorf tüplere alınmıştır. Tüp içerisindeki hücreler 1 ml’lik şırınga ile homojenize edilmiştir. Daha öncesinde  $+4^\circ\text{C}$ ’ye ayarlanan santrifüjde 14000 g’de 7 dakika santrifüj edilen hücrelerde çöktürme işlemi sonrası supernatant yeni bir tüpe

aktarılmıştır. Protein lizatından 20 µl BCA assay için ayrılmıştır. Proteinler –20 °C’de muhafaza edilmiştir.

#### **4.2.5. Protein Miktar Tayini**

İzole edilen protein konsantrasyonları Thermo BCA Protein Assay ile belirlenmiştir. Yöntem, BCA (bicinchoninic acid) içeriğinde bulunan  $Cu^{+2}$  iyonlarının, alkali ortamda protein ile tepkimeye girmesiyle  $Cu^{+}$ ’ya indirgenmesi (Biuret tepkimesi) sonucu oluşan mor-menekşe renkli ürünün kolorimetrik olarak ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Oluşan ürün ise 562 nm’de maksimum absorbans vermektedir. BCA’nın iki solüsyonu (Reagent A ve B) 50:1 oranında karıştırılarak 96-kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 200 µl eklenmiştir. Elde edilen protein lizatlarından ve konsantrasyonları bilinen protein standartlarından her bir kuyucuğa iki tekrarlı olacak şekilde 10’ar µl eklenerek BCA kimyasalı ile iyice karışması sağlanmıştır. Ayrıca kuyucuklara liziz tamponu da kör kuyucuk (blank) olarak eklenmiştir. Oluşan ürünün ışıktan etkilenmemesi için 96-kuyucuklu plaka alüminyum folyo ile sarılarak tepkimenin oluşması için 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. 96-kuyucuklu plakanın oda sıcaklığına soğuması beklendikten sonra 562 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Protein standartlarının ve örneklerin absorbans değerlerinin ortalaması alınarak kör kuyucuğun absorbans değeri bu ortalamalardan çıkarılmıştır. Standartların absorbans değeri kullanılarak standart grafik çizilmiş ve doğrusal grafiğin formülü ile  $R^2$  değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan formülde ilgili yere absorbans değerleri yazılarak protein lizatlarının konsantrasyonları µg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

#### **4.2.6. SDS-PAGE ve Western Blotting**

Protein seviyelerinde meydana gelen değişimleri karşılaştırabilmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western blotting uygulamaları yapılmıştır. 15 µg total protein lizatı 4X sample yükleme tamponu ile karıştırılmış, proteinleri denatüre etmek amacıyla 95°C’de 5 dk inkübe edildikten sonra örnekler (15µg örnek 1/3 hacimde yükleme boyası) kuyulara yüklenmiş ve ayırma jelinde (Tablo: 4.1) 20 dk 90 V, Paketleme jelinde (Tablo: 4.1) 1 saat 120 V’ta yürütülmüştür. %10 SDS-PAGE ile ayrıştırılan proteinlerin jelden PVDF membrana

aktarılması 1,5 saat 110 V elektrik akımı ile gerçekleştirilmiştir. Transfer verimliliği ve proteinlerin yeri renkli marker kullanılarak belirlenmiştir. Membran %5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T içerisinde, 80-100 rpm’de oda sıcaklığında 1saat çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Membran 1X TBS-T ile üç kez (5, 10 ve 5 dk süreyle) 240 rpm’de çalkalanarak yıkanmıştır. Membran, %5’lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerek hazırlanan primer (birincil) antikor (Tablo 4.2) ile +4°C’de gece boyu (~16 saat) 80-100 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Birincil antikor ile inkübasyonun ardından membran 1X TBS-T ile 3 kez yıkanmıştır. Membran, %5’lik yağsız süt tozu içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerek hazırlanan HRP-konjuge sekonder (ikincil) antikor (Tablo 4.2) ile +4°C’de 1,5 saat 80-100 rpm’de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İkincil antikor ile inkübasyonun ardından 1X TBS-T ile 3 kez yıkanan membran, ECL (enhanced chemiluminescence) plus kit (Pierce) içeriğindeki solüsyonlar kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde karanlık ortamda, oda sıcaklığında 5 dk muamele edilmiştir. Membran alüminyum folyo ile sarılarak ChemiDoc XRS+ (BioRad) cihazı ile görüntülenmiştir. Elde edilen protein bantlarının yoğunluğu ve protein miktarları BioRad ImageLab programı ile analiz edilerek protein seviyelerindeki değişimler karşılaştırılmıştır. Referans olarak  $\beta$ -aktin kullanılmış ve deney gruplarını birbirlerine göre normalize etmek amacıyla, ölçülen bant yoğunlukları her bir deney grubuna ait  $\beta$ -aktin bant yoğunluklarına bölünerek elde edilen değerler analiz edilmiştir. Birincil antikor, inkübasyonun ardından bir falkon tüpüne alınarak tekrar kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Tablo 4.1: %10’luk ayırma jeli ve %4.5’lik paketlenme jeli hazırlamak için kullanılan maddeler ve miktarları

	Running Gel (%10)	Stacking Gel (%4.5)
dH <sub>2</sub> O	7.75 ml	3.1 ml
Tris-HCl	4 ml (pH 8.8) 1.5 M	1.25 ml (pH 6.8) 0.5 M
%10 SDS	159.6 $\mu$ l	50 $\mu$ l
%40 Acr:Bis	4 ml	562 $\mu$ l
%10 APS	79.8 $\mu$ l	25 $\mu$ l
TEMED	11.4 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Tablo 4.2: Westen Blotting’de kullanılan primer ve sekonder antikorlar .

1° Antikor	1° Antikor Katalog No	2° Antikor	Firma	2° Antikor Katalog No	Firma
EGFR	4267	Anti-Rabbit	Cell Signaling	7075	Cell Signaling
p-EGFR	3777	Anti-Rabbit	Cell Signaling	7075	Cell Signaling
ERK1	SC-94	Anti-Rabbit	Santa Cruz	7075	Cell Signaling
p-ERK	SC-7383	Anti-Mouse	Santa Cruz	SC-2005	Santa Cruz
JNK	SC-7345	Anti-Rabbit	Santa Cruz	7075	Cell Signaling
p-JNK	4668	Anti-Rabbit	Cell Signaling	7075	Cell Signaling
p-c-JUN	3270	Anti-Rabbit	Cell Signaling	7075	Cell Signaling
P38	9212	Anti-Rabbit	Cell Signaling	7075	Cell Signaling
p-P38	4511	Anti-Rabbit	Cell Signaling	7075	Cell Signaling
AKT	4891	Anti-Rabbit	Cell Signaling	7075	Cell Signaling
p-AKT	4060	Anti-Rabbit	Cell Signaling	7075	Cell Signaling
β-ACTİN	SC-47778	Anti-Mouse	Santa Cruz	SC-2005	Santa Cruz

#### 4.2.7. Total RNA İzolasyonu

Hücrelerde BA uygulaması sonucu ELK-1, JUN, STAT1, STAT3 ve STAT5A gen ifadelerindeki değişimlerin qRT-PCR ile analiz edilebilmesi için total RNA izolasyonu yapılmıştır.  $1 \times 10^6$  SPC-212 hücresi besiyerinde 24 saat boyunca

inkübe edildikten sonra serum starvation yapılan hücrelere 3, 6, 12 ve 24 saatlik süre için 75 µM dozlarında BA uygulanmıştır. Liziden 15 dakika önce 100 ng/µl EGF ile indüklenen hücrelerden total RNA izolasyonları yapılmıştır.

Öncelikle RNA izolasyonu yapılacak yüzey ve kullanılacak malzemeler RNaz'sız su ile hazırlanmış %70'lik (v/v) etanol ve RNAZap ile silinmiştir. Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 1X PBS içinde kazınarak kaldırılmıştır. Falkona alınan hücre-PBS karışımı oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Üst sıvı çekildikten sonra pelletin 350 µl RLT buffer (liziz buffer) eklenmiş ve RNase/DNase'dan arındırılmış tüpe alınıp (enjektör yardımı ile) lizis yapılmıştır. 3 dk 14000 rpm'de santrifüj edilip supernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Süpernatant üzerine 350 µl %70 Etanol (1:1) eklemiştir. Karışım 2 ml'lik toplama tüpüne 700 µl transfer edilip, 15 sn 8000xg yada 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Atık sıvı kısım atıldıktan sonra 700 µl RW1 buffer spin kolona eklenmiş ve 15 sn 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra 500 µl RPE buffer spin kolona eklenmiştir ve yukarıdaki şekilde santrifüj edilerek, atık sıvı kısım atılmıştır. 500 µl RPE buffer spin kolona eklenmiş, 2 dk 8000xg (10000 rpm)'de santrifüj edilmiştir. Spin kolon 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirildikten sonra, 40 µl RNase free su eklenip RNA'yı süzmek için 1 dk 8000 g de santrifüj edilmiştir. Elde edilen total RNA karışımından 3 kez saflık ölçümü yapılması için 6 µl, jelde yürütmek için de 2-4 µl RNA başka bir tüpe ayrılmıştır.

#### **4.2.8. cDNA Sentezi**

Hedef genlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction) deneylerinde hedef genlere ait mRNA düzeyleri analiz edilmiştir. Revers transkripsiyon reaksiyonu 100 ng RNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Random Hexamer Primer (60 µM final konsantrasyon), RNA (100 ng/µl) ve su karışımı total hacim 11.4 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Template-primer karışımı tüpler 65 ° C 'de 10 dakika ısıtılmıştır. Reaksiyon buffer (8 mM MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu), RNase inhibitörü, dNTP mix (final konsantrasyonu 1 mM her birinden), DTT (5 mM final konsantrasyonu), ve Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (final konsantrasyonu 10 birim)'den oluşan karışım tüplere son hacim 20 µl olacak şekilde eklenmiştir. 29 ° C 'de 10

dakika inkübasyon sonrasında 48 ° C 'de 60 dakika inkübe edilmiştir. 85 ° C 'de 5 dakika bekletilerek Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase enzimi inaktif edilmiştir. Reaksiyon tüpler buza alınarak sonlandırılmıştır. Tüpler -20 ° C 'de saklanmıştır.

#### 4.2.9. RT-PCR

Primer-probe karışımından son hacim 1X olacak şekilde alınmış, su ve final konsantrasyonu 1X olacak şekilde LightCycler 480 Probe Master karışımı ile PCR mix oluşturulmuştur. 1:3 oranında seyreltilen cDNA'ler toplam hacim 10 ul olacak şekilde 384'lü plağa yerleştirilmiştir. qPCR reaksiyonları LightCycler 480 sisteminde (Roche) gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak  $\beta$ -Aktin (ACTB) ve hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) kullanılırken, deney gruplarının normalizasyonu kontrol grubuna göre yapılmıştır. PCR reaksiyonlarında kontaminasyon kaynaklı olası hataların belirlenmesi amacı ile kalıp cDNA içermeyen negatif kontrol grupları da kuyucuklara eklenmiştir. PCR reaksiyonu Tablo 4.3'te gösterildiği gibi yapılmıştır. qPCR sonuçları  $\Delta\Delta C_T$  metodu ile analiz edilmiştir.  $\Delta\Delta C_T$  değerleri kullanılarak gen ifadelerindeki göreceli değişim hesaplanarak grafikleri çizilmiştir.

Tablo 4.3: Real Time PCR reaksiyon aşamalarında ayarlanan sıcaklık ve döngü sayıları.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Pre-İnkübasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	10 sn	45
Bağlanma	60	30 sn	45
Uzama	72	1 sn	45
Soğuma	40	30 sn	1

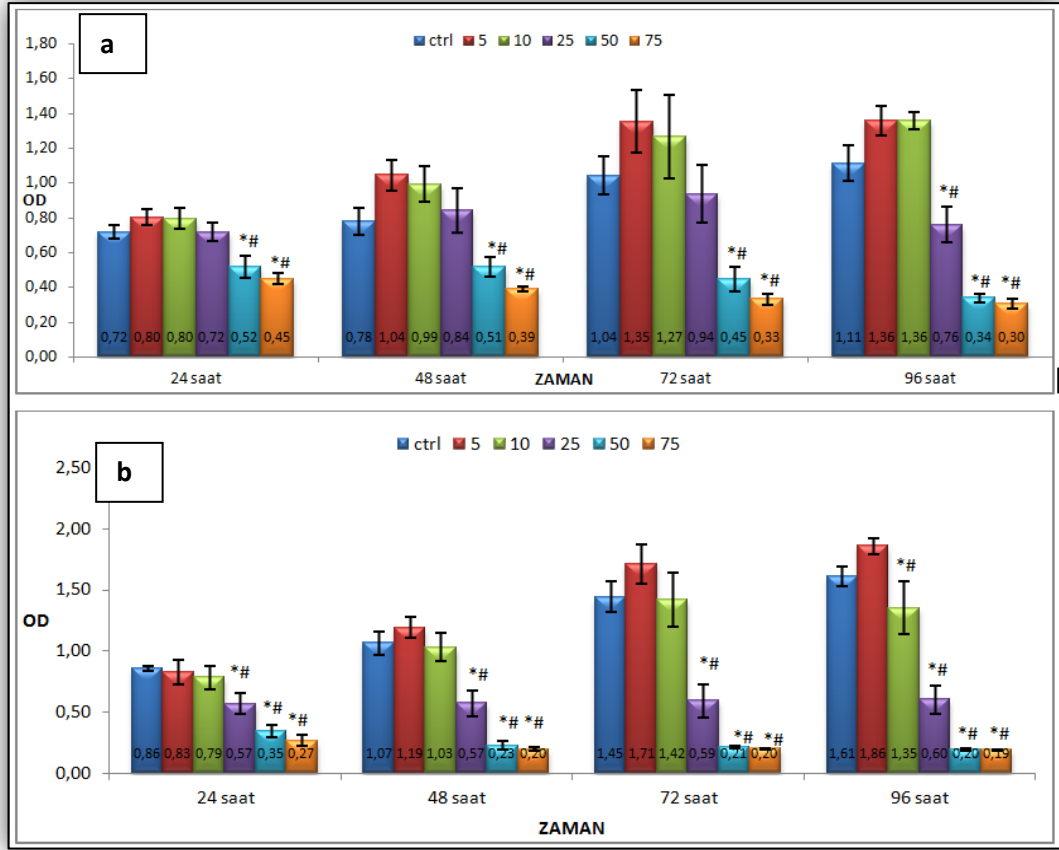
## 5. BULGULAR

### 5.1. BA'nın Met5A ve SPC 212 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

BA'nın Met5A ve SPC212 hücrelerinin proliferasyonlarına etkisi konsantrasyona (0-75 $\mu$ M) ve zamana (0-96 saat) bağılı olarak MTS deneyi ile belirlenmiştir. Ekim sonrası 24 saat inkübe edilen hücrelere belirlenen konsantrasyonda BA uygulanmıştır. Absorbans ölçümünden 2 saat öncesinde MTS kiti eklenerek hücreler inkübe edilmiştir. 24, 48, 72, ve 96 saatlerinde absorbansları ölçülen hücrelerin metabolik olarak aktif olanları belirlenmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda kontrol hücresi olan Met5A hücrelerinde BA, 10  $\mu$ M ve altındaki konsantrasyonlarda proliferasyonu indüklediği gözlenmiştir. BA'nın anlamlı inhibisyonu 25  $\mu$ M konsantrasyonda 96 saatten sonra ve 50  $\mu$ M konsantrasyon üstünde 24 saatten itibaren gözlenmiştir (Şekil 5.1).

BA'nın SPC212 hücre proliferasyonuna etkisi incelendiğinde, 10 $\mu$ M konsantrasyonu altındaki dozlarda hücre proliferasyonunu artırırken, 25  $\mu$ M ve üzerindeki konsantrasyonlarda 24 saatten itibaren proliferasyonu baskıladığı görülmüştür (Şekil 5.1). BA'nın SPC212 hücre proliferasyonunu durdurucu etkisi daha düşük dozlarda ve daha erken zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Bu durum, MM hücrelerinin BA'ya kontrol hücrelerinden daha hassas olduğunu göstermektedir.

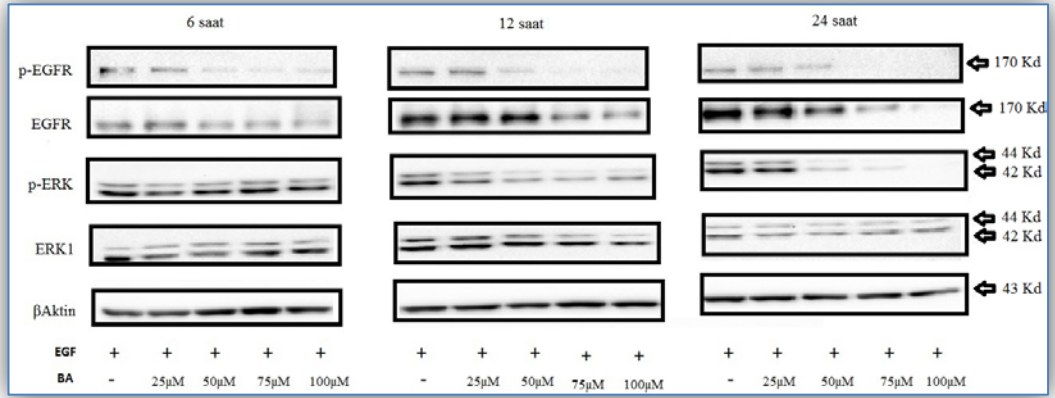


Şekil 5.1: BA'nın Met5a (a) ve SPC212 (b) hücre proliferasyonuna etkisi. MTS testi 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde uygulanmıştır. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin çiftli tekrarları şeklinde yapılarak ortalamaları alınmıştır. p değeri SPSS programında Dunnett ve Benforoni testleri ile hesaplanmıştır. p değeri \*P<0,05 ve #p<0,01 olarak belirlenmiştir.

## 5.2. BA'nın EGFR MAPK Yolaklarına Etkisi

Hücre ekiminden sonra 24 saat serumsuz besiyerinde inkübe edilen %70-80 yoğunluktaki SPC212 hücrelerine 0-100 µM aralıklarında BA uygulanarak proteinlere etkisi 6, 12, 24 saatlerde incelenmiştir. Hücreler liziden 15 dk önce EGF (100ng/ml) ile indüklenmiştir. Proteinlerin total konsantrasyonları BCA ile belirlendikten sonra SDS-PAGE ve western-blot analizleri yapılmıştır.

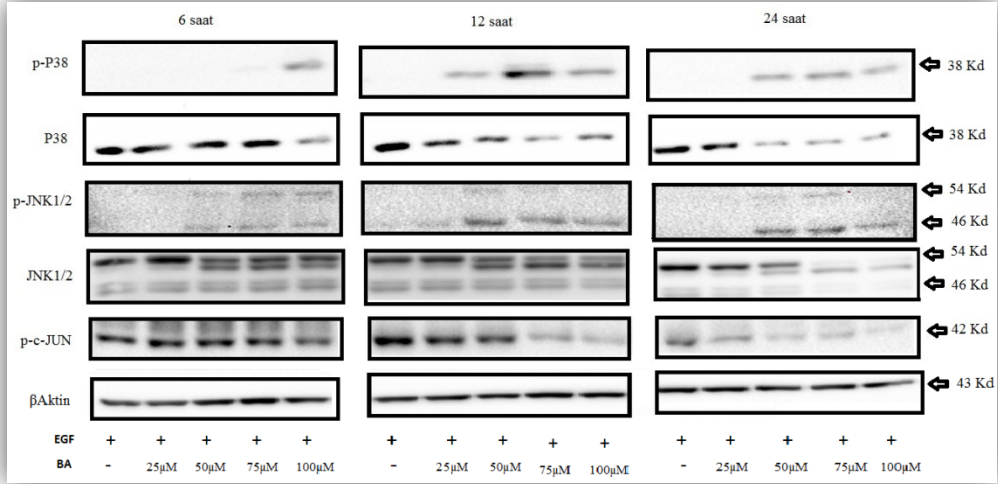
Sonuçlarımız göstermektedir ki BA, 50 µM ve üzeri dozlarda 0-24 saat arasında EGFR aktivitesini konsantrasyona ve zamana bağlı olarak baskılamaktadır. BA, EGFR ifadesini ise 50 µM ve üzeri konsantrasyonda 6 saatten itibaren baskılamaya başlamıştır. BA'nın ERK1/2 aktivitesini de 50 µM konsantrasyondan itibaren doz ve zamana bağlı olarak baskıladığı ancak ifadesi üzerinde önemli bir etki göstermediği görülmüştür (Şekil 5.2).



Şekil 5.2: BA'nın EGFR ve ERK1/2 fosforilasyonu ve ifadenmesi üzerine etkisinin doza (0-100  $\mu\text{M}$ ) ve zamana (0-24 saat) bağlı olarak incelenmesi. Deneyler en az 3 kez tekrar edilerek Image lab. Software ile analiz edilmiştir. Yükleme kontrolü olarak aktin proteini kullanılmıştır.

BA, p38, JNK stres yolları üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak indükleyici bir etki göstermiştir. Western-blot sonuçları doğrultusunda BA ilk 6 saatte 100  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda p38 aktivitesini indüklemiştir. BA 50  $\mu\text{M}$  ve üzeri konsantrasyonlarda p38 aktivitesini 24 saatte devam ettirmektedir. Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak BA, p38 ifadesini de etkilemektedir. İlk 6 saatte p38 ifadesi 100  $\mu\text{M}$  BA konsantrasyonunda baskılanırken 12 saatten itibaren 50  $\mu\text{M}$  üzeri dozlarda protein seviyesinde baskılanma görülmektedir (Şekil 5.3).

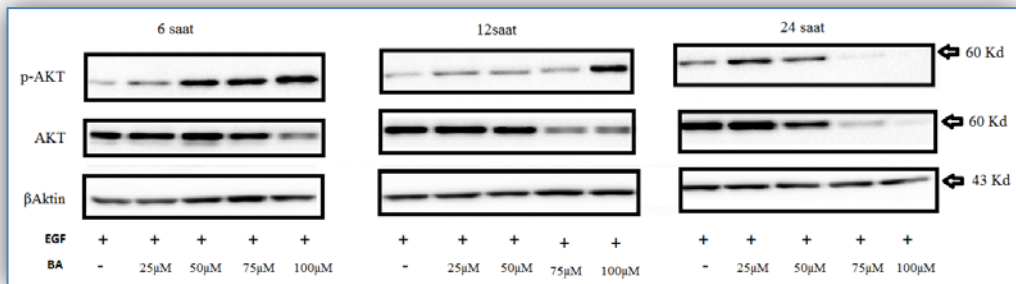
JNK1/2 aktivitesi ise 50  $\mu\text{M}$  ve üzeri BA konsantrasyonunda 6 saatten itibaren indüklenmektedir. Bunun yanında, 50  $\mu\text{M}$  ve üzeri BA konsantrasyonlarında, JNK1/2 ifadesinde 24 saatte belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bunun yanında, c-JUN aktivitesi 50  $\mu\text{M}$  ve üzeri konsantrasyonlarda 12 saatten itibaren baskılanmıştır (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: BA'nın p38, JNK1/2 ve c-JUN fosforilasyonu ve ifadenmesi üzerine etkisinin doza (0-100  $\mu\text{M}$ ) ve zamana (6-24 saat) bağlı olarak incelenmesi. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir ve image lab. Software ile analiz edilmiştir. Yükleme kontrolü olarak aktin kullanılmıştır.

### 5.3. BA'nın PI3K/AKT Yolağı Üzerine Olan Etkisi

BA (0-100) uygulanan hücrelerde AKT fosforilasyonu ve total AKT seviyeleri 0-24 saatler arasında incelenmiştir. BA ilk 6 saatte 50, 75 ve 100  $\mu\text{M}$  üzeri konsantrasyonlarda AKT aktivitesini indüklerken 24 saatte sonunda 75  $\mu\text{M}$  ve üzeri konsantrasyonlarda AKT aktivitesini tamamen baskılamıştır. 50  $\mu\text{M}$  üzerindeki konsantrasyonlarda 12 saatten itibaren AKT aktivitesinde düşüş gözlenirken 24 saatte aktivitenin tamamen kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 5.4).

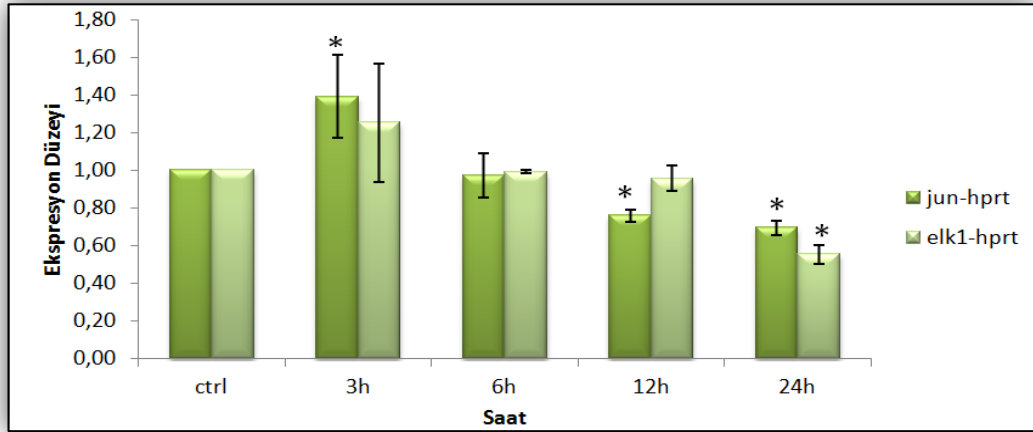


Şekil 5.4: BA'nın AKT fosforilasyonu ve ifadenmesi üzerindeki etkisinin doza (0-100  $\mu\text{M}$ ) ve zamana (6-24 saat) bağlı olarak incelenmesi. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir ve image lab. Software ile analiz edilmiştir. Yükleme kontrolü olarak aktin kullanılmıştır.

## 5.4. RT-PCR Sonuçları

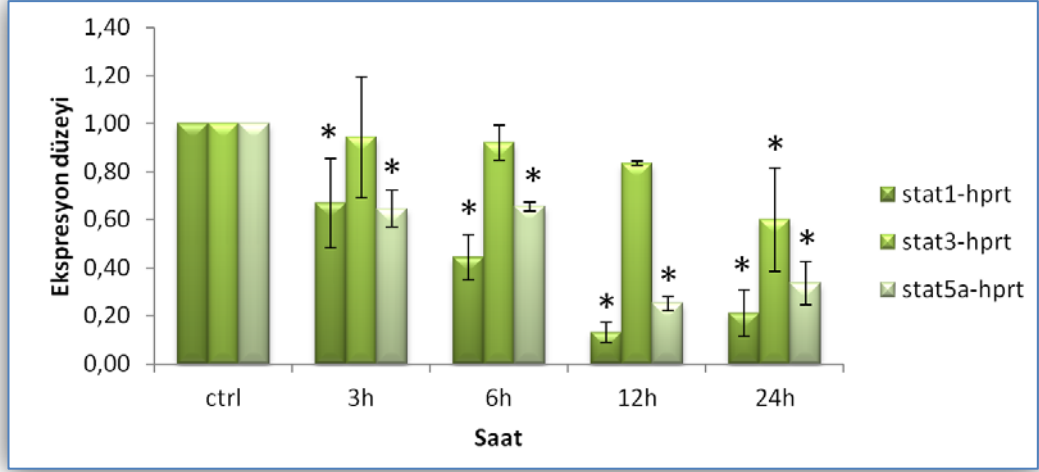
Hücre ekiminden sonra serumsuz besiyerinde 24 saat bekletilen %70-80 yoğunluktaki hücrelere 75  $\mu$ M BA uygulanarak ekspresyon seviyesindeki değişimler 3, 6, 12, 24 saatlerinde zamana bağlı olarak incelenmiştir. Hücreler lizizden 15 dk önce EGF (100ng/ml) ile indüklenmiştir. Elde edilen hücre lizatlarından total RNA izolasyonu ve sonrasında cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA'ların konsantrasyonu nano drop ölçümü ile belirlenerek JUN, STAT1, STAT3, STAT5a ve ELK1 gen ifadelerinin RT PCR ile analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirilirken referans gen olarak HPRT, kalibratör olarak ise kontrol örneği kullanılmıştır.

Elde edilen sonuçlarına göre BA, 3 saatte JUN ifadenmesini indüklese de 12 saatten sonra JUN ifade düzeyinde düşme gözlenmiştir. ELK1 ifadesi ise zamana bağlı olarak 24 saatte düşüş göstermiştir (Şekil 5.5).



Şekil 5.5: BA'nın 75  $\mu$ M konsantrasyonda JUN ve ELK1 ifadesi üzerine etkisinin zamana (3-24 saat) bağlı olarak incelenmesi. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir. p değeri SPSS programında Dunnett ve Benforoni testleri ile hesaplanmıştır. p değeri \*P<0,05 olarak belirlenmiştir.

BA'nın STAT1, STAT3 ve STAT5a ifade düzeylerine etkisi RT PCR analizi ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre BA, STAT1 ve STAT5a ifade düzeylerini 3 saatten itibaren baskımlarken, STAT3 ifadesinde 24 saatten sonra baskılanma gözlenmiştir (Şekil: 5.6).



Şekil 5.6: BA'nın 75  $\mu$ M konsantrasyonda STAT1, STAT3 ve STAT5a ifadesi üzerine etkisinin zamana (3-24 saat) bağlı olarak incelenmesi. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir. p değeri SPSS programında Dunnett ve Benforoni testleri ile hesaplanmıştır. p değeri \*P<0,05 olarak belirlenmiştir.

## 6. TARTIŞMA

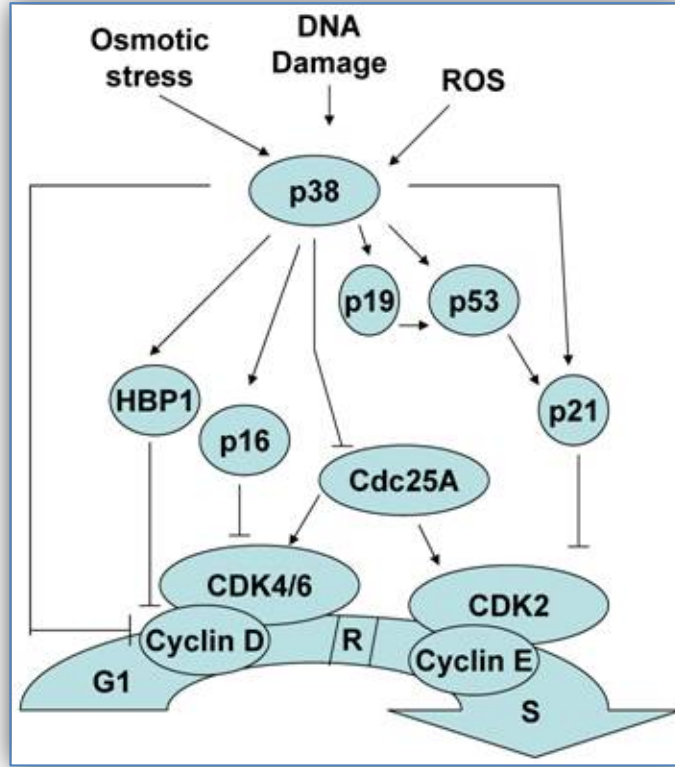
BA'nın birçok kanser türü üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve apoptotik yolları aktive ettiği bilinmektedir. Fakat BA'nın EGFR, MAPK sinyal yolları ve AKT sağkalım yolağı üzerine etkisi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. BA'nın mesothelioma hücre hattı üzerine etkisiyle ilgili ise daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu kapsamda yapılan çalışmamızda iki tipte hücre kullanılmıştır. Bu hücrelerde kontrol hücrelerine (Met5A) BA uygulandığında yüksek dozlarda etki gözlenirken malignan mezotelyoma hücresi olan SPC212 hücrelerinde Met5A'ya göre daha düşük dozlarda ve daha erken zamanlarda etki etmektedir. Önceki çalışmalarda BA'nın kanser olmayan hücreler üzerinde anti-proliferatif etkisinin olmadığı veya az olduğu belirtilmiştir. [63], [145], [193]. MTS sonuçlarına göre BA, SPC212 hücrelerinde 25 µM üzerindeki dozlarda 24 saatten itibaren etki gösterirken Met5A hücrelerinde aynı zamandaki etkisi 50 µM üzerinde gözlenmektedir. Buna ilaveten 10 µM doz uygulaması SPC212 hücre proliferasyonunu 96 saatten itibaren düşürmektedir. Dolayısıyla doz ayarlaması ve/veya dozun zaman sınırlaması uygun seçilirse BA'nın transforme olmayan hücreler üzerindeki etkisini azaltmak mümkün olabilir.

Protein analizleri ile ilgili çalışmamızda BA'nın MAPK sinyal yolağı, PI3K/AKT yolağı ve EGFR üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bulgularımızda BA'nın artan dozlarda ve ilerleyen zamanlarda EGFR aktivitesini ve ifadenmesini de baskıladığı belirlenmiştir. Bu sonuç EGFR ve BA ile ilgili verilen az olması nedeniyle önem taşımaktadır. BA dışında pentasiklik triterpenler ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Dimetil melaleucate (DMM), ursolic asit (UA), 18α-glycyrrhetic asit (GA) ve carbenoxolone (CE) pentasiklik triterpenler ile yapılan çalışmada, maddelerin farklı konsantrasyonlarda (1-100 µM) MCF-7 hücrelerinde doz artışı ile paralel olarak EGFR aktivitesinin baskılandığı görülmüştür. Aynı çalışmada in siliko analizlerde pentasiklik triterpenlerin EGFR'nin kinaz domaininde bulunan spesifik aminoasitler (Lys 745, Cys797, Asp 855 ve Arg 803) ile H bağı yaptığı görülmüştür [197]. İleride yapılacak çalışmalarda BA'nın da EGFR kinaz domaini ile etkileşimi incelenebilir. Benzer bir sonucun ortaya çıkması BA'nın, EGFR inhibitörü olarak kullanıma sunulması fikrini destekleyebilecektir. BA'nın veya farklı pentasiklik triterpenlerin EGFR ifadesini etkilediğine dair bir veri bulunmamaktadır. Platycodin D (PD) [198], UA [197], [199], GA ve DMM [197] ile

yapılan çalışmalarda EGFR ifadesi değişmemiştir. Ancak bizim sonuçlarımıza göre BA, doza ve zamana bağlı olarak EGFR ifadesini de baskılamaktadır. Bu baskılanmanın EGFR genini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin baskılanması ile mi yoksa reseptör internalizasyon mekanizmasındaki değişikliklerden dolayı mı kaynaklandığı aydınlatılması gereken bir konudur. Bunun için BA uygulaması ile EGFR promotörünü aktive eden transkripsiyon faktörlerinin aktivitesindeki değişimler ve/veya EGFR internalizasyonu sonrasında proteolitik yıkımda rol alan enzimlerin aktivitelerindeki değişimler incelenebilir.

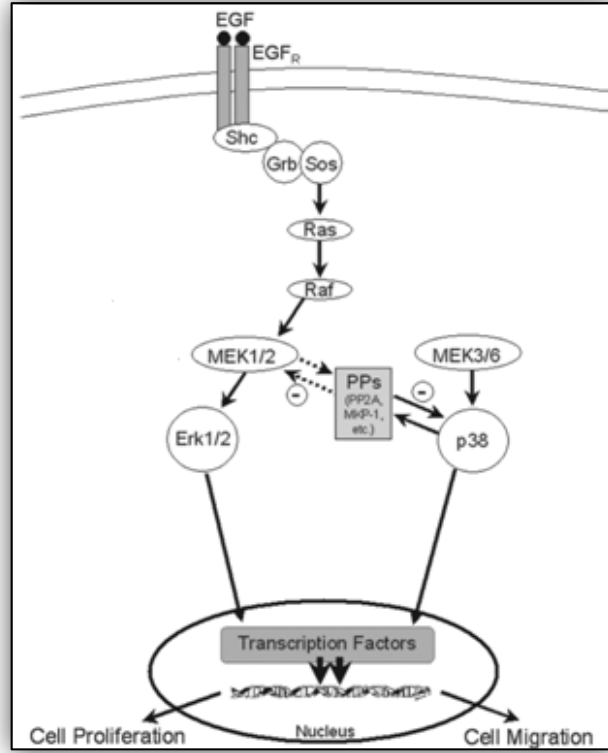
EGFR'ın baskılanması aşağı yolda bulunan ve hücre proliferasyonunda rol alan ERK1/2 aktivitesini de etkilemiştir. ERK1/2 fosforilasyonlu sonuçlarda BA'nın konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak baskılanma gözlenmiştir. Mononükleer periferik kan hücrelerinde yapılan çalışmada da BA'nın LPS ile indüklenmiş immün hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak ERK1/2 aktivitesini baskıladığı belirlenmiştir [200]. BA'nın ERK aktivitesini baskılamasının EGFR üzerinden olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında EGFR'ın aşağı yolda yer alan farklı moleküller (AKT, PI3K, CDK4,6, cyclin D1, STAT3 gibi) incelendiğinde BA ve diğer triterpenlerin EGFR inhibisyonuna paralel olarak aşağı yoldaki moleküllerin aktivitelerini de baskıladığı rapor edilmiştir [197], [198], [199], [200].

BA stresle aktive olan yollarda da etki göstermektedir. Yüksek dozlarda ve ilerleyen zamanlarda BA, p38 aktivitesini arttırmıştır. p38 aktivitesindeki artış BA'nın hücrel stres uyarması sonucu MEK 3/6 aktivasyonuna neden olmasından kaynaklanabilmektedir. BA'nın ROS oluşumuna neden olmasından dolayı p38 stress yolağının aktivitesinin tetikleniyor olması muhtemel gözükmektedir. Diğer yandan p38'in stres ile aktive olması p53 üzerinden veya doğrudan p21 aktivitesini pozitif yönde etkilemektedir (Şekil 6.1), [216]. Bununla birlikte EGFR/ERK yolağı üzerinden p38'in negatif düzenlendiği belirtilmektedir (Şekil 6.2), [195]. Bu açıdan bakıldığında, EGFR/ERK inhibisyonu sonucu p38 aktivitesi üzerindeki negatif düzenlenmenin ortadan kalkması, p38 aktivitesinin artmasına katkı sağlamış olabilir.



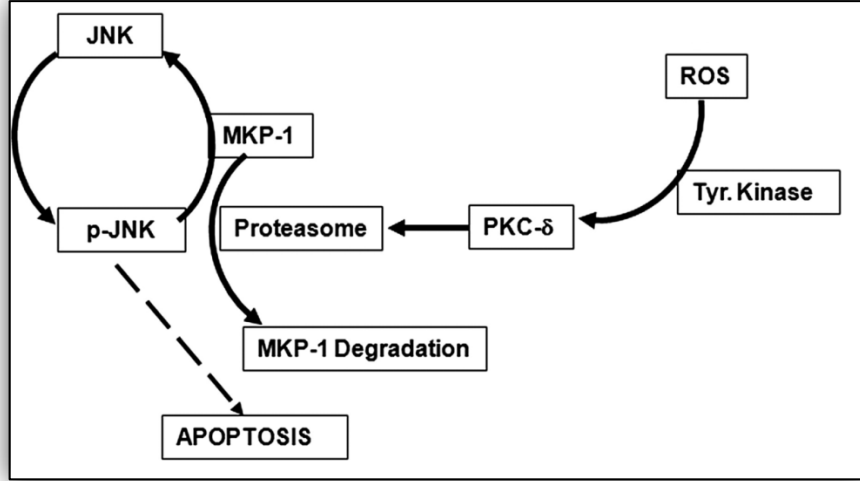
Şekil 6.1: Stress ile aktive olan p38 yolağı.

BA, p38 aktivitesi ile beraber ekspresyonu da etkilemiştir. Artan dozda ve ileri zamanda BA'nın, p38 ifadesini baskıladığı görülmüştür. p38 gen regülasyonu ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Bilindiği üzere p38'in dört izoformu bulunmaktadır; p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ . Bu çalışmada kullanılan p38 antikoru p38'in üç izoformunu tanımaktadır (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ ). p38 $\delta$  ile yapılan bir çalışmada ERK1/2'nin aktive ettiği AP1 ve Ets transkripsiyon faktörleri p38 $\delta$  promotörünün aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir [196]. Bizim yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlara göre, ERK1/2 aktivitesinin azalması ile p38 ifadesinin azalması paralellik göstermektedir. Bu durumda, ERK1 aktivitesinin diğer üç izoformun (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ ) promotörünün aktivitesini de arttırdığı düşünülebilir.



Şekil 6.2: ERK ve p38 yolağının protein fosfatazlar aracılığı ile çapraz etkileşimi.

MAPK p38 aktivitesinin yanında BA, stresle aktive olan JNK aktivitesini de etkilemiştir. Yapılan protein analiz sonuçlarına göre konsantrasyon ve zamana bağlı olarak BA uygulamasının JNK aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Farklı kanser türleri üzerine yapılan çalışmalarda da BA'nın JNK aktivitesini indüklediği gösterilmiştir [204], [205]. BA uygulaması sonucu EGFR aktivitesinin azalması ancak JNK aktivitesinin artması, JNK'in bağımsız bir yoldan aktive olduğunu anlamına gelebilir. Daha önce yapılan bir çalışmada JNK aktivitesinin hücre içi oksidatif stres sonucu aktive olan PKC $\delta$  tarafından pozitif düzenlendiği gösterilmiştir (Şekil 6.3), [206]. Yapılan bu çalışmada oksidatif stres ile aktive olan PKC $\delta$  proteininin, JNK aktivitesinin negatif düzenlenmesinden sorumlu MAPK fosfataz-1 (MKP-1) degradasyonuna neden olduğu önerilmektedir. Bu öneri doğrultusunda BA'nın neden olduğu oksidatif stres sonucu PKC $\delta$  aktivitesinin artması ile JNK fosforilasyonunun negatif düzenlenmesinin bloklanıyor olabileceği düşünülebilir.

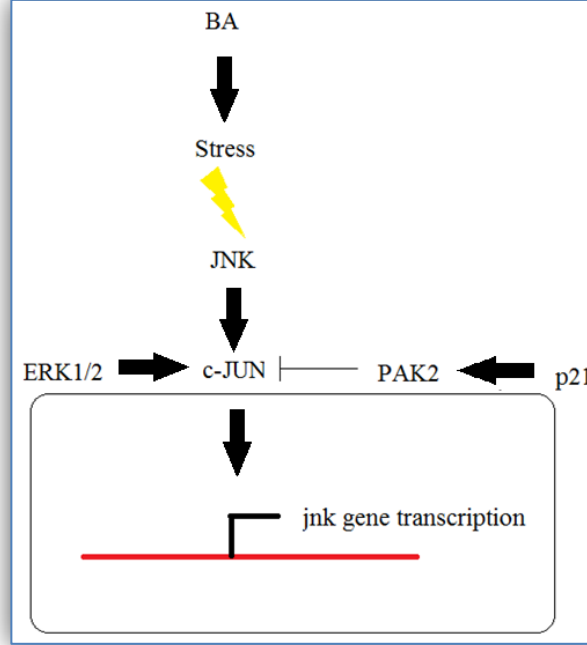


Şekil 6.3: Oksidatif stres sonucu PKC $\delta$  aktivitesinin gerçekleşmesi ve JNK fosforilasyonunun negatif düzenlenmesinin inhibisyonu.

BA'nın JNK aktivasyonu üzerinden apoptozu tetiklediği daha önceki yapılan birkaç çalışmada gösterilmiştir [204], [205]. Yapılan bu çalışmalar sonucunda BA uygulanan hücrelerde JNK, p38 ve ERK1/2 aktivitesi incelenmiş ve hücrelerin apoptozla gitme durumları analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre BA'nın JNK aktivasyonu ile apoptozu tetiklediği, bunun yanında azda olsa p38 aktivitesinin apoptozla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. ERK1/2 aktivitesinin ise apoptoz ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca BA uygulaması sonucu AKT ve FoxO3a protein fosforilasyonları incelendiğinde, JNK'in apoptozu AKT/FoxO3a yolağından tetiklediği belirtilmiştir [204].

JNK aktivitesi ile birlikte BA, JNK ifadenmesini de etkilemektedir. Western-blot sonuçlarına göre BA, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak JNK ifadesini baskılamaktadır. BA, özellikle 24 saatte, 50  $\mu$ M'in üzerindeki konsantrasyonlarda JNK aktivitesini tamamen baskılamaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada JNK aktivitesinin JNK geninin ifadesini etkilediği öne sürülmüştür [208]. T hücrelerinde yapılan bu çalışmada artan JNK aktivitesi ile JNK ekspresyonunun ilişkili olduğu belirtilmiştir. Diğer yandan T hücrelerinde yapılan çalışmanın aksine BA uygulaması sonucu JNK geninin ekspresyonu baskılanmış fakat JNK aktivitesi indüklenmiştir. JNK aktivitesindeki artışa karşın BA, c-JUN aktivitesini baskılamıştır. Daha önce yapılan çalışmadaki veriler ve bu çalışmadaki sonuçlar dikkate alındığında JNK geninin ekspresyonunun artması için c-JUN'un JNK tarafından fosforillenmesi gerektiği söylenebilir (Şekil 6.4). Ancak yine de JNK geni

ve c-JUN aktivitesinin ilişkili olduğuna dair daha fazla verinin elde edilmesi gerekmektedir.

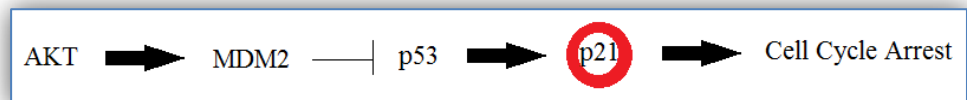


Şekil 6.4: JNK aktivasyonunun c-JUN üzerinden kendi genini regüle etmesi ve c-JUN fosforilasyonunun p21 tarafından aktive edilen PAK2 üzerinden baskılanması.

BA'nın, JNK aktivitesini indüklediği halde c-JUN aktivitesini baskıladığı tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarla proto onkogen olduğu bilinen c-JUN'un anti apoptotik yollarda rol aldığı ve hücre döngüsünün G1 fazında görev aldığı belirtilmiştir [207]. c-JUN'un antiapoptotik aktivitesi serin 63/73 rezidüsünden fosforilenmesi ile gerçekleşmektedir. Tez çalışmasında kullanılan p-c-JUN antikoru da serin 73 aminoasit rezidüsünü tanımaktadır. Dolayısıyla BA, JNK üzerinden veya başka bir yoldan c-JUN'un antiapoptik fosforilasyon paternini inhibe etmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada P21 tarafından aktive edilmiş protein kinaz (PAK2) proteininin c-JUN'a bağlanıp farklı treonin rezidülerinden (Thr2, Thr8, Thr89, Thr93 ve Thr286) fosforillediği belirtilmiştir. Bu fosforilasyon sonrası PAK2'nin, c-JUN'un diğer fosforilasyon bölgelerini baskıladığı ifade edilmektedir [208]. BA, P21 üzerinden PAK2 aktivitesini ve/veya PAK2-c-JUN etkileşimini indükleyerek c-JUN aktivitesini baskılıyor olabilir (Şekil 6.4). Daha sonraki çalışmalarla BA uygulaması sonucu P21 ve PAK2-c-JUN etkileşim düzeyi protein-protein etkileşim deneyleri ile aydınlatılabilir.

c-JUN aktivitesi ile birlikte ekspresyonu da BA uygulaması ile baskılanmıştır. 75  $\mu$ M BA uygulanarak yapılan RT-PCR sonuçlarına göre BA, JUN geninin ekspresyonunu 12 saatten itibaren azaltmaktadır. Ancak ilk 3 saatte hücreler BA'ya tepki olarak JUN ifadesini indüklemiştir. 6 saatte JUN ifadesi normale dönerken, c-JUN fosforilasyonu incelendiğinde de yine 6 saatte 75  $\mu$ M BA konsantrasyonunda aktivitede bir değişiklik gözlenmemektedir. Western-blot sonuçlarına paralel olarak 12 saatten itibaren JUN aktivitesinde ve ifadelenmesinde baskılanma görülmektedir. Bilindiği üzere c-jun geninin transkripsiyonu aynı gen ürünü ile otheregüasyonla düzenlenmektedir. BA'nın c-JUN aktivitesini baskılaması, otheregüasyon mekanizması nedeniyle gen ekspresyonunu da baskıladığını düşündürmektedir. Bununla birlikte siklin D1 transkripsiyonu AP1 tarafından düzenlendiği için c-JUN inhibisyonu hücre döngüsünün G1 fazında tutuklanmasına neden olmaktadır [213]. Ayrıca c-JUN, p53 promotörünün aktivitesini baskılamaktadır [214]. BA'nın c-JUN'u inhibe etmesi p53 transkripsiyonunun indüklenmesine yol açacağından G1 kontrol noktasında hücreler tutuklanabilecektir.

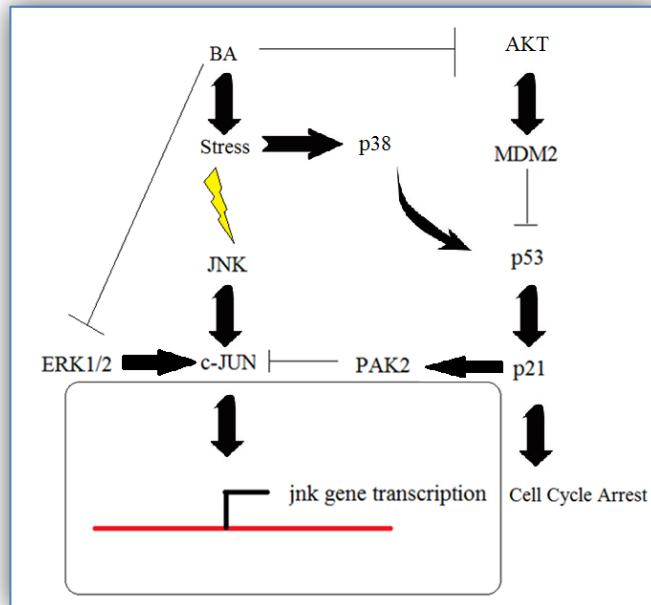
PI3K/AKT yolağı ile ilgili protein analizlerinde BA uygulaması ilk 6 saatten itibaren AKT aktivitesini doza bağılı arttırmıştır. Ancak 24 saat içinde yüksek dozlarda (75, 100 $\mu$ M) AKT aktivitesi tamamen kaybolmuştur. Daha önce yapılan bir çalışmada insan melanoma hücrelerine 10 $\mu$ g (~20 $\mu$ M) BA uygulandığında kısa zamanda AKT aktivitesini arttırmıştır [201]. İmmün sistem hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada ise BA, LPS verilmiş hücrelerde AKT aktivitesini baskılamıştır [200]. Yine BA dışında PD triterpeni ile yapılan çalışmada doz ve zamana bağılı olarak PD uygulanmış meme kanseri hücrelerinde PI3K/AKT yolağı baskılanmış, AKT aktivitesinde azalma gözlenmiştir [198]. Bu sonuçlar BA'nın PI3K/AKT yolağını baskıladığını düşündürmektedir. Bilindiği üzere AKT, Mdm2 üzerinden p53'ü baskılamakta ve böylece p21 transkripsiyonu inhibe edilmektedir (Şekil 6.5), [215].



Şekil 6.5: Akt'nin Mdm2 üzerinden p53'ü inhibe etmesi sonucu p21 transkripsiyonunun baskılanması.

AKT aktivitesine ilaveten BA, yüksek dozlarda ve/veya ileri saatlerde AKT ifadesini de baskılamıştır. Fakat insan mononükleer periferel kan hücreleri ve insan melanoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda AKT ifadesinin değişmediği belirtilmiştir [200], [201]. Bunun nedeni yapılan her iki çalışmada da BA düşük dozlarda (~4 ve 20  $\mu$ M) ve kısa zaman periodlarında (30 ve 0-3dk) uygulandığı için olabilir. Sonuçlarımızda BA, 12 saatten itibaren 75  $\mu$ M ve üzeri konsantrasyonlarda AKT ifadesini baskılamıştır.

BA, p38 aktivitesini arttırdığı ve AKT aktivitesini baskıladığı için p21 aktivitesinde bir artış olduğu düşünülmektedir. Nitekim JNK aktivitesinin artmasına rağmen c-JUN aktivitesindeki düşüş, p21 üzerinden c-JUN'un baskılandığını düşüncesini desteklemektedir (Şekil 6.6). Bu açıdan bakıldığında BA'nın, JNK üzerinden apoptozu, p38 ve AKT üzerinden hücre döngüsü tutuklanmasını ve proliferasyonun baskılanmasını etkilediği öngörülmektedir. Bununla birlikte BA'nın, ERK aktivitesini baskılaması nedeniyle, bu yolak üzerinden de proliferasyonun durdurulmasına etki ettiği düşünülmektedir.



Şekil 6.6: BA'nın JNK ve p38 stres yolları, ve AKT sağkalım yolağı üzerine etkisi

EGFR'ın diğer bir alt yolağı olan STAT sinyal yolağında yer alan STAT1, STAT3 ve STAT5a moleküllerinin gen ifade düzeyleri incelendiğinde STAT1, STAT3 ve STAT5a ifade düzeylerinde azalma gözlenmiştir. STAT1 ve STAT5a

ifadeleri 3 saatten itibaren baskılanırken STAT3 ifadesinde 24 saatte baskılanma gözlenmiştir. STAT1 üzerine yapılan çalışmalarda STAT1'in apoptoz, hücre büyümesi ve proliferasyon mekanizmalarında rol aldığı ve tümör baskılayıcı özellik gösterdiği üzerinedir [163]. Tümör baskılayıcı özelliğine rağmen STAT1 ekspresyonundaki azalma BA'nın farklı bir yolak üzerinden proliferasyonu baskıladığını göstermektedir. STAT3 ve STAT5 üzerine yapılan çalışmalarda her iki proteinin kanser hücrelerinde sürekli aktif olduğu ve STAT sinyal yolağının inhibisyonunun hücre döngüsü tutuklanmasına ve apoptoza yol açtığı belirtilmiştir [210], [211], [212]. Ayrıca kanser hücreleri normal hücrelerden daha çok STAT aktivitesine bağlıdır [209]. STAT protein inhibitörleri kullanılarak yapılan bir çalışmada STAT3 ve STAT5 inhibisyonunun kanser hücrelerinde apoptoza neden olduğu fakat normal hücrelerin alternatif başka bir yolağı kullanarak büyümeye devam ettiği görülmüştür [211]. Bu açıdan bakıldığında, BA'nın anti-apoptotik ve proliferatif etki gösteren STAT3 ve STAT5a protein ifadelerini baskılaması kanser terapisi için onu ideal bir aday yapmaktadır.

BA aynı zamanda fos proto-onkogeninin transkripsiyonunu düzenleyen Elk1 transkripsiyon faktörünün ifadesini de baskılamıştır. BA'nın Elk1 ifadesini baskılaması onun MAPK yolağı üzerinde en yukarıdan en aşağı yolaktaki moleküle kadar hem fosforilasyon (ERK, p38, JNK, c-JUN) hem ekspresyon (p38, JNK, c-JUN, Elk1) düzeyinde olan etkisini göstermektedir. BA, AP1 transkripsiyon faktörünü oluşturan her iki proteinin (JUN, FOS) ifadelenmesini azalttığı için AP1'in düzenlediği proliferatif genlerin ifadelenmesi de baskılanacaktır.

Tüm sonuçlarımız doğrultusunda BA'nın hem STAT hem MAPK yolları üzerinden proliferasyonu inhibe ettiğini, AKT ve JNK üzerinden apoptozu indükleyerek MAPK üzerinden anti-apoptotik genlerin ifadelenmesini baskıladığını söyleyebiliriz. Bu nedenle BA, hem birden çok yolakta anti-proliferatif özellik gösterdiği için hem de kanser hücreleri üzerinde çok daha etkin olduğu için kemoterapi uygulamaları için araştırılması ve denenmesi gereken bir aday olarak görülebilir.

Son yıllarda kemoterapide kullanılmak üzere kanser hücrelerine normal hücrelerden daha çok sitotoksikite gösteren ajanlar tercih edilmektedir. Bu açıdan bakıldığında sonuçlarımız kapsamında da BA, hem etkin bir ajandır hem de transforme hücrelere daha düşük zaman ve dozda etki göstermektedir. Yapılan bu çalışmayla görülmüştür ki BA, EGFR üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir ve

aşağı yolakta yer alan moleküllerin fosforilasyonlarını (ERK1/2, p38, JNK, c-JUN, AKT) ve ekspresyonlarını (p38, JNK, c-JUN, AKT, Elk1, STAT1,3,5a) etkilemektedir. İzleyen çalışmalarla BA'nın SPC212 hücreleri üzerine apoptotik etkisinin araştırılması ve EGFR yolağının buradaki rolünün analiz edilmesi planlanmaktadır. Ayrıca BA uygulaması sonucunda MAPK yolağının hedef genlerinin (cyclin D, P21) ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelenebilir. Bu şekilde, BA'nın gen seviyesinde hücre proliferasyonuna ve hücre döngüsüne etkisi ortaya çıkarılabilir. BA'nın kanser hücrelerine karşı daha sitotoksik olması ve EGFR aktivitesini baskılaması, onu kanser tedavisinde EGFR inhibitörü olarak kullanmaya uygun bir aday yapmaktadır. Ayrıca uygun doz ve zaman periyodunda EGFR ifadesini de azaltacağından, dirençli EGFR mutantlarının ortaya çıkmasının önüne geçilebilecektir. Bu açıdan bakıldığında, BA gelecekte kullanılabilir bir kemoterapik ajan adayı olarak görülebilir.

## KAYNAKLAR

- [1] Kao S. C. H., Reid G., Lee K., Vardy J., Clarke S., van Zandwijk N., (2010), “Malignant mesothelioma”, *Internal Medicine Journal*, 40(11), 742–50.
- [2] Garland L. L., Rankin C., Gandara D. R., Rivkin S. E., Scott K. M., Nagle R. B., (2007), “Phase II study of erlotinib in patients with malignant pleural mesothelioma: a Southwest Oncology Group Study”, *Journal of Clinical Oncology*, 25(17), 2406–13.
- [3] Govindan R., Kratzke R. A., Herndon J. E., Niehans R., Vollmer D., (2005), “Gefitinib in patients with malignant mesothelioma: a phase II study by the Cancer and Leukemia Group B.”, *Clinical Cancer Research*, 11(6), 2300–04.
- [4] Kelly R.J., Sharon E., Hassan R., (2011), “Chemotherapy and targeted therapies for unresectable malignant mesothelioma”, *Lung Cancer* 73(3), 256–63.
- [5] Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., (1995), “Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis”, *Natural Medical*, 1(10), 1046–51.
- [6] Fulda S., Jeremias I., Steiner H. H., Pietsch T., Debatin K. M., (1999), “Betulinic acid: A new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells”, *International Journal of Cancer*, 82(3), 435 –41.
- [7] Rieber M., Strasberg Rieber M., (1998), “Induction of p53 without increase in p21WAF1 in betulinic acid-mediated cell death is preferential for human metastatic melanoma”, *DNA Cell Biology*, 17(5), 399–406.
- [8] Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F., (2002), “Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells”, *Cancer Letter*, 175(1), 17-25.
- [9] Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., (1997), “Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors”, *Cancer Research*, 57(21), 4956–64.
- [10] Fulda S., Susin S.A., Kroemer G., Debatin K.-M., (1998), “Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells”, *Cancer Research*, 58(19), 4453–60.
- [11] Fulda S., Debatin K.-M., (2000), “Betulin acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors”, *Medical and Pediatric Oncology*, 35(6), 616–18.
- [12] Wick W., Grimm C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M., (1999), “Betulin acid-induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for

new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing”, *J. Pharmacol Exp Ther*, 289(3), 1306–12.

- [13] Syrovets T., Buchele B., Gedig E., Slupsky J.R., Simmet T., (2000), “Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and II alpha”, *Mol Pharmacol*, 58(1), 71– 81.
- [14] Rzeski W., Stepulak A., Szymański M., Sifringer M., Kaczor J., Wejksza K., Zdzisińska B., Kandefer-Szerszeń M., (2006), “Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells”, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 374(1), 11-20.
- [15] Yang L. J., Chen Y., Ma Q., Fang J., He J., Cheng Y. Q., Wu Q. L., (2010), “Effect of betulinic acid on the regulation of Hiwi and cyclin B1 in human gastric adenocarcinoma AGS cells”, *Acta Pharmacol Sin*, 31(1), 66-72.
- [16] Tan Y., Yu R., Pezzuto J. M., (2003), “Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation”, *Clin Cancer Res*, 9(7), 2866-75.
- [17] Fulda S., (2008), “Betulinic Acid for Cancer Treatment and Prevention”, *International Journal Mol Science*, 9(6), 1096-1107.
- [18] Zhao Z., Wang J., Tang J., Liu X., Zhong Q., Wang F., Hu W., Yuan Z., Nie C., Wei Y., (2012), “JNK- and Akt-mediated Puma expression in the apoptosis of cisplatin-resistant ovarian cancer cells”, *Biochem J*, 444(2), 291–301.
- [19] Julie E., Goodman Æ., Marc A., Nascarella Æ., Peter A., (2009), “Ionizing radiation: a risk factor for mesothelioma” *Cancer Causes Control*, 20(8), 1237–54.
- [20] Stanton M. F., Stewart S. E., Eddy B. E., Blackwell R. H., (1959), “Oncogenic effect of tissue-culture preparations of polyoma virus on fetal mice”, *J Natl Cancer Inst*, 23, 1441–75.
- [21] Rabson A. S., Branigan W. J., Legallais F. Y.. (1960), “Lung tumors produced by intratracheal inoculation of polyoma virus in Syrian hamsters” *J Natl Cancer Inst*, 25, 937–65.
- [22] Chabot J. F., Beard D., Langlois A. J., Beard J.W., (1970), “Mesotheliomas of peritoneum, epicardium, and pericardium induced by strain MC29 avian leukosis virus” *Cancer Res*, 30(5), 1287–1308.
- [23] Cicala C., Pompetti F., Carbone M., (1993), “SV40 induces mesotheliomas in hamsters”, *Am J Pathol*, 142(5), 1524–33.
- [24] Pass H. I., Bocchetta M., Carbone M., (2004), “Evidence of an important role for SV40 in mesothelioma”, *Thorac Surg Clin*, 14(4), 489–95.

- [25] Cutrone R., Lednicky J., Dunn G., (2005), "Some oral poliovirus vaccines were contaminated with infectious SV40 after 1961", *Cancer Res*, 65(22), 10273–79.
- [26] Wong M., Pagano J. S., Schiller J. T., (2002), "New associations of human papillomavirus, Simian virus 40, and Epstein-Barr virus with human cancer", *J Natl Cancer Inst*, 94(24), 1832–36.
- [27] Pasello G., Favaretto A., (2009), "Molecular targets in malignant pleural mesothelioma treatment", *Curr Drug Targets*, 10(12), 1235–44.
- [28] Frank E., Mott M. D., (2012), "Mesothelioma: A Review", *The Ochsner Journal*, 12(1), 70–79.
- [29] Cacciotti P., Libener R., Betta P., (2001), "SV40 replication in human mesothelial cells induces HGF/Met receptor activation: a model for viral-related carcinogenesis of human malignant mesothelioma", *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(21), 12032–37.
- [30] Bode, A. M., Dong, Z., (2007), "The functional contrariety of JNK", *Mol Carcinog*, 46(8), 591–598.
- [31] Bocchetta M., Miele L., Pass H. I., Carbone M., (2003), "Notch-1 induction, a novel activity of SV40 required for growth of SV40-transformed human mesothelial cells", *Oncogene*, 22(1), 81–9.
- [32] Bocchetta M., Di Resta I., Powers A., (2000), "Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity", *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(18), 10214–19.
- [33] Kroczyńska B., Cutrone R., Bocchetta M., (2006), "Crocidolite asbestos and SV40 are cocarcinogens in human mesothelial cells and in causing mesothelioma in hamsters", *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(38), 14128–33.
- [34] Mossman B. T., Gruenert D. C., SV40, (2002), "growth factors, and mesothelioma: another piece of the puzzle", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26(2), 167–70.
- [35] Ramos-Nino M. E., Testa J. R., Altomare D. A., Pass H. I., Carbone M., Bocchetta M., (2006), "Cellular and molecular parameters of mesothelioma", *J Cell Biochem*, 98(4), 723–34.
- [36] Edwards J. G., Swinson D. E., Jones J. L., Waller D. A., O'Byrne K. J., (2006), "EGFR expression: associations with outcome and clinicopathological variables in malignant pleural mesothelioma", *Lung Cancer*, 54(3), 399–407.
- [37] Zucali P.A., Ceresoli G.L., De Vincenzo F., Simonelli M., Lorenzi E., Gianoncelli L., Santoro A., (201), "Advances in the biology of malignant pleural mesothelioma", *Cancer Treatment Reviews*, 37(7), 543–58.

- [38] Lee C. W., Anderson H., Martins H., Rao S. C., Sauciuc D., Laurie S. A., (2008), "A phase II trial of gefitinib in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM)", *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 26, 14614.
- [39] Selikoff I. J., Hammond E. C., Seidman H., (1980), "Latency of asbestos disease among insulation workers in the United States and Canada", *Cancer*, 15, 46(12), 2736-40.
- [40] Bocchetta M., Elias S., De Marco M. A., (2008), "The SV40 large T antigen-p53 complexes bind and activate the insulin-like growth factor-I promoter stimulating cell growth", *Cancer Res*, 68(4), 1022-9.
- [41] Velcheti V., Kasai Y., Viswanathan A. K., Ritter J., Govindan R., (2009), "Absence of mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase domain in patients with mesothelioma", *J Thorac Oncol*, 4(4), 559.
- [42] Karrison T., Kindler H. L., Gandara D. R., Lu C., Guterz T. L., Nichols K., (2007), "Final analysis of a multi-center, double-blind, placebo-controlled, randomized phase II trial of gemcitabine/cisplatin (GC) plus bevacizumab (B) or placebo (P) in patients (pts) with malignant mesothelioma (MM)", *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 25, 7526.
- [43] Fuhrer G., MD., and Lazarus A. A., MD., (2011), "Mesothelioma", *Disease-a-Month*, 57(1), 40-54.
- [44] Dowell J. E., Kindler H. L., (2005), "Antiangiogenic therapies for mesothelioma", *Hematol Oncol Clin North Am*, 19(6), 1137-45.
- [45] Jasani B., PhD, MBChB, FRCPath; Gibbs A., MBChB, FRCPath., (2012), "Mesothelioma Not Associated With Asbestos Exposure", *Arch Pathol Lab Med.*, 136(3), 262-67.
- [46] Wagner J. C., Skidmore J. W., Hill R. J., Griffiths D. M., (1985), "Erionite exposure and mesotheliomas in rats", *Br J Cancer*, 51(5), 727-30.
- [47] Baas P., Boogerd W., Dalesio O., Haringhuizen A., Custers F., van Zandwijk N., (2005), "Thalidomide in patients with malignant pleural mesothelioma" *Lung Cancer*, 48(2), 291-96.
- [48] Dowell J. E., Kindler H. L., (2005), "Antiangiogenic therapies for mesothelioma", *Hematol Oncol Clin North Am*, 19(6), 1137-45.
- [49] Jahan T. M., Gu L., Wang X., Kratzke R. A., Dudek A. Z., Green M. R., (2008), "Vatalanib (V) for patients with previously untreated advanced malignant mesothelioma (MM): a phase II study by the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 30107)", *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 24, 7081.
- [50] Gordon G. J., Mani M., Maulik G., Mukhopadhyay L., Yeap B. Y., Kindler H. L., (2008), "Preclinical studies of the proteasome inhibitor bortezomib in

- malignant pleural mesothelioma”, *Cancer Chemother Pharmacol*, 61(4), 549–58.
- [51] Sartore-Bianchi A., Gasparri F., Galvani A., Nici L., Darnowski J. W., Barbone D., (2007), “Bortezomib inhibits nuclear factor-kappaB dependent survival and has potent *in vivo* activity in mesothelioma”, *Clin Cancer Res*, 13(19), 5942–51.
- [52] Marks P. A., Richon V. M., Miller T., Kelly W. K., (2004), “Histone deacetylase inhibitors”, *Adv Cancer Res*, 91, 137–68.
- [53] Freiman R. N., Tjian R., (2003), “Regulating the regulators: lysine modifications make their mark”, *Cell*, 112(1), 11–17.
- [54] Cao X. X., Mohuiddin I., Ece F., McConkey D. J., Smythe W. R., (2001), “Histone deacetylase inhibitor downregulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma”, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25(5), 562–68.
- [55] Krug L. M., Curley T., Schwartz L., Richardson S., Marks P., Chiao J., Potential role of histone deacetylase inhibitors in mesothelioma: clinical experience with suberoylanilide hydroxamic acid, *Clin Lung Cancer*, 7(4), 257–61.
- [56] Dudek A., Pang H., Kratzke R. A., Otterson G. A., Vokes E. E., Kindler H. L., (2010), “CALGB 30601: a phase II study of dasatinib (D) in patients (pts) with previously treated malignant mesothelioma (MM)”, *J Clin Oncol (ASCO Meeting Abstracts)*, 28, 7037.
- [57] Suzuki Y., Kohyama N., (1984), “Malignant mesothelioma induced by asbestos and zeolite in the mouse peritoneal cavity”, *Environ Res*, 35(1), 277–92.
- [58] Porta C., Mutti L., Tassi G., (2007), “Negative results of an Italian Group for Mesothelioma (G.I.Me.) pilot study of single-agent imatinib mesylate in malignant pleural mesothelioma”, *Cancer Chemother Pharmacol*, 59(1), 149–50.
- [59] Ali Y., Lin Y., Gharibo M. M., Gounder M. K., Stein M. N., Lagattuta T. F., (2007), “Phase I and pharmacokinetic study of imatinib mesylate (Gleevec) and gemcitabine in patients with refractory solid tumors”, *Clin Cancer Res*, 13, 5876–82.
- [60] Carthew P., Hill R. J., Edwards R. E., Lee P. N., (1992), “Intrapleural administration of fibres induces mesothelioma in rats in the same relative order of hazard as occurs in man after exposure”, *Hum Exp Toxicol*, 11(6), 530–34.
- [61] Paoletti L., Batisti D., Bruno C., (2000), “Unusually high incidence of malignant pleural mesothelioma in a town of eastern Sicily: an epidemiological and environmental study”, *Arch Environ Health*, 55(6), 392–98.

- [62] Grandis J. R., Sok J. C., (2004), "Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy", *Pharmacol Ther*, 102, 37–46.
- [63] Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C., Formelli F., (2002), "Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells", *Cancer Letters*, 175(1), 17–25.
- [64] Donaldson K., Murphy F. A., Duffin R., Poland C. A., (2010), "Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma", *Part Fibre Toxicol*, 7, 5–21.
- [65] Poland C. A., Duffin R., Kinloch I., (2008), "Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study", *Nat Nanotechnol*, 3(7), 423–28.
- [66] Dahlgren S., (1967), "Effects of locally deposited colloidal thorium dioxide" *Ann NY Acad Sci*, 145(3), 786–90.
- [67] Ishikawa Y., Mori T., Machinami R., (1995), "Lack of apparent excess of malignant mesothelioma but increased overall malignancies of peritoneal cavity in Japanese autopsies with Thorotrast injection into blood vessels", *J Cancer Res Clin Oncol*, 121(9–10), 567–70.
- [68] Witherby S. M., Butnor K. J., Grunberg S. M., (2007), "Malignant mesothelioma following thoracic radiotherapy for lung cancer", *Lung Cancer* 57(3), 410–13.
- [69] Garrett T. P., McKern N. M., Lou M., (2002), "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha", *Cell*, 110, 763–73.
- [70] Bouyain S., Longo P. A., Li S., (2005), "The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(42), 15024–29.
- [71] Dawson J. P., Berger M. B., Lin C. C., (2005), "Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface", *Mol Cell Biol*, 25(17), 7734–42.
- [72] Jahan T. M., Gu L., Wang X., Kratzke R. A., Dudek A. Z., Green M. R., (2006), "Vatalanib (V) for patients with previously untreated advanced malignant mesothelioma (MM): a phase II study by the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 30107)", *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 24, 7081.
- [73] Citri A., Yarden Y., (2006), "EGF-ERBB signalling: towards the systems level", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7), 505–16.

- [74] Tzahar E., Waterman H., Chen X., (1996), “A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor”, *Mol Cell Biol*, 16(10), 5276–87.
- [75] Baselga J., Albanell J., (2002), “Epithelial growth factor receptor interacting agents”, *Hematol Oncol Clin North Am*, 16(5), 1041–63.
- [76] Jackman D. M., Kindler H. L., Yeap B. Y., Fidas P., Salgia R., Lucca J., (2008), “Erlotinib plus bevacizumab in previously treated patients with malignant pleural mesothelioma”, *Cancer*, 113(4), 808–14.
- [77] Roepstorff K., Grovdal L., Grandal M., (2008), “Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer”, *Histochem Cell Biol*, 129(5), 563–78.
- [78] Small G. R., Nicolson M., Buchan K., Broadhurst P., (2008), “Pericardial malignant mesothelioma: a latent complication of radiotherapy?”, *Eur J Cardiothorac Surg*, 33(4), 745–47.
- [79] Lamaze C., Schmid S. L., (1995), “The emergence of clathrin-independent pinocytotic pathways”, *Curr Opin Cell Biol*, 7, 573–80.
- [80] Jiang X., Sorkin A., (2003), “Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation”, *Traffic*, 4(8), 529–43.
- [81] Le Roy C. and Jeffrey L., (2005), “Wrana Clathrin- and non clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(2), 112–26.
- [82] Lenferink A. E., Pinkas-Kramarski R., van de Poll M. L., (1998), “Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers”, *EMBO J*, 17(12), 3385–97.
- [83] Decker S. J., (1990), “Epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  induce differential processing of the epidermal growth factor receptor”, *Biochem Biophys Res Commun*, 166(2), 615–21.
- [84] Ebner R., Derynck R., (1991), “Epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$ : differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes”, *Cell Regul*, 2(8), 599–612.
- [85] Lin S. Y., Makino K., Xia W., (2001), “Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor”, *Nat Cell Biol*, 3(9), 802–8.
- [86] Nowak A. K., Millward M., Francis R. J., Hasani A., van der Schaaf A. A., Seguard T., (2010), “Final results of a phase II study of sunitinib as second-line therapy in malignant pleural mesothelioma (MPM)” *J Clin Oncol (ASCO Meeting Abstracts)*, 28(15), 7036.

- [87] Zucali P. A., Giaccone G., (2006), “Biology and management of malignant pleural mesothelioma”, *Eur J Cancer*, 42(16), 2706–14.
- [88] Heintz N. H., Janssen-Heininger Y. M., Mossman B. T., (2010), “Asbestos, lung cancers, and mesotheliomas: from molecular approaches to targeting tumor survival pathways”, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42(2), 133-139.
- [89] Marti U., Burwen S. J., Wells A., (1991), “Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei”, *Hepatology*, 13, 15–20.
- [90] Bertino P., Piccardi F., Porta C., Favoni R., Cilli M., Mutti L., (2008), “Imatinib mesylate enhances therapeutic effects of gemcitabine in human malignant mesothelioma xenografts”, *Clin Cancer Res*, 14(2), 541–48.
- [91] Ferguson K. M., Berger M. B., Mendrola J. M., (2003), “EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization”, *Mol Cell*, 11(2), 507–17.
- [92] Sha S. K., Sato T., Kobayashi H., Ishigaki M., Yamamoto S., Sato H., (2007), “Cell cycle phenotype-based optimization of G2-abrogating peptides yields CBP501 with a unique mechanism of action at the G2 checkpoint”, *Mol Cancer Ther*, 6(1), 147–53.
- [93] Wang S. C., Lien H. C., Xia W., (2004), “Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2”, *Cancer Cell*, 6(3), 251–61.
- [94] Olayioye M. A., Neve R. M., Lane H. A., (2000), “The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer”, *EMBO J*, 19(13), 3159–67.
- [95] Ogiso H., Ishitani R., Nureki O., (2002), “Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains”, *Cell*, 110(6), 775–87.
- [96] Dittmann K., Mayer C., Fehrenbacher B., (2005), “Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase”, *J Biol Chem*, 280(35), 31182–89.
- [97] Seshacharyulu P., Ponnusamy M. P., Haridas D., Jain M., Ganti A., Batra S. K., (2012), “Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy”, *Expert Opin Ther Targets*, 16(1), 15–31.
- [98] Cho H. S., Leahy D. J., (2002), “Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether”, *Science*, 297, 1330–33.
- [99] Lo H. W., Hsu S. C., Ali-Seyed M., (2005), “Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway”, *Cancer Cell*, 7(6), 575–89.

- [100] Huo L., Wang Y. N., Xia W., (2010), “RNA helicase A is a DNA-binding partner for EGFR-mediated transcriptional activation in the nucleus”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(37), 16125–30.
- [101] Toni M., Iida B. M., Li C., Wheeler D. L., (2011), “The Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Network and Its Role in Cancer”. *Discov Med*, 12(66), 419-32.
- [102] Massie C., Mills I. G., (2006), “The developing role of receptors and adaptors”, *Nature Reviews Cancer* 6(5), 403-09.
- [103] Yarden Y., Sliwkowski M. X., (2001), “Untangling the ErbB signalling network”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 127–37.
- [104] Fox S., Smith K., Hollyer J., Greenall M., Hastrich D., Harris A., (1994), “The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: results of 370 patients and review of 3009 patients”, *Breast Cancer Res Treat*, 29(1), 41-9.
- [105] Gasparini G., Gullick W., Bevilacqua P., Sainsbury J., Meli S., Boracchi P., (1992), “Human breast cancer: prognostic significance of the c-erbB-2 oncoprotein compared with epidermal growth factor receptor, DNA ploidy, and conventional pathologic features”, *J Clin Oncol*, 10(5), 686-95.
- [106] Mendelsohn J., Baselga J., (2002), “Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer”, *J Clin Oncol*, 21(14), 2787-99.
- [107] Jänne P. A., TaVaro M. L., Salgia R., Johnson B. E., (2002), “Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling in malignant pleural mesothelioma”, *Cancer Res*, 62(18), 5242–47.
- [108] Nesterov A., Wiley H. S., Gill G. N., (1995), “Ligand-induced endocytosis of epidermal growth factor receptors that are defective in binding adaptor proteins”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(19), 8719–23.
- [109] Mukohara T., Civiello G., Johnson B. E., Jänne P. A., (2005), “Therapeutic targeting of multiple signaling pathways in malignant pleural mesothelioma”, *Oncology*, 68(4-6), 500–10.
- [110] Lynch T. J., Bell D. W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R. A., Brannigan B. W., Harris P. L., Haserlat S. M., Supko J. G., Haluska F. G., Louis D. N., Christiani D. C., Settleman J., Haber D. A., (2004), “Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib”, *N Engl J Med*, 350(21), 2129–39.
- [111] Paez J. G., Jänne P. A., Lee J. C., Tracy S., Greulich H., Gabriel S., Herman P., Kave F. J., Lindeman N., Boggon T. J., Naoki K., Sasaki H., Fujii Y., Eck M. J., Sellers W. R., Johnson B. E., Meyerson M., (2004), “EGFR mutations

in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy”, *Science*, 304(5676), 1497–1500.

- [112] Cai Y., Roggli V., Mark E., Cagle P., Fraire A., (2004), “Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in reactive and malignant mesothelial proliferations”, *Arch Pathol Lab Med*, 128(1), 68—70.
- [113] Dazzi H., Hasleton P., Thatcher N., Wilkes S., Swindell R., Chatterjee A., (1990), “Malignant pleural mesothelioma and epidermal growth factor receptor (EGF-R). Relationship of EGFR with histology and survival using fixed paraffin embedded tissue and the F4, monoclonal antibody”, *Br J Cancer*, 61, 924-26.
- [114] Govindan R., Kratzke R. A., Herndon II J. E., Niehans G. A., Vollmer R., Watson H. L., (2005), “On behalf of the Cancer and Leukemia Group B. Gefitinib in patients with malignant mesothelioma: a phase ii study by the Cancer and Leukemia Group B”, *Clin Cancer Res*, 11(6), 2300-04.
- [115] Ramael M., Segers K., Buysse C., Van den Bossche J., Van Marck E., (1991), “Immunohistochemical distribution patterns of epidermal growth factor receptor in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium”, *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol*, 419, 171—75.
- [116] Trupiano J., Geisinger K., Willingham M., Manders P., Zbieranski N., Case D., (2004), “Diffuse malignant mesothelioma of the peritoneum and pleura, analysis of markers”, *Mod Pathol*, 17(4), 476—81.
- [117] Janne P. A., Taffaro M. L., Salgia R., Johnson B. E., (2002), “Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling in malignant pleural mesothelioma”, *Cancer Res*, 62(18), 5242—47.
- [118] Agarwal V., Lind M. J., Cawkwell L., (2011), “ Targeted epidermal growth factor receptor therapy in malignant pleural mesothelioma: Where do we stand?”, *Cancer Treatment Reviews*, 37(7), 533–42.
- [119] Krab L. C., Goorden S.M , Elgersma Y., (2008), “Oncogenes on my mind: ERK and MTOR signaling in cognitive diseases”, *Trends Genet.*, 24(10), 498–510.
- [120] Pullikuth A. K., Catling A. D., (2007), “Scaffold mediated regulation of MAPK signaling and cytoskeletal dynamics: a perspective”, *Cellular signalling*, 19(8), 1621–32.
- [121] Meloche S., Pouyssegur J., (2007), “The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition”, *Oncogene*, 26(22), 3227–39.
- [122] Yoon S., Seger R., (2006), “The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions”, *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 24(1), 21–44.

- [123] Melo M., Gerbase M. W., Curran J., Pache J. C., (2006). “Phosphorylated extracellular signal-regulated kinases are significantly increased in malignant mesothelioma”, *J Histochem Cytochem*, 54(8), 855–61.
- [124] Zanella C. L., Posada J., Tritton T. R., Mossman B. T., (1996), “Asbestos causes stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1 mitogen-activated protein kinase cascade after phosphorylation of the epidermal growth factor receptor” *Cancer Res*, 56(23), 5334–38.
- [125] Cummins A, B., Palmer C., Mossman B. T., Taatjes D. J., (2003), “Persistent localization of activated extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) is epithelial cell-specific in an inhalation model of asbestosis”, *Am J Pathol*, 162(3), 713–20.
- [126] Manning C. B., Sabo-Attwood T., Robledo R. F., Macpherson M. B., Rincon M., Vacek P., Hemenway D., Taatjes D. J., Lee P. J., Mossman B. T., (2008), “Targeting the MEK1 cascade in lung epithelium inhibits proliferation and fibrogenesis by asbestos”, *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 38(5), 618–26.
- [127] Chen X., Xia S., Li R., Liu H., Huang Y., Qian X., Xiao X., Xu X., Lin X., Tian Y., Zong Y., He D., (2009), “Doxycycline enhances the Ras-MAPK signaling and proliferation of mouse thymic epithelial cells”, *Journal of cellular biochemistry*, 107(3), 494–503.
- [128] Grant S., (2008), “Cotargeting survival signaling pathways in cancer”, *The Journal of clinical investigation*, 118(9), 3003–6.
- [129] Sturgill T. W., (2008), “MAP kinase: it’s been longer than fifteen minutes”, *Biochemical and biophysical research communications*, 371(1), 1–4.
- [130] Fremin C., Ezan F., Boisselier P., Bessard A., Pages G., Pouyssegur J., Baffet G., (2007), “ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: an RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wildtype and ERK1 null hepatocytes”, *Hepatology Baltimore Md*, 45(4), 1035–45.
- [131] Bessard A., Fremin C., Ezan F., Fautrel A., Gailhouste L., Baffet G., (2008), “RNAi-mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells *in vitro* and *in vivo*”, *Oncogene*, 27(40), 5315–25.
- [132] Shukla A., PhD, Hillegass J. M., PhD, MacPherson M. B., BS, Beuschel S. L., BS, Vacek P. M., PhD, Butnor K. J., MD, Pass H. I., MD, Carbone M., MD, PhD, Testa J. R., PhD, Heintz N. H., PhD, Mossman B. T., PhD., (2011), “ERK2 is Essential for the Growth of Human Epithelioid Malignant Mesotheliomas”, *Int J Cancer*, 1, 129(5), 1075–86.
- [133] Hanada N., Lo H. W., Day C. P., (2006), “Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor”, *Mol Carcinog*, 45(1), 10–7.

- [134] Nebreda A. R., Porras A., (2000), "P38 MAP kinases: beyond the stress response", *Trends Biochem Sci*, 25(6), 257–60.
- [135] Kyriakis J. M., Avruch J., (2001), "Mammalian mitogenactivated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation", *Physiol Rev*, 81(2), 807–69.
- [136] Edwards J. G., Swinson D. E., Jones J. L., (2006), "EGFR expression: associations with outcome and clinicopathological variables in malignant pleural mesothelioma" *Lung Cancer*, 54(3), 399– 407.
- [137] Lo H. W., Ali-Seyed M., Wu Y., (2006), "Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1", *J Cell Biochem*, 98(6), 1570–83.
- [138] Madshus I. H., Stang E., (2009), "Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking", *J Cell Sci*, 122(19), 3433–39.
- [139] Wagner E. F., Nebreda A. R., (2009), "Signal integration by JNK and P38 MAPK pathways in cancer Development", *Nature Reviews: CanCer*, 9(8), 537-49
- [140] Chang, L., Karin, M., (2001), "Mammalian MAP kinase signalling cascades", *Nature*, 410(6824), 37–40 .
- [141] Mathy A., Baas P., Dalesio O., van Zandwijk N., (2005), "Limited efficacy of imatinib mesylate in malignant mesothelioma: a phase II trial", *Lung Cancer*, 50(1), 83–6.
- [142] Lo H. W., Hsu S. C., Hung M. C., (2006), "EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocation", *Breast Cancer Res Treat*, 95(3), 211–8.
- [143] Gupta S., (1996), "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors", *EMBO J*, 15(11), 2760–70.
- [144] Cuevas B. D., Abell A. N., Johnson G. L., (2007), "Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration", *Oncogene*, 26(22), 3159–71.
- [145] Reiner T., Parrondo R., de Las Pozas A., Palenzuela D., Perez-Stable C., (2013), "Betulinic Acid selectively increases protein degradation and enhances prostate cancer-specific apoptosis: possible role for inhibition of deubiquitinase activity", *PLoS One*, 8(2), e56234.
- [146] Eferl, R., Wagner E. F., (2003), "AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis", *Nature Rev Cancer*, 3(11), 859–68.

- [147] Altucci L., Gronemeyer H., (2001), "The promise of retinoids to fight against cancer", *Nature Rev Cancer*, 1(3), 181–93.
- [148] Greenman C., (2007), "Patterns of somatic mutation in human cancer genomes", *Nature*, 446(7132), 153–58.
- [149] Jones S., (2008), "Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses", *Science*, 321(5897), 1801–06.
- [150] Hui L., Zatloukal K., Scheuch H., Stepniak E., Wagner E. F., (2008), "Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation", *J. Clin. Invest.*, 118(12), 3943–53.
- [151] Chang, Q., (2009), "Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer", *J Hepatol*, 50(2), 323–33.
- [152] Yoshida S. (2001), "The c-Jun NH2-terminal kinase 3 (JNK3) gene: genomic structure, chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors", *J Hum Genet*, 46(4), 182–87.
- [153] Vivanco I., (2007), "Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN", *Cancer Cell*, 11(6), 555–69.
- [154] Lee J. C., (1994), "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis", *Nature*, 372(6508), 739–46.
- [155] Ni C. Y., Yuan H., Carpenter G., (2003), "Role of the ErbB-4 carboxyl terminus in gamma-secretase cleavage", *J Biol Chem*, 278(7), 4561–5.
- [156] Ono K., Han J., (2000), "The P38 signal transduction pathway: activation and function", *Cell Signal*, 12(1), 1–13.
- [157] Sebolt-Leopold J. S., Herrera R., (2004), "Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer", *Nature Rev Cancer* 4(12), 937–47.
- [158] Mittelstadt P. R., Salvador J. M., Fornace A. J. Jr, Ashwell J. D., (2005), "Activating P38 MAPK: new tricks for an old kinase", *Cell Cycle*, 4(9), 1189–92.
- [159] Bulavin D. V., Fornace, A. J. Jr. (2004), "P38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor", *Adv. Cancer Res*, 92, 95–118.
- [160] Dolado I., Nebreda A. R., (2008), "Regulation of tumorigenesis by P38 $\alpha$ MAP kinase", *Topics in Current Genetics: Stress- Activated Protein Kinases*, 20, 99–128.
- [161] Hui L., Bakiri L., Stepniak E., Wagner E. F., (2007), "P38 $\alpha$ : a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis", *Cell Cycle*, 6(20), 2429–33.

- [162] Iyoda K., (2003), “Involvement of the P38 mitogenactivated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma”, *Cancer*, 97(12), 3017–26.
- [163] Adámková L., Součková K., Kovařík J., (2007), “Transcription Protein STAT1”, *Folia Biologica (Praha)*, 53, 1- 6.
- [164] Bellacosa A., Kumar C. C., Di Cristofano A., Testa J. R., (2005), “Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting”, *Adv Cancer Res*, 94, 29–86.
- [165] Cheon D. J., Orsulic S., (2010), “Mouse Models of Cancer *Annu Rev Pathol*, 6, 95–119.
- [166] Singh M., Johnson L., (2006), “Using genetically engineered mouse models of cancer to aid drug development: an industry perspective”, *Clin Cancer Res*, 12(18), 5312–28.
- [167] Cheung M., Testa J. R., (2013), “Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy”, *Curr Cancer Drug Targets*, 13(3), 234–44.
- [168] Downward J., (2004), “PI 3-kinase, Akt and cell survival”, *Semin Cell Dev Biol*, 15(2), 177–82.
- [169] Pommier Y., Sordet O., Antony S., Hayward R. L., Kohn K. W., (2004), “Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks”, *Oncogene*, 23(16), 2934–49.
- [170] Zhou B. P., Liao Y., Xia W., Zou Y., Spohn B., Hung M. C., (2001), “HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation”, *Nat Cell Biol*, 3(11), 973–82.
- [171] Mayo L. D., Donner D. B., (2001), “A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20), 11598–603.
- [172] Park S., Kim D., Dan H. C., Chen H., Testa J. R., Cheng J. Q., (2012), “Identification of an Akt interaction protein, PHF20/TZP, that transcriptionally regulates p53”, *J Biol Chem*, 287(14), 11151–163.
- [173] Testa J. R., Bellacosa A., (2001), “AKT plays a central role in tumorigenesis” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20), 10983–985.
- [174] Sekido Y., (2010), “Genomic abnormalities and signal transduction dysregulation in malignant mesothelioma cells”, *Cancer Sci*, 101(1), 1-6.
- [175] Janne P. A., Taffaro M. L., Salgia R., Johnson B. E., (2002), “Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling in malignant pleural mesothelioma”, *Cancer Res*, 62(18), 5242-47.

- [176] Nutt J. E., O'Toole K., Gonzalez D., Lunec J., (2009), "Growth inhibition by tyrosine kinase inhibitors in mesothelioma cell lines", *Eur J Cancer*, 45(9), 1684-91.
- [177] Suzuki Y., Murakami H., Kawaguchi K., Tanigushi T., Fujii M., Shinjo K., Kondo Y., Osada H., Shimokata K., Horio Y., Hasegawa Y., Hida T., Sekido Y., (2009), "Activation of the PI3K-AKT pathway in human malignant mesothelioma cells", *Mol Med Rep*, 2(2), 181-8.
- [178] Cacciotti P., Barbone D., Porta C., Altomare D. A., Testa J. R., (2005), "SV40- dependent AKT activity drives mesothelial cell transformation after asbestos exposure", *Cancer Res*, 65(12), 5256-62.
- [179] Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M., (2003), "Natural products as sources of new drugs over the period 1981 -2002", *J Nat Prod*, 66(7), 1022 - 37.
- [180] Fulda S., (2009), "Betulinic acid: A natural product with anticancer activity", *Mol Nutr Food Res*, 53(1), 140 - 46.
- [181] Morrison D. K., Davis R. J., (2003), "Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals", *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 91-118.
- [182] Avruch J., "MAP kinase pathways: the first twenty years", *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1150-60.
- [183] Brabender J., Danenberg K. D., Metzger R., Schneider P. M., Park J., Salonga D., (2001), "Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival", *Clin Cancer Res*, 7(7), 1850-5.
- [184] Ehrhardt H., Fulda S., Fuhrer M., Debatin K. M., Jeremias I., (2004), "Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells", *Leukemia*, 18(8), 1406-12.
- [185] Sanz V., Arozarena I., Crespo P., (2000), "Distinct carboxytermini confer divergent characteristics to the mitogen-activated protein kinase P38 $\alpha$  and its splice isoform Mxi2", *FEBS Lett*, 474(2-3), 169-74.
- [186] Hoshino M., Fukui H., Ono Y., (2007), "Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma", *Pathobiology*, 74(1), 15-21.
- [187] Karin M., Gallagher E., (2005), "From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance", *IUBMB Life*, 57(4-5), 283-95.
- [188] Cole G. W. Jr., Alleva A. M., Reddy R. M., Maxhimer J. B., Zou J., Schrupp D. S., Nguyen D. M., (2005), "The selective epidermal growth factor receptor

tyrosine kinase inhibitor PD153035 suppresses expression of prometastasis phenotypes in malignant pleural mesothelioma cells in vitro”, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 129, 1010–17.

- [189] Zuco, V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., (2002), “Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells”, *Cancer Lett*, 175, 17–25.
- [190] Selzer E., Pimentel E., Wacheck V., Schlegel W., (2000), “Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells”, *J Invest Dermatol*, 114(5), 935–40.
- [191] Shin Y. G., Cho K. H., Chung S. M., Graham J., (1999), “Determination of betulinic acid in mouse blood, tumor and tissue homogenates by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry”, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 732(2), 331 –36.
- [192] Udeani G. O., Zhao G. M., Geun Shin Y., Cooke B. P., (1999), “Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice”, *Biopharm Drug Dispos*, 20(8), 379 –83.
- [193] Liu Y., Luo W., (2012), “Betulinic acid induces Bax/Bak-independent cytochrome c release in human nasopharyngeal carcinoma cells”, *Mol Cells*, 33(5), 517-24.
- [194] Cuenda A., Rousseau S., (2007), “P38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases”, *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1358–75.
- [195] Wang Z., Yang H., Tachado S. D. , Capó Aponte J. E., Bildin V. N., Koziel H., Reinach P. S., (2006), “Phosphatase-Mediated Crosstalk Control of ERK and p38 MAPK Signaling in Corneal Epithelial Cells”, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(12), 5267-75.
- [196] Kwong J., Chen M., Lv D., Luo N., Su W., Xiang R., Sun P., (2013), “Induction of p38 $\delta$  expression plays an essential role in oncogenic ras-induced senescence”, *Mol Cell Biol*, 33(19), 3780-94.
- [197] Sathya S., Sudhagar S., Sarathkumar B., Lakshmi B. S., (2013), “EGFR inhibition by pentacyclic triterpenes exhibit cell cycle and growth arrest in breast cancer cells”, *Life Sciences*, 95(1), 53-62
- [198] Chun J., Kim Y. S., (2013), “Platycodin D inhibits migration, invasion, and growth of MDA-MB-231 human breast cancer cells via suppression of EGFR-mediated Akt and MAPK pathways”, *Chemico-Biological Interactions*, 205(3), 212-21
- [199] Shan J. Z., Xuan Y. Y., Zheng S., Dong Q., Zhang S. Z., (2009), “Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells

- by inhibiting the EGFR/MAPK pathway”, *J Zhejiang Univ Sci B*, 10(9), 668-74.
- [200] Viji V., Helen A., Luxmi V. R., (2011), “Betulinic acid inhibits endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and pro-inflammatory prostaglandin E2 production in human peripheral blood mononuclear cells”, *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1291–1303.
- [201] Selzer E., Thallinger C., Hoeller C., Oberkleiner P., Wacheck V., Pehamberger H., Jansen B., (2002), “Betulinic Acid-induced Mcl-1 Expression in Human Melanoma – Mode of Action and Functional Significance”, *Molecular Medicine*, 8(12), 877–84.
- [202] Alakurtti S., Makela T., Koskimies S., Yli-Kauhaluoma J., (2006), “Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin”, *Eur J Pharm. Sci*, 29(11), 1–13.
- [203] Suzuki Y., Murakami H., Kawaguchi K., Tanigushi T., Fujii M., Shinjo K., Kondo Y., Osada H., Shimokata K., Horio Y., Hasegawa Y., Hida T., Sekido Y., (2009), “Activation of the PI3K-AKT pathway in human malignant mesothelioma cells”, *Mol Med Rep*, 2(2), 181-8.
- [204] Mohiuddin I., Cao X., Ozvaran M. K., Zumstein L., Chada S., Smythe W. R., (2002), “Phosphatase and tensin analog gene overexpression engenders cellular death in human malignant mesothelioma cells via inhibition of AKT phosphorylation”, *Ann Surg Oncol*, 9(3), 310-6.
- [205] Tan Y., Yu R., Pezzuto J. M., (2003), “Betulinic Acid-induced Programmed Cell Death in Human Melanoma Cells Involves Mitogen-activated Protein Kinase Activation”, *Clin Cancer Res*, 9(7), 2866-75.
- [206] Venugopal S. K., Chen J., Zhang Y., Clemens D., Follenzi A., Zern M. A., (2007), “Role of MAPK Phosphatase-1 in Sustained Activation of JNK during Ethanol-induced Apoptosis in Hepatocyte-like VL-17A Cells”, *J. Biol. Chem*, 282(44), 31900-08.
- [207] Wisdom R., Johnson R. S., Moore C., (1999), “c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms”, *EMBO J.*, 18 (1), 188–97.
- [208] Weiss B. L., Whitmarsh A. J., Yang D. D., Rincón M., Davis R. J., Flavell R. A., (2000), “Regulation of c-Jun NH2-terminal Kinase ( Jnk) Gene Expression during T Cell Activation”, *J Exp Med*, 191(1), 139–45.
- [209] Furqan M., Akinleye A., Mukhi N., Mittal V., Chen Y., Liu D., (2013), “STAT inhibitors for cancer therapy”, *Journal of Hematology & Oncology*, 6, 90.

- [210] Lavecchia A., Di Giovanni C., Novellino E., (2011), “STAT-3 inhibitors: state of the art and new horizons for cancer treatment”, *Curr Med Chem*, 18(16), 2359–75.
- [211] Yu H., Jove R., (2004), “The STATs of cancer–new molecular targets come of age”, *Nat Rev Cancer*, 4(2), 97–105.
- [212] Ferbeyre G., Moriggl R., (2011), “The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on*”, *Cancer*, 1815(1), 104–14.
- [213] Angel P., Hattori K., Smeal T., Karin M., (1988), “The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1”, *Cell* , 55 (5), 875–85.
- [214] Schreiber M., Kolbus A., Piu F., Szabowski A., Möhle-Steinlein U., Tian J., Karin M., Angel P., Wagner E. F., (1999)., “Control of cell cycle progression by c-jun is p53 dependent”, *Genes De*, 13 (5), 607–19.
- [215] Feng J., Tamaskovic R., Yang Z., Brazil D. P., Merlo A., Hess D., Hemmings B. A., (2004), “Stabilization of Mdm2 via Decreased Ubiquitination Is Mediated by Protein Kinase B/Akt-dependent Phosphorylation”, *Biological Chemistry*, 279(34), 35510-17.
- [216] Tina M. Thornton, Mercedes Rincon, (2009), “ Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival”, *Int J Biol Sci*, 5(1), 44-52.
- Web 1, (2012), <http://www.crch.org/faculty/jramos/research.html>, (Erişim Tarihi: 07/11/2013).

## ÖZGEÇMİŞ

Hüseyin GÜL 1989 yılında Antalya'da doğdu. 2007 yılında başladığı Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü 2011 yılında tamamladı. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü (GYTE) Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2012-2013 yıllarında 4 ay süreyle Kilis 7 Aralık Üniversitesi'nde araştırma görevliliği görevini yürüttükten sonra GYTE'de araştırma görevlisi olarak işe başladı ve halen aynı görevi yürütmektedir.