

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ABEMASİKLİB'İN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE
TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe GÜNAY

1800000591

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

HAZİRAN 2021

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ABEMASİKLİB'İN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNE
TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe GÜNAY

1800000591

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 28.10.2021

Tezin Savunulduğu Tarih: 01.06.2021

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Elif Damla ARISAN

Doç.Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

HAZİRAN 2021

ÖNSÖZ

Akademik çalışma süresince engin bilgi ve değerli tecrübelerini benden esirgemeyen, gerek doğru çalışma prensipleri, gerekse çalışma ahlakı aşıl原因an, olumsuz şartlar altında dahi anlayışını esirgemeyip çözüm odaklı hareket eden, her daim yetkin bir öğrenci olmam için uğraş veren saygıdeğer tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması kapsamında araştırma konusunu belirleyip ilerlemede bana yol gösterici olan ve aynı zamanda çalışmalarımın şekillenmesinde desteğini esirgemeyen, her daim engin bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık tutan kıymetli ve saygıdeğer Prof. Dr. Elif Damla ARISAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek ders döneminde gerekse tez dönemi süresince tecrübe ve deneyimlerini benimle paylaşan sayın Doç.Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya ayrıca laboratuvar ortamındaki her türlü olumsuz şartlar altında sorunlara çözüm bulmada desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ, Araş. Gör. Burcu AYHAN ŞAHİN, Araş. Gör. Özge BERRAK her şey için çok teşekkür ederim.

Yaptıkları işe olan bağlılıklarını ve sevgilerini her daim hissettiren, bilginin paylaştıkça çoğaldığına inanan, çalışma ortamında her daim destek ve yardımlarını hissettiğim kıymetli dostlarım Mervenur ÇOBAN ve Börteçine SEVGİN'e bana sunmuş oldukları ikincil aile ortamı için çok teşekkür ederim.

Lisans hayatım sonrası yüksek lisansa başlamamda en büyük destekçilerim olan annem Aysel, babam İlyas KESKİN'e, ayrıca yaşının küçüklüğüne rağmen ders çalışmam gerektiğini anlayan biricik oğlum Tuğrul Çağrı'ya ayrıca her daim yanımda olduğunu hissettiren kıymetli eşim Eren Can Şah GÜNAY'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	3
İÇİNDEKİLER.....	4
KISALTMALAR.....	8
SİMGE LİSTESİ	11
ŞEKİL LİSTESİ	12
TABLO LİSTESİ.....	14
ÖZET	15
ABSTRACT	16
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	17
2 GENEL BİLGİLER	20
2.1. KANSER	20
2.1.1. AKCİĞER KANSERİ	20
2.1.2. AKCİĞER KANSERİ EPİDEMİYOLOJİSİ	21
2.1.3. AKCİĞER KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ	22
2.1.4. AKCİĞER KANSERİ MOLEKÜLER MEKANİZMALARI	23
2.1.5. AKCİĞER KANSERİNDE TANI VE TEDAVİ STRATEJİLERİ.....	24
2.2. CDK ‘lar, CDK 4/6 ve CDK 4/6 İNHİBİTÖRLERİ	27
2.2.1. ABEMASİKLİB	29
2.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ.....	31
2.4. ADENNOZİN 5’MONOFOSFAT-AKTİVE EDİLMEMİŞ PROTEİN KINAZ (AMPK) SİNYAL YOLAĞI.....	33
2.5. PI3K/AKT/MTOR SİNYAL YOLAĞI	37
2.6. OTOFAJİ.....	39
2.6.1. Mikrootofaji	41
2.6.2. Şaperon Aracılı Otofaji.....	42
2.6.3. Makrootofaji	43
2.7. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ	45
2.8. APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ	49
2.8.1. Kaspazlar	50
2.8.2. BCL-2 Ailesi.....	52
2.8.3. İçsel Apoptoz Yolağı.....	54
2.8.4. Dışsal Apoptoz Yolağı	55

3 MATERYAL VE YÖNTEMLER	57
3.1.MATERYALLER.....	57
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	57
3.1.2. Hücre Kültürü Malzemeleri.....	57
3.1.3. Kimyasal Maddeler	57
3.1.4. Çözeltiler	57
3.1.5. Antikorlar.....	57
3.2. YÖNTEMLER.....	57
3.2.1. Model Hücre Hatları.....	57
3.2.2. Hücre Kültürü	58
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması	58
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması	59
3.2.5. Hücrelerin Çözülmesi.....	59
3.2.6. Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)	59
3.2.7. Hücre Sağ kalım Analizi	60
3.2.8. Yara İyileşme Deneyi.....	60
3.2.9. Asılı Damla Hücre Modeli.....	61
3.2.10. Hücre Akış Sitometrisi ile PI Boyama Analizi	61
3.2.11. Total Protein İzolasyonu.....	61
3.2.12. Fosfatlanmış Protein İzolasyonu	62
3.2.13. Protein Miktarının Bradford Analizi ile Belirlenmesi.....	62
3.2.14. İmmünoablota Analizi	63
3.2.14.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması.....	63
3.2.14.2. SDS-PAGE	63
3.2.14.3. Proteinlerin Membran Üzerine Transferi ve Membran Bloklama	63
3.2.14.4. Antikor Bağlanması ve Membranların Görüntülenmesi	64
3.2.15. Floresan Boyama.....	64
3.2.15.1. Propidyum İyodür (PI) Boyama	64
3.2.15.2. 3,3-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DIOC ₆) Boyama	64
3.2.15.3. 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama.....	65
3.2.15.4. MitoTracker Boyama.....	65
3.2.15.5. Akridin Turuncusu (AO) Boyama	66
3.2.15.6. BODIPY Boyama.....	66

3.2.16. İstatistiksel Analizler	66
4 SONUÇLAR.....	67
4.1 ABEMASİKLİB UYGULAMASI A549 KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI VE BEAS-2B NORMAL BRONŞİYAL EPİTEL HÜCRE HATTI ÜZERİNDE HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	67
4.2 ABEMASİKLİB UYGULAMASI A549 KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI VE BEAS-2B NORMAL BRONŞİYAL EPİTEL HÜCRE HATTI ÜZERİNDE ZAMANA BAĞLI HÜCRE SAĞKALIMI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	68
4.3 ABEMASİKLİB UYGULAMASI A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE FLORESAN BOYALAR ARACILIĞIYLA CANLI VE ÖLÜ HÜCRE OLUŞUMLARININ BELİRLENMESİ	70
4.4 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE MİTOKONDRIYAL MEMBRAN POTANSİYELLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	71
4.5 ABEMASİKLİB UYGULAMASI İLE A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE AKRİDİN TURUNCUSU FLORESAN BOYAMA İLE GÖSTERİLEREK OTOFAJİK VAKUOL OLUŞUMLARININ İNCELENMESİ	72
4.6 BODPY BOYAMASI İLE ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE LİPİD DAMLACIKLARINA ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	73
4.7 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	74
4.8 A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ABEMASİKLİB UYGULAMASININ 3D SFEROİD HÜCRE MODELİ İLE GÖSTERİLMESİ	75
4.9 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE ETKİSİNİN YARA İYİLEŞME YÖNTEMİYLE GÖSTERİLMESİ	78
4.10 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN İMMÜNOBLOTLAMA İLE GÖSTERİLMESİ.....	80
4.11 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA ENERJİ METABOLİZMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	81
4.12 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA PI3K-mTOR-akt YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	82
4.13 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA OTOFAJİ YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ.....	84

4.14 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	85
4.15 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ.....	87
5 TARTIŞMA.....	90
6 KAYNAKÇA	102
7 EKLER	122
Ek A: Cihazlar	122
Ek B: Hücre Kültürü Donanımları.....	126
Ek C: Kimyasal Maddeler	130
Ek D: Kullanılan Çözeltiler	136
EK E: Antikorlar	148

KISALTMALAR

Akt:	Protein kinaz B
AMP:	Adenozin monofosfat
AMPK:	AMPK-aktive protein kinaz
AO:	Akridin turuncusu
APS:	Amonyum persülfat
ATCC:	American Tissue Culture Collection
ATG:	Otofaji ilişkili protein
ATP:	Adenozin trifosfat
Bad:	Bcl2- ilişkili hücre ölüm agonisti
Bak:	Bcl2- antagonist proteini
Bax:	Bcl2- ilişkili X proteini
Bcl-2:	B hücresi lenfoma -2
Bcl-xL:	Bcl2- benzeri protein-1
Beclin-1:	Bcl2 etkileşimli protein
Bid:	BH3-etkileşim bölgesi ölüm antagonisti
Bik:	Bcl2- etkileşimli ölüm proteini
Bim:	Bcl2- benzeri protein-11
BSA:	Sığır Serum Albumin
CAK:	CDK aktifleştirici kinaz
CDK:	Sikline bağımlı kinaz
CDKi:	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü
CHOP:	CCAAT/-arttırıcı bağlanma protein homologu olan protein
GAPDH:	Gliseraldehit 3-fosfat-dehidrogenaz
CLB:	Hücre özütleme tamponu
DAPI:	4,6'-diamidino-2-fenilindol

DiOC₆:	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
DISC:	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
ER:	Endoplazmik retikulum
FBS:	Fetal sığır serumu
GTP:	Guanozin trifosfat
LC3:	Mikrotübül ilişkili protein-hafif zincir 3
MAPK:	Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
mTOR:	Memeli rapamisin hedefi
mTORC1/2:	mTOR kompleks 1/2
MTT:	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
p70s6k:	Ribozomal protein s6 kinaz beta-1
PARP:	Poli-ADP riboz polimeraz
PBS:	Fosfat tamponlu tuz
PI:	Propidyum iyodür
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-kinaz
PS:	Fosfatidilserin
PVDF:	Poliviniliden florid
Raptor:	mTOR -ilişkili düzenleyici protein
ROS:	Reaktif oksijen türevi
SDS:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE:	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
Ser:	Serin
TBS:	Tris tamponlu tuz

TBS-T:	TBS-Tween
TEMED:	Tetra metil etilen diamin
Thr:	Treonin
Tyr:	Tirozin
UPR:	Katlanmamış protein cevabı
UV:	Ultraviyole



SİMGE LİSTESİ

%:	Yüzde
°C:	Santigrat derece
µg:	Mikrogram
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar
cm²:	Santimetre kare
g:	Santrifüj kuvveti
gr:	Gram
kDa:	Kilodalton
L:	Litre
M:	Molar
mA:	Miliamper
ml:	Mililitre
mm:	Milimetre
nm:	Nanometre
pH:	Hidrojen kuvveti
rpm:	Dakikadaki dönüş sayısı
sa:	Saat
V:	Volt

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Erkeklerde ve Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2016) (Dünya Standart Nüfuzu, 100.000 Kişide)	21
Şekil 2. Akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanser ve skuamöz hücreli kanserler de gen mutasyonları.....	24
Şekil 3. Akciğer kanseri evreleri	26
Şekil 4. CDK inhibitörleri tarafından engellenen enzimatik reaksiyonlar	29
Şekil 5. Abemasiklib moleküler ifadesi	31
Şekil 6. Hücre döngüsünün genel ifadesi [33]	33
Şekil 7. AMPK alt birimleri [121].....	35
Şekil 8. AMPK tarafından düzenlenen hedef proteinler ve metabolik yollar [122] ...	36
Şekil 9. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı	39
Şekil 10. Otofajinin üç farklı moleküler mekanizması	41
Şekil 11. Şaperon aracılı otofaji yolağı.....	43
Şekil 12. Makrotofaji moleküler mekanizması [96]	45
Şekil 13. Endoplazmik Retikulum molekülü ve diğer organellerle olan teması	46
Şekil 14. Endoplazmik retikulum stresi sonucu katlanmamış protein cevabının moleküler mekanizması [82]	48
Şekil 15. Apoptozun moleküler mekanizması [102]	50
Şekil 16. Kaspazların moleküler yapısı ve fonksiyonel sınıflandırılması [116]	52
Şekil 17. Bcl-2 protein ailesinin moleküler yapısı ve domainleri	53
Şekil 18. İçsel Apoptoz Yolağı [106]	55
Şekil 19. Dışsal Apoptoz Yolağı [110]	56
Şekil 20. A549 ve Beas-2B hücre hatlarında abemasiklib uygulamasının bağıl hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı etkilerinin MTT yöntemi ile gösterilmesi (****P<0,0001; ***P=0,0008)	68
Şekil 21. A549 ve Beas-2B hücre hatlarında abemasiklib uygulamasının hücre sağkalımı üzerinde zamana bağlı etkinliğinin gösterilmesi (****P<0,0001; ns).....	69
Şekil 22. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının hücre ölümü üzerinde etkisinin PI, DIOC ₆ ve DAPI floresan boya ile gösterilmesi	71
Şekil 23. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının MitoTracker ve DAPI floresan boya ile gösterilmesi	72
Şekil 24. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının akridin turuncusu floresan boyası ile gösterilmesi	73
Şekil 25. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının bodpy ve DAPI floresan boya ile gösterilmesi	74
Şekil 26. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının hücre döngüsü üzerinde etkisinin PI boyama yöntemi ile akış sitometrisinde gösterilmesi ..	75
Şekil 27. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının 3D sferoid yapısı ile koloni oluşum potansiyellerinin gösterilmesi (****P<0,0001; **P=0,0081; ns).....	77

Şekil 28. A549 ve Beas-2B hücre hatları üzerine abemasiklib uygulamasının yara iyileşme üzerine etkisinin gösterilmesi (****P<0,0001; ***P=0,0009; ***P=0,0002; **P=0,0068; *P=0,0297; ns)	80
Şekil 29. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları üzerine etkisinin immüno blotlama aracılığıyla gösterilmesi	81
Şekil 30. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları üzerindeki enerji metabolizmasına bağlı etkisinin gösterilmesi	82
Şekil 31. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları ile PI3K yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi	84
Şekil 32. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları ile PI3K yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi	85
Şekil 33. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları ile Endoplazmik Retikulum Stresi üzerine etkisinin gösterilmesi	87
Şekil 34. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatlarının apoptoz üzerine etkisinin gösterilmesi	89

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Laboratuvarda kullanılan cihazlar	86
Tablo 2. Hücre kültüründe kullanılan malzemeler	88
Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	90
Tablo 4. 10X Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), pH:7,4	93
Tablo 5. Hücre Dondurma Medyası	94
Tablo 6. 1,5 Molar Tris-Baz Çözeltisi, pH:8,8	94
Tablo 7. 0,5 Molar Tris-Baz Çözeltisi, pH:6,8	94
Tablo 8. Hücre Lizis Tamponu (CLB)	94
Tablo 9. 5X Laemmli Tamponu	95
Tablo 10. %10(w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi	95
Tablo 11. %30 (v/v) Akrilamid/Bis-Akrlamid Çözeltisi	95
Tablo 12. %10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS)	95
Tablo 13. %12 (v/v) Poliakrilamid Jel	96
Tablo 14. 10X Yürütme Tamponu, pH:8,3	96
Tablo 15. 10X Transfer Tamponu, pH:8,3	96
Tablo 16. 10X Tris Tampon Çözeltisi (TBS), pH: 7,6	97
Tablo 17. %5 (w/v) Süt Çözeltisi	97
Tablo 18. Bradford Çözeltisi	97
Tablo 19. 1M Tris-Baz Çözeltisi, pH: 8,5	98
Tablo 20. Kumarik Asit Çözeltisi	98
Tablo 21. Luminol Çözeltisi	98
Tablo 22. Kemiluminesans Çözeltisi	98
Tablo 23. PBS/BSA Çözeltisi	99
Tablo 24. Blok Çözeltisi	99
Tablo 25. Çalışmada kullanılan antikorlar	99

ÖZET

Akciğer kanseri, kanserin sebep olduğu ölüm nedenleri arasında kanser türleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Akciğer kanseri gittikçe artan görülme sıklığı ve tedavinin sağlanma oranlarındaki dünya çapındaki düşük düzeylerdeki seyri moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu kapsamda hücre döngüsünde kritik rol oynayan CDK 4/6 proteinlerinin ve blokajlarını sağlayan inhibitörlerin rolü değerlendirilmek istenmiştir. Düşük dozda dahi efektif rol oynayan abemasiklib antineoplastik aktivitesi CDK4 ve CDK6'nın ATP-bağlama alanının yarışıl bir inhibitörü olarak hareket etmesidir. Ayrıca CDK4'e karşı afinitesi CDK6'ya göre 14 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Abemasiklib diğer CDK 4/6 inhibitörlerinden olan palbosiklib ve ribosiklib ile kıyaslandığında CDK4-siklin D1 kompleksi için yüksek seçicilik göstermektedir. Abemasiklib fonksiyonel grubu sayesinde, palbosiklib ve ribosiklibe kıyasla CDK4/6 ATP yarıktta daha iyi bir tamamlayıcı etki göstermektedir. Abemasiklibin bu kapsamdaki hücresel düzeydeki rolü aydınlatılmak istenmiştir. Bu sebeple yağ metabolizması, otofajik süreç ve daha önce araştırılmamış olan endoplazmik retikulum stresi üzerindeki etkisine odaklanılmıştır. Aynı zamanda PI3K/akt/mTOR yolu üzerindeki rolü de araştırılmıştır. Akciğer kanserinde abemasiklibin rolü irdelenmek üzere *in vitro* analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ve bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B hücreleri kullanılmıştır. Akciğer kanseri hücrelerine abemasiklib uygulaması hücresel düzeyde proliferasyona ket vurmaktadır. Aynı zamanda enerji metabolizmasında kritik rol oynayan AMPK protein ifadesinde ki azalmada abemasiklibin enerji metabolizmasını engelleyici yönde ilerlediğini göstermektedir. Gerçekleştirilen floresans boyalar ile de AMPK yolu üzerindeki etkisi desteklenmektedir. *In vitro* analizler sonucu akciğer kanseri hücre hatlarında abemasiklib uygulaması endoplazmik retikulum stresine neden olarak apoptotik sürecin desteklendiği ve hücresel düzeyde anti-tümöral aktivite gösterdiği sonucu ortaya çıkarılmıştır.

ABSTRACT

Lung cancer ranks first among cancer types among the causes of death caused by cancer. The increasing incidence of lung cancer and the worldwide low level of treatment delivery show that its molecular mechanism should be elucidated and new treatment strategies should be developed. In this context, the role of CDK 4/6 proteins, which play a critical role in the cell cycle, and inhibitors that provide their blockade were evaluated. The antineoplastic activity of abemaciclib, which plays an effective role even at low doses, is that it acts as a competitive inhibitor of the ATP-binding site of CDK4 and CDK6. In addition, its affinity for CDK4 has been shown to be 14 times stronger than CDK6. Abemaciclib shows high selectivity for the CDK4-cyclin D1 complex compared to palbociclib and ribociclib, which are other CDK 4/6 inhibitors. Thanks to the abemaciclib functional group, CDK4 / 6 ATP has a better complementary effect in the cleft than palbociclib and ribociclib. The role of abemaciclib at the cellular level in this context has been aimed to be elucidated. Therefore, the focus is on fat metabolism, autophagic process and its effect on endoplasmic reticulum stress, which has not been investigated before. It has also been investigated in its role on the PI3K/Akt /mTOR pathway. *In vitro* analyzes were performed to examine the role of abemaciclib in lung cancer. For this purpose, A549, a lung cancer cell line, and Beas-2B, a bronchial epithelial cell line, were used. Abemaciclib application to lung cancer cells inhibits proliferation at the cellular level. It also shows that abemaciclib inhibits energy metabolism in the decrease in AMPK protein expression, which plays a critical role in energy metabolism. The effect on the AMPK pathway is also supported by the fluorescence staining performed. As a result of *in vitro* analysis, it was revealed that abemaciclib application in lung cancer cell lines caused endoplasmic reticulum stress, supporting the apoptotic process and demonstrating anti-tumoral activity at the cellular level.

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri pulmoner karsinom olarak da adlandırılan, tüm dünyada kanser sıralamasında ilk sıralarda yer alan ve ölüm oranı oldukça yüksek olan kanser türüdür. Dünya nüfusundaki artış ve yaşlanmaya bağlı olarak bu oran gün geçtikçe artmaktadır [4]. 1950'lerin sonlarında sigara kullanımına bağlı olarak tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu halini almaktadır. Ülkemizde ve dünya genelinde erkekler de görülme sıklığı ilk sıralarda yer alırken kadınlarda da dördüncü sırada yer almaktadır. Bu derece önemli olan kanser türünün nedenleri de oldukça önem arz etmektedir. Tütün ve tütün ürünlerinin kullanımının yanı sıra çeşitli kimyasal gazlar, genetik ve çevresel faktörler önemli bir yer tutmaktadır [7]. Ölüm oranı oldukça yüksek olan akciğer kanserinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması üzerine yapılan çalışmalar önem arz etmektedir. Akciğer kanserinde görülen gen mutasyonları arasında EGFR (Epidermal büyüme faktörü reseptör gen), ALK (anaplastik lenfoma kinaz gen), MET (mezankimal-epitelyal transizyon), ROS-1 (ROS proto-onkogen 1, reseptör tirozin kinaz), BRAF (v-Raf murin sarkomu viral onkogen homologu B) ve KRAS (Kirsten rat sarkoma 2 viral onkogen homolog) yer almaktadır [11]. Buna bağlı olarak yapılan çalışmaların yetersizliği ve akciğer kanserinin aydınlatılmasına bağlı olarak tedavi stratejilerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Kanser çeşitleri arasında en belirgin ortak özellik hücresel proliferasyondur. Buna bağlı olarak hücre döngüsü oldukça önemli olarak görülmektedir. Akciğer kanseri hücrelerinin hücre döngüsü sırasında proliferasyonuna ket vurulması ile döngü sistemini engellemek ve kanser hücrelerinin sayısının kontrolsüzce gerçekleşmesi engellenmeye çalışılmıştır. Buna bağlı olarak yeni jenerasyon inhibitörlerinden olan CDK 4/6 inhibitörleri son dönemde kanser tedavi stratejileri arasında yer almaktadırlar. Hücre döngüsü sisteminin düzensizliği ve sikline bağımlı kinazların (CDK) hücre döngüsünün ilerlemesini teşvik etmesi yoluyla anormal hücresel proliferasyona yol açar. CDK 4/6, RB hiper-fosforilasyonunu, E2F transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu indükleyen ve S fazı boyunca hücre döngüsü ilerlemesini teşvik eden proliferatif sinyale cevap olarak aktiveleştirilen sikline bağlı kinazlardır [37]. Palbosiklib, abemasiklib, ribosiklib CDK 4/6'nın farmakolojik inhibisyonunu sebep olarak, kanser hücrelerinin proliferasyonuna ket vurmada özellikle meme

kanserinde Faz III alışmaları sonrasında FDA onayı olarak etkin bir şekilde kullanılmaktadır [49]. CDK 4/6 inhibitörleri hali hazırda östrojen reseptörü pozitif, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 negatif, gelişmiş veya metastatik meme kanseri tedavisi için endokrin tedavisi ile birlikte onaylanmıştır. CDK 4/6 inhibitörleri son zamanlarda meme kanseri dışında farklı kanser türlerinde de hücrel ve tümör mikro ortamı üzerine yeni etkiler ortaya koymuştur [123]. Abemasiklib diğer CDK 4/6 inhibitörleri arasında CDK4-siklin D1 kompleksi için yüksek seçicilik göstermektedir. Abemasiklib fonksiyonel grubu sayesinde, palbosiklib ve ribosiklibe kıyasla CDK4/6 ATP yarıktta daha iyi bir tamamlayıcı etki gösterir. Bu nedenle abemasiklib ana etkinliği CDK4 'de görölmektedir. İkinci olarak da, daha düşük etkinlik gücüyle CDK9 ve daha da az ölçüde CDK6 ile etkinlik göstermektedir. Bunların yanında abemasiklib CDK1, CDK2, CDK7, GSK3 α ve CAMKII γ/δ üzerinde de etkinlik göstermektedir [46]. Aynı zamanda abemasiklib düşük konsantrasyon da dahi yüksek etkinlik göstermektedir. Diğer CDK 4/6i karşı dirençli hücreler abemasiklibe karşı direnç göstermemektedir. Ayrıca spesifik olarak kan-beyin bariyerini geçme kabiliyeti mevcuttur ve merkezi sinir sistemini etkileyen metastatik lezyonlar üzerinde antitümör etkileri görölmektedir [42].

Enerji metabolizması AMPK aktivitesi üzerinden ilerlemektedir. AMPK hücrelerin herhangi bir hücrel enerji stresi durumunda uyum sağlanmasında görev almaktadır. Bu süreç zarfında AMPK aktivasyonu ATP tüketimine neden olan anabolik olayları inhibe eder ve ATP üreten katabolik olayları aktive eder [51]. Bu süreç zarfında otofaji ve PI3K/Akt/mTOR yolaklarında da görev almaktadır. Otofaji fizyolojik açıdan besin yoksunluğu gibi açlık strese yanıt olarak aktive olan proteinlerin ve lipidlerin dönüşümü için gerekli bir sistemdir. Uzun süreli açlık durumunda düzenlenmiş programlanmış hücre ölümü (PCD) mekanizması gözlenir [84]. Normal hücre veya kanserli hücreler gibi çeşitli etkenler sonucu değişmiş yapıllı hücrelerde hayatta kalma süreci olarak görölebilmektedirler. Ayrıca otofaji hücrel içeriğin lizozomlara taşınması ve parçalanması yoluyla hücrel enerjinin geri dönüştürölmesini hedeflemektedir. PI3K fizyolojik koşullar altında hücre dışı sinyaller aracılığıyla aktive olmakta ve sonucunda heterodimer konformasyonel değişikliğe uğramaktadır [64]. Bu yolak büyüme faktörü, hormonlar veya sitokinler gibi farklı uyaranlar ile aktive olmaktadır. Çeşitlik büyüme faktörü ligandları transmembran reseptör tirozin kinaz (RTK)'ın N-terminal hücre dışı bölgesine

bağlanarak RTK'ın sitoplazmik bölgesinde otofosforilasyonu sonucu aktifleşmesi üzerinden ilerlemektedir. ER kontrol sistemi, yanlış katlanmış proteinlerin doğru katlanmasını ya da protein degradasyonuna yönlendirerek protein agregasyonunu engelleyen bir sistemdir [74]. ER kontrol sistemi şaperonlar ve lektinler aracılığıyla gerçekleştirilir. ER kontrol sisteminde oluşan çeşitli fizyolojik ve patolojik etkenler sonucu bir sorun oluşur, bunun sonucunda da katlanmamış/yanlış katlanmış protein birikmesi oluşarak endoplazmik retikulum stresi meydana gelir. Doğru protein katlanması protein sentezinde oldukça önemlidir [76]. Endoplazmik retikulum stresi besin yoksunluğu, pH değişikliği, değişmiş glikolizasyon, kalsiyum yoksunluğu, oksidatif stres, DNA hasarı, viral enfeksiyon ve ATP tükenmesi sonrasında meydana gelmektedir [74]. ER stresi sonucu üç temel yolak aktifleşecek hücresel strese karşı cevap üretilmesini hedeflemektedirler. Bu yolaklar aynı anda veya farklı zamanlarda stres boyutuna göre aktifleşebilirler. Hücresel stres sırasında hücrelerin temel amacı ER homeostazinin geri kazanmak için UPR (katlanmamış protein cevabı) olarak adlandırılan evrimsel süreçte korunmuş olan sinyal iletim yolağının aktifleştirilmesidir [77]. Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz çeşitli fizyolojik süreçlerde rol almaktadır. İşlevini yerine getiremeyen hücreler, tümör hücreleri ve patojen aracılı enfekte olmuş hücrelerin organizmadan yok edilmesinde oldukça önemlidir. Apoptotik sürecin hatalı gerçekleşmesi veya deregülasyonu kanser ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli sorunlara yol açmaktadır. Aynı zamanda aşırı apoptoz ise nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hastalıklar ve AIDS gibi hastalıkların gelişimine neden olabilmektedir [100]. Apoptotik hücre ölümü sürecinde pek çok anahtar rol oynayan proteinler bulunmaktadır. Kaspazlar olarak adlandırılan sistein-aspartik proteazlar ile hücresel ölüme hazırlık, hücresel yapıların degradasyonu ve çevresel hücrelerde stresin minimum da tutulması gibi süreçlerde etkin rol oynamaktadırlar. Bcl-2 ailesi proteinleri hem apoptotik süreci tetiklemede hem de anti-apoptotik süreçte apoptozun engellenmesinde görev almaktadır [101].

Bu tez çalışmasının amacı yapılan *in vitro* çalışmalar ile akciğer kanseri hücrelerinde uygulanan LY2835219 olarak adlandırılan abemasiklib CDK 4/6 inhibitörünün, endoplazmik retikulum stresine bağlı olarak gerçekleşen apoptotik hücre ölümünün ve buna bağlı olarak AMPK enerji metabolizmasında ki rolü ile PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerindeki etkinliği ve otofajik süreçteki rolünü irdeleyerek ele alınması sonucu gelecek çalışmalar için öncü veri oluşturulması hedeflenmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

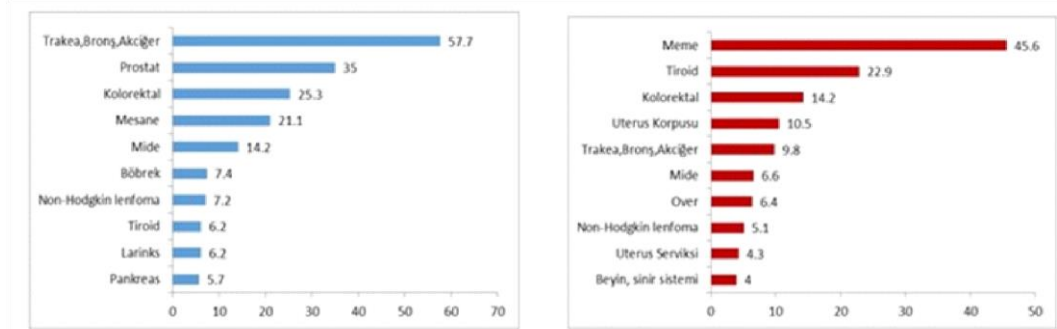
Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin bölünmesi, çoğalması ve birikmesi sonucu oluşan malign tümörlerdir. Hücrelerin özellikle büyüme ve gelişmesi ile ilgili fonksiyonlarını kontrol eden genlerdeki değişimin neden olduğu genetik bir hastalıktır. Bazı çevresel etkenlerin neden olduğu DNA hasarı veya hatalı bölünme sonucu oluşan genetik değişimler canlı hayatı boyunca meydana gelebilmektedir. Kanser, pek çok araştırmacının gündemi haline gelen ve küresel olarak oldukça hassas yaklaşılan bir sorun olarak görülmektedir. 2012 yılında yapılmış olan bir çalışmada da yaklaşık 8,2 milyon ölümlle sonuçlanan bir hastalık türü olarak yerini almıştır [1]. Dünya sağlık örgütü 2015 verilerine göre 8.80 milyon ile kanser, ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Kanser metastazı ise, hücre-hücre yapışmasındaki kayıp, hücre dışı matriksten ayrılma ve bazal membrana invazyon, intravazasyon kaskadı ile ilerleyen ve kanser hastalarının morbidite ve mortalitesinin büyük bir çoğunluğunu oluşturan, kansere bağlı ölümlerin yaklaşık % 90'ı ile ilişkili olarak görülen bir süreçtir [2].

2.1.1. AKCİĞER KANSERİ

Pulmoner karsinom olarak da adlandırılan, epitel hücrelerinden üretilen akciğer kanseri, akciğerin dokularında kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize malign bir akciğer tümörüdür. Dünya sağlık örgütü akciğer kanserini iki geniş histolojik alt tipte sınıflandırmıştır. Bunlar; small cell lung cancer (SCLC) küçük hücreli akciğer kanseri ve non-small cell lung cancer (NSCLC) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak adlandırılırlar. Bu sınıflandırma işlemi tümörün mikroskopik görüntüsüne dayanarak yapılmaktadır. Bu iki tiplerdeki kanserlerin büyüme hızları, yayılımları ve tedavileri farklılık göstermektedir. Akciğer kanseri alt tipleri arasında yer alan küçük hücreli akciğer kanseri yaklaşık %10-15'ini oluşturur. Aynı zamanda en hızlı büyüyen ve en hızlı yayılım gösteren tipi olarak yer alır. Akciğer kanserinin diğer bir alt tipi olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri en sık görülen akciğer kanseridir ve yaklaşık %85-90'ını oluşturmaktadır [3].

2.1.2. AKCİĞER KANSERİ EPİDEMİYOLOJİSİ

Akciğer kanseri tüm kanser türleri arasında en ölümcül olanıdır ve 1950'lerin başından bu yana erkeklerde ve 1987'den beri de kadınlarda ölüm oranı oldukça yüksek olan kanser türüdür. Özellikle 1950-1988 yılları arasında diğer kanser türleri arasında ölüm oranı en yüksek kanser çeşidi olarak yerini almıştır. Akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi dünyada sırasıyla %11.6 ve %18.4 olarak belirtilmiştir [4]. Uluslararası kanser ajansının verilerine göre akciğer kanseri, dünya genelinde ve Türkiye'de erkekler arasında en sık teşhis edilen kanser tipidir. Aynı zamanda erkekler arasında en sık görülen kansere bağlı ölüm nedenidir. Bunun nedenleri arasında tanı anında akciğer kanseri olan hastaların çoğunun ileri evrede olması yer almaktadır. Kadınlar arasında ise dünyada dördüncü sırada yer alırken Türkiye'de beşinci sırada yer alan ve kansere bağlı ölüm oranı dağılımı dünyada ikinci sırada yer alırken Türkiye'de ilk sırada yer almaktadır [5]. Şekil 2.1 de gösterildiği gibi Türkiye Birleşik Veri Tabanı (TÜİK) 2016 yılı verilerine göre akciğer kanseri erkeklerde ilk sırada yer alırken kadınlarda beşinci sırada yer almaktadır. Görülme sıklığı ise erkeklerde 57.7 iken kadınlarda 9.8 olarak belirtilmiştir [6].



Şekil 1. Erkeklerde ve Kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2016) (Dünya Standart Nüfuzu, 100.000 Kişide)

2.1.3. AKCİĞER KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ

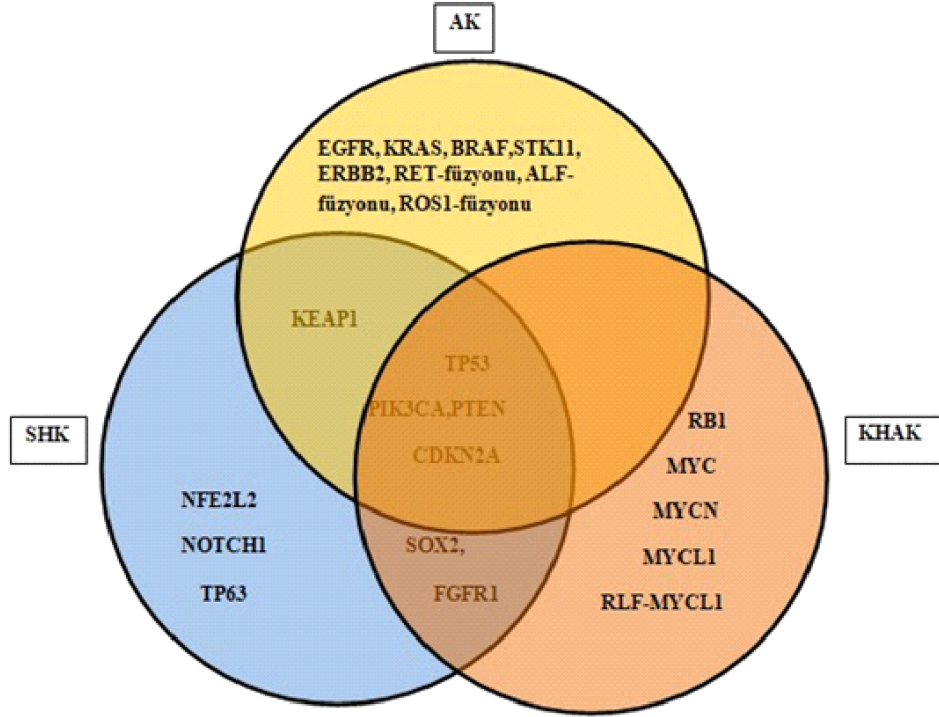
Akciğer kanseri ile ilgili dünya çapında yapılmış olan farklı popülasyonlardan elde edilen epidemiyolojik bulgulara göre akciğer kanserine rastlanma sıklığı kıta, ülke, topluluk ve cinsiyete bağlı olarak farklılık göstermektedir. Akciğer kanseri üzerinde çok çeşitli risk faktörleri yer almaktadır. Bunlar arasında tütün ve tütün ürünleri kullanımı, yaş, çevresel faktörler, genetik faktörler gibi etkenler yer almaktadır. Akciğer kanseri genellikle geç yaşta ve geç bir aşamada teşhis edilir. Bunlar ve bunun gibi diğer faktörler ele alındığında, modern tedavilerle bile hayatta kalma oranı oldukça düşük olduğu anlaşılmaktadır. 5 yıllık tahmini sağ kalım oranları erkeklerde <% 14 ve kadınlarda <% 18 'dir. Akciğer kanserinin gelişmesinde rol oynayan başlıca sosyo-çevresel risk faktörü sigara kullanımıdır. ABD'de sigara kullanımı akciğer kanserlerinin yaklaşık % 80'i ile ilişkili olarak görülmüştür ve akciğer kanseri insidansı ve prevalansındaki coğrafi ve zamansal farklılıklar tütün tüketimindeki farklılıkları yansıtmaktadır. Gelişmiş ülkelerde, akciğer kanseri insidansı ve ölüm oranı genellikle erkeklerde azalmakta ve zamanla erkek tütün tüketiminin önemli ölçüde azalması ve kadın tüketiminin de azalması nedeniyle kadınlarda plato olmaya başlamaktadır [7]. Bunun yanı sıra sigara kullanımının hala endemik olduğu ülkelerde daha yüksek akciğer kanseri insidansı mevcuttur. Sigara kullanımı dışında diğer tütün ürünlerin de bu gruba dahil edilmiştir. Ayrıca bunun yanında da pasif içicilik de akciğer kanseri risk faktörleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Ayrıca sigara kullanımı bazı etkenler sonucu akciğer kanseri risk etkenleri değişiklik göstermektedir. Bunlar arasında en belirgin olan etkenler; sigara içme durumu, sigara içme süresi, günlük sigara kullanım miktarı, içilen paket yılı, sigarayı bıraktıktan sonraki süre gibi etkenler risk belirleyicileri olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra cinsiyet, ırk, etnik köken, eğitim, vücut kitle indeksi, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, amfizem, kişisel kanser öyküsü, kişisel pnömoni öyküsü ve ailede akciğer kanseri öyküsü gibi faktörler de önemli risk faktörleri olarak görülmektedir [8]. Akciğer kanserinin inflamatuvar ve obezite veya metabolik durum ile olan ilişkileri de bildirilmiştir. Çalışmalarda vücut kitle indeksi, lipid seviyeleri, glisemik indeks, insülin düzeyleri akciğer kanseri riski olarak görülmektedir [9].

Asbest, nikel, krom ve arsenik gibi ajanlara mesleki maruziyet; evlerde ve madenlerde radon gazı dahil olmak üzere çeşitli radyasyona maruz kalma durumu; iç ve dış hava kirliliğine maruz kalma durumları da akciğer kanseri risk faktörleri arasında yer almaktadır [10].

Pozitif bir aile öyküsü ile görülen akciğer kanseri olağan durumları da söz konusudur ve ailesel olarak görülen bu kanser türünün genetik bir süreç ile ilerleyişi de söz konusudur. Akciğer kanseri risk faktörlerine dayalı risk tahmin modelleri geliştirilmiştir, ancak klinik olarak yararlı risk sınıflandırması sağlamak için daha fazla veriye ihtiyaç vardır. Akciğer kanseri riski ve erken teşhis için umut verici biyobelirteçler bundan sonraki süreçlerde belirlenmelidir.

2.1.4. AKCİĞER KANSERİ MOLEKÜLER MEKANİZMALARI

Akciğer kanserine yol açan mutasyonların belirlenmesi moleküler mekanizmanın aydınlatılması kapsamında oldukça önem arz etmektedir. Süreç sonrasında tedavi stratejilerinin geliştirilmesi söz konusu olacaktır. Yeni tedavi stratejileri moleküler mekanizmaların aydınlatılması üzerine hastalara kişiye özel tedavi yaklaşımı olanağı sunmaktadır. Akciğer kanseri moleküler mekanizmalarında başlıca görülen biyobelirteçler; EGFR (Epidermal büyüme faktörü reseptör gen), ALK (anaplastik lenfoma kinaz gen), MET (mezankimal-epitelyal transizyon), ROS-1 (ROS proto-onkogen 1, reseptör tirozin kinaz), BRAF (v-Raf murin sarkomu viral onkogen homologu B) ve KRAS (Kirsten rat sarkoma 2 viral onkogen homolog) olarak bildirilmiştir [11]. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde yapılmış olan bir araştırmaya göre adenokarsinomda EGFR pozitifliği %16.1, ALK %6.1, KRAS pozitifliği ise %30.3 civarında tespit edilmiştir [12]. Şekil 2.2 de akciğer kanseri ve alt tiplerinin venn şeması ile gösterimi verilmektedir.



Şekil 2. Akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanser ve skuamöz hücreli kanserler de gen mutasyonları

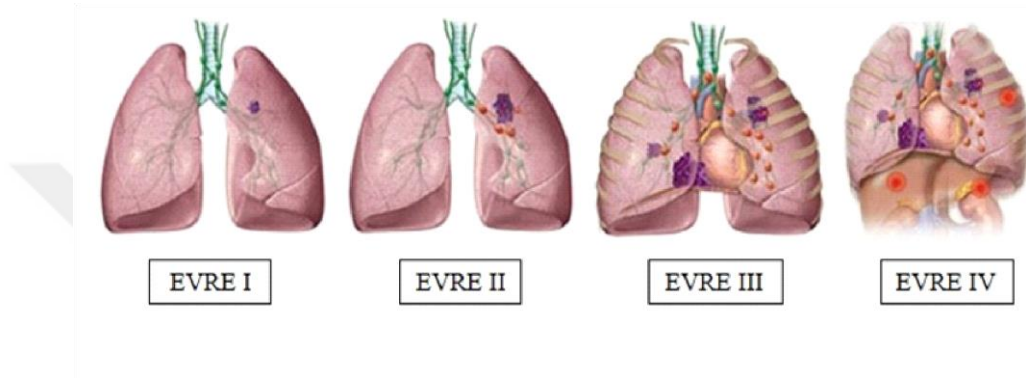
2.1.5. AKCİĞER KANSERİNDE TANI VE TEDAVİ STRATEJİLERİ

Yayılma özelliği oldukça yüksek, hızla metastaz yapan ve yaygın bir kanser olan akciğer kanseri, kanser ölümüne neden olan diğer kanser türleri olan kolon, meme, pankreas ve prostat kanserlerinin toplamından daha fazla ölüme neden olmaktadır [13]. Akciğer kanseri, bronşlardaki birçok farklı bölgede ortaya çıkabilen oldukça heterojen bir yapıya sahiptir ve anatomik konumu nedeniyle de oldukça değişken semptomlar verir. Akciğer kanserinin tanı ve tedavi stratejisinde ki en büyük zorluk kanser tanısının konulması aşamasıdır. Akciğer kanseri belirtileri arasında; uzun süre devam eden sıklığı ve şekli değişen öksürük, kanlı balgam, nefes darlığı, ses kısıklığı, hırıltılı solunum, yutma güçlüğü, kilo kaybı, iştahsızlık, halsizlik, sebebi açıklanamayan ateş, tekrarlayan bronşit ve akciğer enfeksiyonları, yüzde ve boyunda şişlik, göğüs-omuz-kol ve sırt ağrısı gibi etkenler yer alır [14]. Akciğer kanseri belirtileri ve tanısı ileri evrelerde tespit edilebilmektedir, bu da kanserin ileri evlerde tespitine ve hasta sağkalım oranlarının düşmesine aynı zamanda kaliteli yaşam standartlarının da olumsuz yönde etkilenmesine neden olmaktadır. Hasta

şikayetlerinin ileri evrelerde oluşması sonucu akciğer röntgenin de şüpheli bir durumun görülmesi ile tespit mümkün kılınmaktadır. Kitle tespiti sonrasında bilgisayarlı tomografi yöntemiyle kesin tanı için hangi yönteme başvurulacağına karar verilir. Bu işlemler arasında biyopsi en yaygın olarak kullanılan ve tercih edilen bir yöntemdir. İnce bükülebilen, ışıklı olup ucunda kamera bulunan bir tüple akciğer dokusundan parçalar alınarak bronkoskopi uygulanır. Bazı durumlarda bronkoskopi yöntemiyle tümöre ulaşamaz ve bilgisayarlı tomografi ile beraber iğne biyopsileri almak gerekebilir. Torasentez işlemi ile iğne ile göğüs duvarından girilerek örnek alınabilir. Bu işlem akciğeri çevreleyen zarın yaprakları arasında sıvı biriktiğinde tercih edilir. Elde edilen örnekten patoloji kliniğinde incelenerek kanser tanısı kesinlik kazanmış olur. Ancak bazı hastalarda kesin tanıya anlaşılamayabilir, bu nedenle de tanı amaçlı sınırlı cerrahi girişimler (torakotomi) de gerekebilir. Yöntemler arasında hangisinin tercih edileceği konusunda temel prensip hastaya en az sıkıntı ve risk getirecek, ama en kısa sürede de tanıyı sağlayacak yöntem ile teşhis koymaktır [15].

Kanser tanısı konulduktan sonraki aşama ise hastalığın kaçınıcı evrede olduğudur. Hastalığın evresi vücuttaki durumunu ve sonucunda uygulanacak olan tedavi stratejilerini belirlemek konusunda yardımcı olacaktır. Akciğer kanseri dört ana evreden oluşmaktadır. Bu dört ana evreden hastanın hangi durumda olduğu tespit edebilmek için karın veya beyine yönelik bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans görüntüleme, kemik taraması (tüm vücut kemik sintigrafisi), PET gibi tetkikler yapılabilmektedir. Bazı durumlarda sınırlı cerrahi girişimlerde gerekebilmektedir. Operasyon için uygun evrede olup olmadığının anlaşılması için EBUS (ultrasonlu bronkoskopi) veya mediastinoskopi işlemi uygulanabilir [16,17]. Akciğer kanseri evreleri şekil 2.3 de gösterildiği üzere incelenecek olursa evre I, IA ve IB olarak ayrılır. Evre IA, kanserin 3 cm veya daha küçük olduğu; Evre IB, kanserin 3 cm ile 4 cm arasında olduğu anlamına gelir. Evre IIA, kanserin boyutunun 4 cm ile 5 cm arasında olduğu, ancak herhangi bir lenf düğümünde kanser hücresi olmadığı; Evre IIB, kanserin 5 cm'ye kadar olduğu ve etkilenen akciğere yakın lenf düğümlerinde kanser hücreleri olduğu anlamına gelir. Evre IIIA, kanserin boyutu 5 cm'ye kadardır ve tümörle aynı taraftaki göğsün merkezinde bulunan lenf düğümlerine yayıldığını; Evre IIIB, kanserin 5 cm'den küçük ve boyun, köprücük

kemiğinin üstünde veya etkilenen akciğerden göğsün karşı tarafından birinde lenf düğümlerine yayıldığını; Evre IIIC, kanserin boyutu 5 cm ile 7 cm arasındadır. Ayrıca akciğere yakın sinir (frenik sinir), kalbin kaplanması (pariyetal perikard) ve lenf düğümlerinden etkilenen akciğerin karşı tarafında göğsün merkezinde, akciğerin üst tarafında aynı tarafta veya karşı tarafta, köprücük kemiğinin üstünde bir yere yayılmıştır. Evre IVA, her iki akciğerde de kanser vardır; Evre IVB, kanserin bir veya daha fazla organda birkaç bölgeye yayıldığı anlamına gelmektedir [18].



Şekil 3. Akciğer kanseri evreleri

Akciğer kanseri küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak ayrılır ve uygulanan tedavi yöntemleri de farklılık göstermektedir. Akciğer kanseri tedavi yöntemleri incelendiğinde cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi yer almaktadır [19]. Tedavi hastalığın evresine göre de farklılık göstermektedir. Cerrahi müdahale için akciğer kanseri erken evresinde ve hastada ameliyata engel olacak herhangi bir hastalığın bulunmaması gerekir. Ameliyat ile kanserli dokunun alınabildiği hastaların nispeten diğer hastalara göre yaşam şansı daha yüksektir. Akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %80-85'i cerrahi müdahale ile tedavi görebilme şansını yitirmiş olan hastalardır [20]. Akciğer kanseri tedavi yöntemlerinden bir diğeri ise radyoterapidir. Yöntem X ışınları ile kontrolsüz bölünen kanser hücrelerinin öldürülmesi esasına dayanır. Radyoterapi bazen hastalığı yok edici (radikal), bazen şikayetleri giderici (palyatif), bazen de tümörün yayılmasından koruyucu (profilaktik) olabilir. Yöntem bölgedeki tümör hücrelerin normal hücrelere göre daha fazla duyarlıdır ve bölgedeki normal hücreler hızla kendilerini yenilemektedir. Genellikle tedavi 2-6 hafta arası devam eder. Tedavi

gören hastalar çevrelerini radyoaktif olarak etkilemezler. Cerrahi yöntemle birlikte veya kemoterapi ile birlikte de kullanılabilir [21].

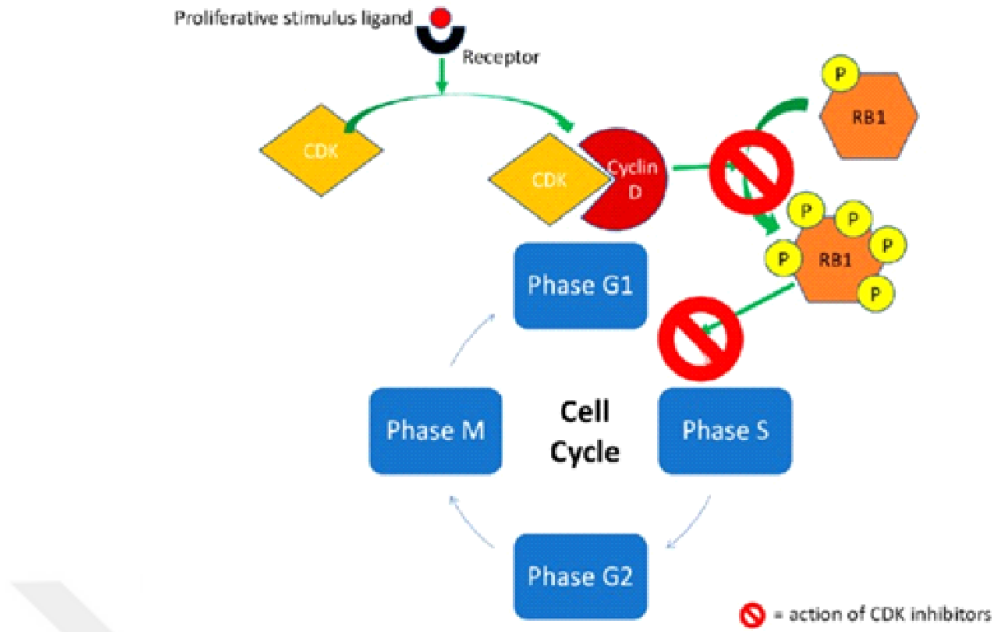
Akciğer kanseri tedavi yöntemlerinden bir diğeri ise kemoterapidir. İlaç tedavisi olarak bilinen bu yöntem kanser tedavisinde, tek başına veya cerrahi işlemle ve/veya radyoterapi ile birlikte akciğer kanserinin evresine bağlı olarak değişen sıralamalarla kullanılabilir. Akciğer kanseri hastalarının hemen hemen hepsine hastalığın evresine bağlı olarak farklı zamanlarda kemoterapi uygulanmaktadır. Cerrahi müdahale sonrası kanserli doku alınmış olsa da saptanamayan mikroskobik düzeyde kalmış olabilecek kanser hücreleri kemoterapi ve/veya radyoterapi yöntemleri ile yok edilerek hastalığın tekrar nüks etmesini engellemek amacıyla da kullanılabilir. Cerrahi yöntem uygulanamayan hastalarda, hastalığın ilerlemesini engellemek, tümörün küçültülmesi, yaşam süresi ve kalitesinin artırılması gibi amaçlarla kemoterapi uygulanabilir. Uzun süreli kemoterapi kullanımı yaşam kalitesini iyileştirir ve ayrıca yan etkileri kısa süreli ve geri dönüşümlü olarak görülmektedir [22].

2.2. CDK 'lar, CDK 4/6 ve CDK 4/6 İNHİBİTÖRLERİ

Hücrenin bölünmesi, protein kinazlarla tetiklenen protein fosforilasyonunun önemli bir rol oynadığı çok sayıda enzimatik reaksiyon tarafından kontrol edilir. Kontrol mekanizmasında yer alan serin/treonin kinazların alt ailesinin üyesi olan siklin bağımlı kinaz (CDK)'lardır. Siklin bağımlı kinazların aktivasyonları, siklin bağlanma aktivitesine bağlı olarak gerçekleşmektedir ve oluşacak olan kompleks de spesifik olarak gerçekleşmektedir. İnsan genomun CDK 'ları kodlayan 21 gen bulunmaktadır ve beş gen de CDK benzeri kinazlar (CDKL) olarak adlandırılan daha uzak protein kinazları kodlamakla görevlidirler. CDK'lar G1'den mitozaya kadar hücre döngüsünün farklı aşamalarında görev almaktadırlar. Her CDK/siklin kompleksi hücre döngüsünün belirli bir fazın ilerlemesinden sorumlu olarak görev alırlar [35]. CDK'ların çoğunun kanser türlerinde görev aldıkları bilinmektedir. Hücrenin çoğalmasına bağlı olarak kanser gelişim ve ilerlemesinin önüne geçmek amacıyla CDK inhibitörleri önem kazanmıştır. İlk CDK inhibitörü olomoucine Vesely ve Meijer

tarafından keşfedilmiştir. Daha sonra roskovitinler, purvalanoller, flavonoidlerin keşfi gerçekleşmiştir.

Yakın tarihte CDK 4/6 inhibitörü olarak kullanılmaya başlayan palbosiklib, abemasiklib, ribosiklib EMA ve FDA onayı alarak aromataz inhibitörleri (anastrozol/letrozol) veya fulvestrant ile kombinasyon tedavisinde kullanılmak üzere onay almışlardır [36]. Palbosiklib, abemasiklib ve ribosiklib aynı etki mekanizmasına sahiptir ve benzer farmakokinetik ve farmakodinamik profiller gösterirler. CDK 4/6 hücre döngüsünde G1-S geçişinin erken G1 aşamasında kontrol noktasında rol oynamaktadır. CDK 4/6 inhibitörleri CDK2 'nin kinaz aktivitesini inhibe eder ancak CDK4 ve CDK6 kompleksleri inhibe edilmez, tam tersi stabilize edilirler. Retinablastoma protein negatif hücre döngüsü düzenleyicisi olarak görev alır ve erken G1 fazında transkripsiyonel aktiviteyi baskılamak için transkripsiyon faktörü olarak görev alan E2F 'ye bağlanır. Mitojenik uyaranlar ile siklin D ekspresyon seviyesi artarak Rb 'nin fosforile olabilmesi için CDK4/6 ile kompleks oluştururlar. Hipofosforile hale geçen Rb, siklin E gibi E2F hedef genlerinin ifadesini sağlar ve G1 fazının ilerlemesini sağlamış olur. G1 'in sonlarında siklin E seviyesi artarak CDK 2 etkinleştirilir ve siklin E-CDK 2 kompleksi oluşarak Rb inaktive edilir. Bunun sonucunda da E2F transkripsiyon faktörleri salınarak transkripsiyon başlar ve S fazına geçiş sağlanır. CDK 4/6 aktivitesi Cip/Kip ailesi ve INK4 ailesi proteinleri ile siklin-CDK kompleks aktivitesini inhibe eder. CDK 4/6 inhibitörleri, Ink4 ailesi üyeleriyle benzer tümör baskılayıcı işlev göstermektedir. CDK 4/6 inhibitörü olan palbosiklib, abemasiklib ve ribosiklib CDK4/6'nın ATP alanına bağlanarak görev alırlar ve hücre döngüsünün G1-S geçişinin blokajında etkin rol oynarlar. Palbosiklib CDK4-siklin D1, CDK4-siklin D3, CDK6-siklin D2; Abemasiklib CDK4-siklin D1 CDK6-siklin D1; Ribosiklib CDK4-siklin D1 CDK6-siklin D3 olacak şekilde spesifik hedefleri farklılık göstermektedir [37]. Şekil 2.4 de CDK inhibitörleri tarafından Rb 'nin kompleks CDK-Siklin D tarafından hiper-fosforilasyonu ve bunun sonucunda topoizomerazın hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişe izin veren önemli enzimlerin transkripsiyonunun önlenmesi gösterilmektedir [38].



Şekil 4. CDK inhibitörleri tarafından engellenen enzimatik reaksiyonlar

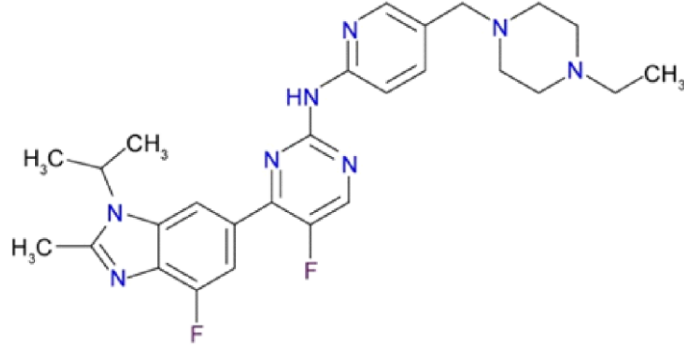
Siklin D-CDK 4/6-Rb yolağı, birçok kanser türünde sıklıkla düzensiz olarak görülmektedir. Yüksek D-tipi siklinler ve CDK4 seviyeleri yaygın olarak gözlenir, bu da siklin D-CDK4/6-Rb yolağını hedefleyen inhibitörleri meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde de terapötik amaçlı kullanılmışlardır. Monoterapi olarak kullanıldığında CDK 4/6 inhibitörleri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, pankreas kanseri, böbrek kanseri, karaciğer kanseri, hematolojik sistem tümörleri, yumurtalık epitel karsinomu, matür teratom gibi katı tümörlerde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda kombine tedavilerde de etkin rolleri mevcuttur [39,40].

2.2.1. ABEMASİKLİB

Literatürde LY2835219 olarak adlandırılan abemasiklib bileşiği, Eli Lilly and Company Research Laboratories bilim insanları tarafından biyokimyasal tarama yoluyla tanımlanmıştır. FDA 28 Eylül 2017 tarihinde abemasiklib endokrin tedaviyi takiben hastalık ilerlemesi ve metastatik ortamda HR-pozitif, HER2-negatif ilerlemiş veya metastatik meme kanseri olan yetişkin hastaların tedavisi için monoterapi olarak onaylamıştır. Şekil 2.5 de abemasiklibin moleküler yapısı açık bir şekilde

ifade edilmiştir [49]. Bu bileşiğin antineoplastik aktivitesi CDK4 ve CDK6'nın ATP-bağlama alanının yarışçıl bir inhibitörü olarak hareket etmesidir. Ayrıca CDK4'e karşı afinitesi CDK6'ya göre 14 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir [41]. Abemasiklib diğer CDK 4/6 inhibitörlerinden olan palbosiklib ve ribosiklib ile kıyaslandığında CDK4-siklin D1 kompleksi için yüksek seçicilik göstermektedir. Abemasiklib fonksiyonel grubu sayesinde, palbosiklib ve ribosiklibe kıyasla CDK4/6 ATP yarıktaki daha iyi bir tamamlayıcı etki gösterir [44]. Bu nedenle abemasiklib ana etkinliği CDK4 'de görülmektedir. İkinci olarak da, daha düşük etkinlik gücüyle CDK9 ve daha da az ölçüde CDK6 ile etkinlik göstermektedir. Bunların yanında abemasiklib CDK1, CDK2, CDK7, GSK3 α ve CAMKII γ/δ üzerinde de etkinlik göstermektedir. Aynı zamanda abemasiklib diğer CDK 4/6 inhibitörleri ile kıyaslandığında düşük konsantrasyon da daha yüksek etkinlik göstermektedir. Palbosiklibe dirençli hücreler abemasiklibe karşı yanıt verirken ribosiklibe yanıt vermez, bu da abemasiklibin palbosiklib ve ribosiklibe yanıt vermeyen hücrelerde de uygulanabilirliğini arttırmaktadır. Abemasiklib Rb proteininin fosforilasyonunu engelleyerek meme, melanoma, akciğer, kolorektal, glioblastoma ve kan kanseri gibi pek çok sayıda kanser hücre hatları üzerinde *in vitro* ve *in vivo* deneyler sonucu hücre döngüsünün G1 aşamasında blokajına neden olmaktadır [46]. Tümör ksenograftları üzerinde yapılan deneyler sonucunda abemasiklib diğer CDK 4/6 inhibitörü olan palbosiklibden daha güçlü doza bağlı antitümör aktivitesi göstermiştir. Aynı zamanda kombine kullanımlarda da efektif bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. Diğer CDK4 ve CDK6 inhibitörlerine kıyaslandığında LY2835219'un daha spesifik olarak kan-beyin bariyerini geçme kabiliyeti mevcuttur ve merkezi sinir sistemini etkileyen metastatik lezyonlar üzerinde antitümör etkileri mevcuttur [42,47]. Bağışıklık sisteminde görev alan T lenfositleri üzerinde abemasiklibin antitümör aktivitesi, intratümöral sitotoksik T lenfositlerinin varlığına bağlıdır. Abemasiklib monoterapisi T hücresinde enflamatuvar etkiye ve MHC I ve II 'nin regülasyonunun artmasına ve T hücrelerinde NFAT sinyali nedeniyle olduğu gösterilmiştir [43]. Hücre ölümünü indükleyen ve hücre proliferasyonunu kalıcı olarak bloke eden abemasiklib, CDK 4/6 inhibisyonunun tamamen etkisiz olduğu Rb'den yoksun hücrelerde de aktif olarak rol oynadığı gösterilmiştir [45]. Klinik çalışmalarda abemasiklib kullanımı sürekli bir dozlama programına göre uygulanmaktadır. Nötropeni gibi hematolojik olaylar abemasiklib kullanımında diğer CDK 4/6 inhibitörlerine göre daha az yaygındır.

Karaciğerden Emilimi gerçekleşen abemasiklibin toksisite etkinliği kesinleşmese de birkaç çalışmada mevcuttur ve yan etki olarak hastalarda mide bulantısı, yorgunluk, ishal ve kusma gibi şikayetlere neden olmaktadır [48].



Şekil 5. Abemasiklib moleküler ifadesi

2.3. HÜCRE DÖNGÜSÜ

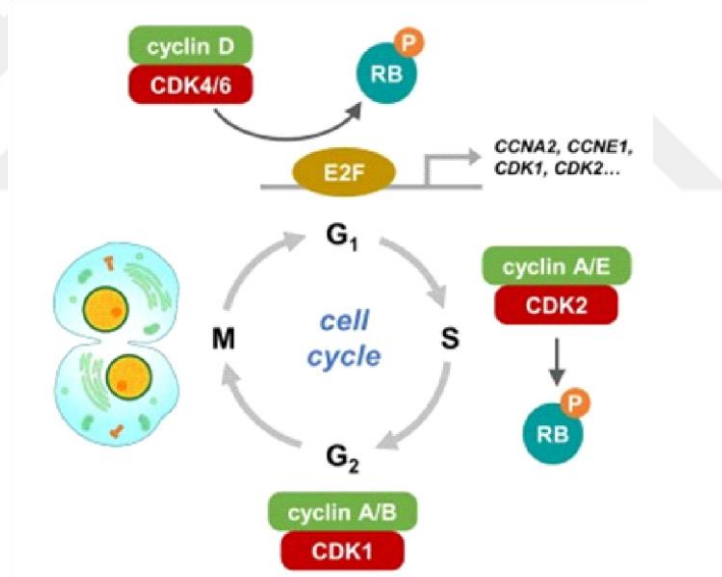
Hücre döngüsü, hücrelerin çoğalma sürecinin gerçekleştiği ve bu esnada kontrol mekanizmalarının yer aldığı, sonucunda da ana hücreden 2 kardeş hücrenin oluştuğu sürecin tamamına denmektedir [23]. Hücreler belirli sürede bu döngüye girer, ancak embriyo ve tümör hücrelerinde bu durum sürekli olarak devam etmektedir. Döngü sonrası oluşan iki kardeş hücrenin birbirinin kopyası DNA bulunmaktadır. İki eş DNA'nın oluşumu sırasında kromozomların doğru bir şekilde bölünmesi için farklı kontrol noktaları ile doğrulama gerçekleştirilir. Herhangi bir hata durumunda onarım sistemine yönlendirilir ve bu sistem devreye girer veya bölünme işlemi durdurulur [24]. Hücre döngüsü dört farklı alanda incelenmiştir ve kontrol noktaları ile işlem kontrolü sağlanmaktadır. Bu dört faz ise; G1 (GAP1), S (Sentez), G2 (GAP2), M (Mitoz) aşamaları olarak adlandırılmaktadır [25]. Ayrıca G0 fazı olarak bilinen, diğer bir adı da dinlenme fazı olan bu aşamada hücreler bölünmezler ve bölünme için herhangi bir hazırlıkta bulunmazlar. Bu faz hücrenin replikasyona bağımlı hücre bölünmesi durumunda bulunmadığı faz olarak da ifade edilebilir. Memeli hücreleri ele alındığında bu faz aşamasında olan ve bölünme işlemi gerçekleştirilmeyen hücrelere örnek olarak kas, hematopoietik, bağırsak, epitel kök hücreleri verilebilir [26]. Bölünme işleminin kontrolü ve devamlılığı için moleküler sinyallerin yardımı

gerekmektedir. Kontrol noktasında yer alan Siklin bağımlı protein kinazlar (CDK) siklinler ile birleşerek yolağın devamlılığı sağlanmış olur. Dinlenme fazında bulunan hücreler CDK ve siklin aktivitesi göstermezler. Hücreler de bölünme sinyali bulunmazken bu hücreler büyüme aşamasındadırlar ve siklinlerin mRNA seviyeleri inhibe ederek ortamda bulunmaları engellenir ve var olan siklinler ise degrade edilirler. Sonrasında bölünme sinyali alan hücreler siklinlerin mRNA seviyeleri aktifleştirilerek siklin protein seviyelerinde artış sağlanır ve siklin degradasyonu inhibe edilerek CDK aktivitesinde artış gözlenir. Daha önce ifade edilen tüm fazlarda bu durum söz konusudur. Hücre döngüsü sırasında görev alan tüm siklinler übikitinlenerek degradasyonları sağlanır. Belirtilen sürecin durdurulabilmesi için p27 Kip1, p21 Cip1, p21, Wee1, Chk1 ve Chk2 gibi pek çok farklı proteinin görev almasıyla sağlanmaktadır. Kontrol noktalarından geçişin engellenmesi veya kromozomlarda hasar tespiti sonucu ifade edilen proteinler siklin-CDK kompleksini inhibe ederek yolak bloke edilir ve hücre döngüsü durdurulmuş olur [27].

G1 fazında hücreyi bölünmeye hazırlamak için metabolik değişiklikler meydana gelir ve G1 fazında mRNA ve protein sentezi gerçekleşir. Ayrıca hücre döngüsünün en uzun evresidir. G1 fazının başlatılması ve G1 kontrol noktasından geçene kadar ki süreçte büyüme faktörü sinyali alınması gerekmektedir. G1 fazından retinoblastoma (Rb) proteini kontrol noktası koruyucusu olarak görev almaktadır. DNA hasarı veya metabolik bozukluklar gibi uyarı sinyalleri alınmadığı sürece CDK4/6 ve siklin D eşleşmesi sonrasında Rb fosforilasyona uğrar. Sonrasında CDK2 ve siklin E eşleşmesi ile retinoblastoma proteini ikinci kez fosforlanarak E2F ve DP-1 protein kompleksinden ayrılır. Protein kompleksinden ayrılan E2F ve DP-1'in serbestlenmesi sonucu diğer siklinlerin ve bölünmenin devamlılığı için gerekli olan proteinlerin anlatımının artması gerçekleştirilerek yolağın devamlılığı sağlanır [29]. Sentez fazında DNA sentezi gerçekleştirilir ve iki eş kardeş kromozomlar üretilir. Protein sentezi de bu aşamada yoğun bir şekilde gerçekleşir. CDK7 ve siklin H eşleşmesi sağlanır. Sonrasında bu eşleşmede CDK2 ve siklin A eşleşmesini sağlar [28]. G2 fazında hücrelerin mitozaya hazır hale geldiği, hızlı hücre büyümesi ve protein sentezinin gerçekleştiği aşamadır. Kromozom replikasyonunun doğru bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin ve işlem sırasında DNA hasarının oluşup oluşmadığının kontrol edilebilmesi için DNA hasarı ve replikasyon kontrol noktası

yer almaktadır. Kontrol noktası ile hücrenin mitoz girmesi ya da DNA onarımı sisteminin aktifleştirilme süreçleri gerçekleştirilir. G2 fazında CDK2 ve siklin A eşleşmesi sonrasında CDK1 ve siklin B eşleşmesi gerçekleştirilir [30]. Sonraki aşama olan M fazına girişte CDK1 ve siklin A eşleşmesi devam eder. Bu iki protein eşleşmesi cdc25A proteini tarafından kontrol edilerek gerçekleştirilir [31].

Bölünme işleminin tam ve doğru bir şekilde gerçekleşmesi oldukça önemlidir. Hücrede bu esnada bulunan üç kontrol noktası yer almaktadır. G1 fazında yer alan kontrol noktası besin, bölünme faktörleri ve DNA hasarı kontrolü işlemlerini gerçekleştirir. Diğer kontrol noktası ise G2 fazında yer almaktadır. Burada da hücre boyutu ve DNA replikasyonu kontrolü sağlanır. Diğer bir kontrol noktası ise M fazında yer almaktadır. M fazı kontrol noktasında kromozomların iç ipliklerine doğru bağlanıp bağlanmadığının kontrolü sağlanmaktadır [32].

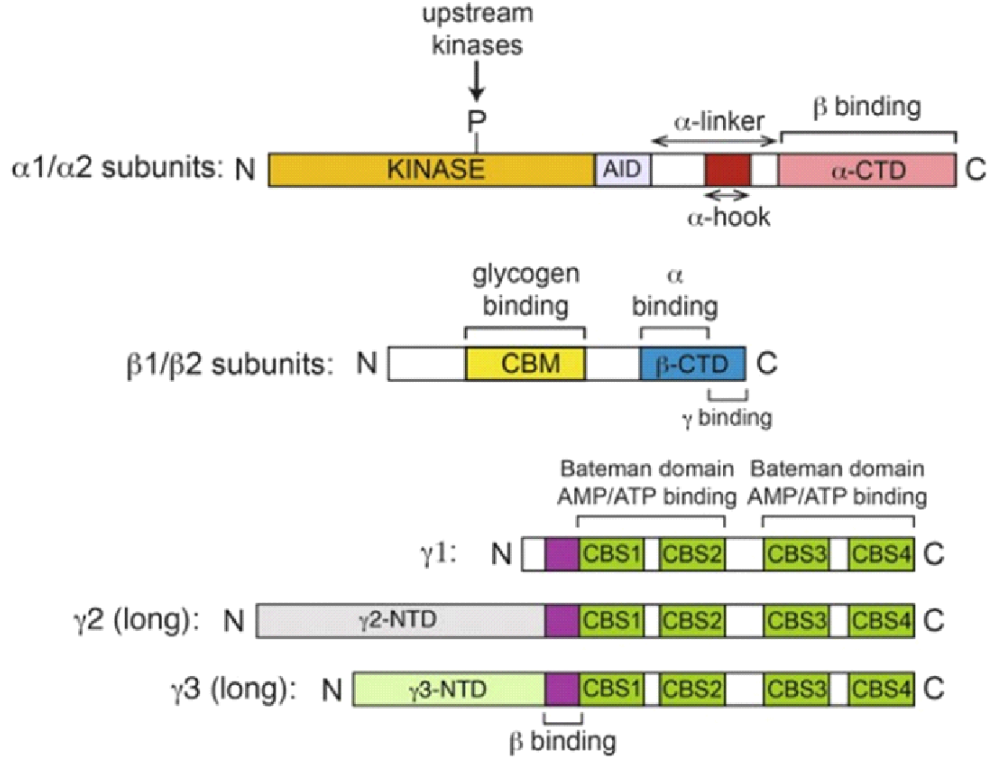


Şekil 6. Hücre döngüsünün genel ifadesi [33]

2.4. ADENNOZİN 5'MONOFOSFAT-AKTİVE EDİLMEMİŞ PROTEİN KİNAZ (AMPK) SİNYAL YOLAĞI

5'AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), maya hücrelerinden memeli hücrelerine kadar tüm türler arasında evrimsel süreçte korunmuş olan serin/treonin protein kinaz olarak bilinmektedir. Biyolojik açıdan AMPK metabolik olaylarla

ilişkili hücrel stres ve enerji yoksunluğunu algılayarak aktivasyon göstermektedir. AMPK aktivitesi ilk araştırılmaya başlandığında lipid metabolizması ve kolesterol düzenleyici rolü bilinmekteydi. Ancak günümüzde pek çok aktivitesinin varlığı söz konusu olmaktadır. Bunlar arasında glikoz, lipid, protein metabolizması, çeşitli aşağı akış metabolik kinazların fosforilasyon durumunu geçici olarak değiştirerek veya transkripsiyonel olarak adaptasyonu etkileyerek veya enerji algılama üzerindeki etkisi dahil birçok etkeni kapsadığı bilinmektedir [50]. Enerji söz konusu olduğunda hücrel düzeyde enerji kaynağı olarak adenosin trifosfat (ATP) akla gelmektedir. ATP mitokondri içerisinde oksidatif fosforilasyon ile üretilerek fizyolojik durumdaki hücrelerin doğrudan enerji ihtiyacını karşılar. AMPK hücrelerin herhangi bir hücrel enerji stresi durumunda uyum sağlanmasında görev almaktadır. Bu süreç zarfında AMPK aktivasyonu ATP tüketimine neden olan anabolik olayları inhibe eder ve ATP üreten katabolik olayları aktive eder. Bu nedenle AMPK 'nin embriyonik büyüme ve gelişmede etkin bir rolü vardır [51]. AMPK kendini oluşturan katalitik α -alt birimi ($\alpha 1$ ve $\alpha 2$), bir düzenleyici β -alt birimi ($\beta 1$ ve $\beta 2$) ve γ -alt biriminden ($\gamma 1$, $\gamma 2$ ve $\gamma 3$) oluşan heterodimerik yapıli komplekstir. Oluşan her AMPK kompleksi bir α alt birimi, bir β alt birimi ve bir γ alt biriminden oluşur. İki α alt birimi, iki β alt birimi ve üç γ alt biriminin kombinasyonundan oluşacak olan 12 farklı AMPK kompleksi görölmektedir. AMPK $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ alt birimlerinin her yerde ekspresyonu, bu oluşan kompleksi referans haline getirmiştir. Ancak farklı AMPK komplekslerinin etkinlikleri hücrel düzeyde çeşitlilik göstermekte ve ilgili mutasyonlar ya da gen düzeyinde silinmeler sonucu çeşitli sorunlar ortaya çıkmaktadır. Örneğin AMPK $\gamma 2$ alt birimindeki mutasyonlar, insan kardiyomiyopatilerinde sıklıkla gözlenmektedir [52]. AMPK 'nın etkileri arasında kalp hastalığı, diyabet, kanser, iltihaplı bozukluklar ve viral enfeksiyon gibi çeşitli insan sağlığı üzerinde etkili hastalıklar söz konusu olmaktadır [58].

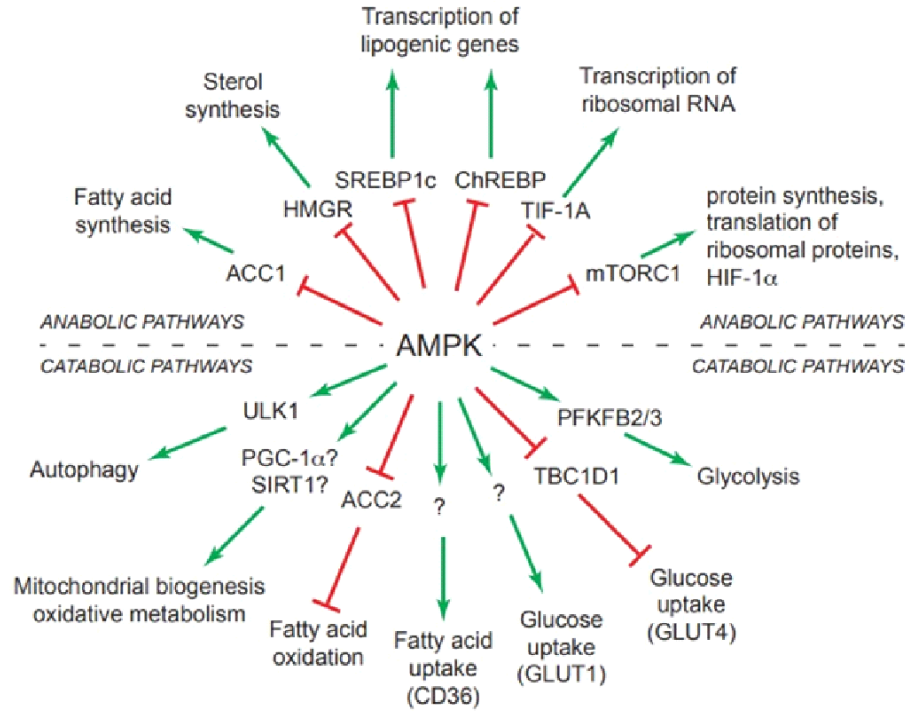


Şekil 7. AMPK alt birimleri [121]

AMPK $\alpha 1$ ve AMPK $\alpha 2$ katalitik alt birimlerini memeli hücrelerinde sırasıyla PRKAA1 ve PRKAA2 genleri kodlamaktadır. AMPK $\beta 1$ ve AMPK $\beta 2$ düzenleyici alt birimlerini sırasıyla PRKAB1 ve PRKAB2 genleri kodlarken AMPK $\gamma 1$, AMPK $\gamma 2$ ve AMPK $\gamma 3$ alt birimlerini PRKAG1, PRKAG2 ve PRKAG3 genleri kodlamaktadır. AMPK α alt biriminin izoformları bazen farklı fonksiyonlar göstermektedir ve bu nedenle iki katalitik AMPK α alt birimi AMP bağlanmasına ve LKB1 ilişkisine farklı yanıt vermektedir. Ayrıca AMPK $\alpha 1$ çekirdekte bulunurken AMPK $\alpha 2$ tercihli olarak çekirdekte bulunup bulunmama özelliğine sahiptir [53].

AMPK aktifleşmesi, α alt birimindeki treonin 172 amino asidinin fosforlanması veya ADP ya da AMP 'nin γ alt birimine bağlanması ile aktifleşme olayı gerçekleşir. ATP yarışçı olarak γ alt birimine bağlanmaya çalışır. AMPK α alt birimindeki treonin 172'nin fosforlanması kinaz ve fosfatazlar aracılığıyla kontrol edilmektedir. Bu kontrol görevini üstlenen grup LKB1 olarak bilinmektedir [54]. Karaciğer kinaz B1 (LKB1), STRAD (ste20-related adaptor) ve MO25 (mouse protein 25) ile birlikte heterodimerik kompleks oluşturur. Bunların yanı sıra Ca^{+2} / kalmodulin bağımlı

kinaz 2 (CaMKK2), TGF β ile aktive olan kinaz 1 (TAK1), protein fosfataz 2A (PP2A), protein fosfataz 2C (PP2C) ve Mg $^{2+}$ /Mn $^{2+}$ bağımlı protein fosfataz 1E (PPM1E) yer almaktadır [55]. Hücre metabolizmasında AMPK protein kompleksinin aktifleşmesi durumunda anabolizma da etkili olan yolların baskılanması söz konusuken gerekli görüldüğünde de katabolizmayı ifade eden yolların aktivasyonu söz konusu olmaktadır. Hücresel açlık durumunda Ulk1 proteini serin 555 amino asidi üzerinden fosforlayan p-AMPK treonin 172 otofajiyi başlatılırken, mTORC1 'in baskılanmasına neden olur ve cap-bağımlı translasyonun sonlanmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda AMPK protein kompleksi lipid metabolizmasında görev alan asetil koa karboksilaz (acc) enziminin serin 79 üzerinde fosforlanmasını sağlayarak inhibisyona neden olmaktadır [56,57].



Şekil 8. AMPK tarafından düzenlenen hedef proteinler ve metabolik yollar [122]

AMPK pek çok kanser türünde etkin rol oynamaktadır. Bu kanser türleri arasında yer alan akciğer kanseri hastalarından küçük hücreli olmayan akciğer kanserine yakalananların yaklaşık yarısında LKB1 kodlayan genlerde mutasyon saptanmıştır. Hücresel düzeyde AMPK 'nın aktive edilmemesi sebebiyle baskılanmamış hücre proliferasyonunun söz konusu olduğu varsayılmaktadır. AMPK 'nin mitokondriyal

disfonksiyon tarafından dolaylı aktivasyonunun akciğer kanseri hücrelerinde EMT 'ye indüklemektedir. Ayrıca AMPK 'nin farmakolojik aktivatörü olan 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid (AICAR) metformin gibi çeşitli farmakolojik ajanların kullanımıyla meme, prostat ve akciğer kanseri hücrelerinin EMT yolağında inhibitör etkisi olduğu gösterilmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde AMPK 'nin EMT ve kanser metastazı üzerindeki etkisi AMPK aktivasyonunun hücre tipi ve bağlanmaya özgü etkilere sahip olduğunu göstermektedir [59,60,61].

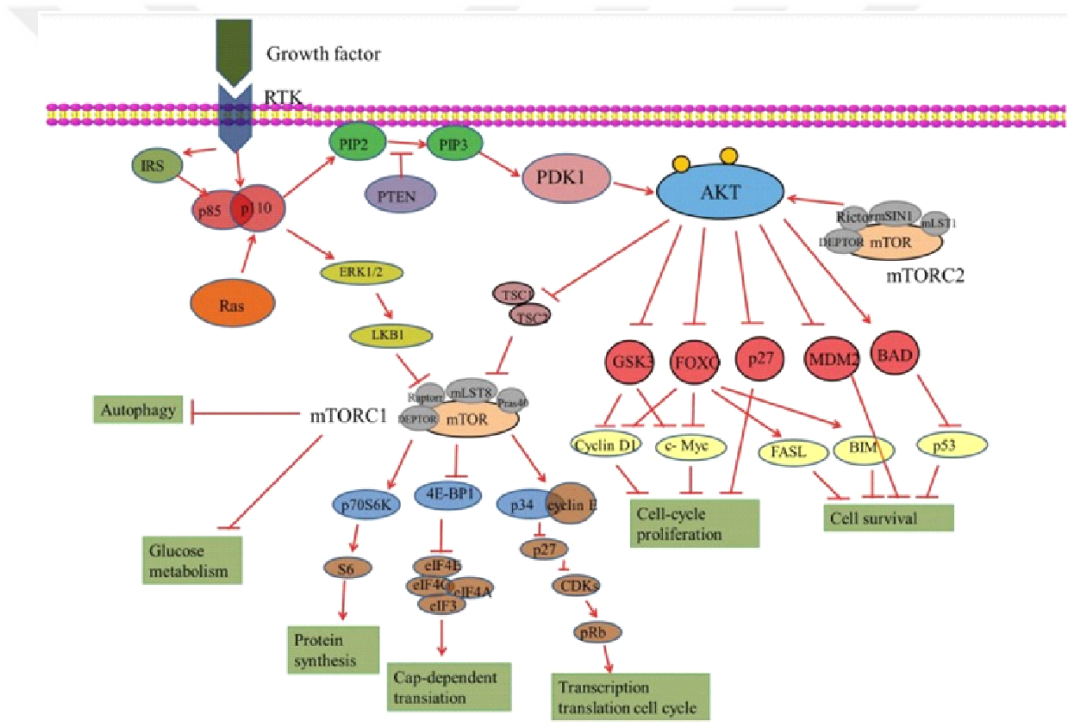
2.5. PI3K/AKT/MTOR SİNYAL YOLAĞI

Plazma membranında bulunan fosfatidilinositol lipidinin inositol halkasının 3-hidroksil grubunun fosforile olması ile aktive olan PI3K, lipid kinaz ailesinde yer almaktadır. PI3K lipid substratları veya farklı yapıları tercih etmesine bağlı olarak üç sınıf enzimi mevcuttur. Tip I PI3K tümörlerde oldukça önemli bir rol oynar [62]. Üç tane tip II PI3K (PI3K-C2 α , β , γ) ve tek bir tip III PI3K (hVPS34) vardır. Tip I PI3K, bir p110 katalitik alt biriminden ve bir düzenleyici alt birim olan p85 'den oluşan bir heterodimerdir. Katalitik alt birimi oluşturan p110 'un p110 α , p110 β , p110 γ ve p110 δ alt tipleri varken düzenleyici alt birimi oluşturan p85 'in p85 α , p85 β , p85 γ , p85 δ , p85 ϵ , p85 ζ , p85 η , p85 θ , p85 ι , p85 κ , p85 λ , p85 μ , p85 ν , p85 ξ , p85 $\omicron$, p85 π , p85 ρ , p85 σ , p85 τ , p85 υ , p85 ϕ , p85 χ , p85 ψ , p85 ω alt tipleri mevcuttur. PI3K aktivasyonu inhibe etmek ve protein heterodimerini stabilize etmek için katalitik alt birim olan p110 düzenleyici alt birim olan p85 'e bağlanır [63]. PI3K fizyolojik koşullar altında hücre dışı sinyaller aracılığıyla aktive olmakta ve sonucunda heterodimer konformasyonel değişikliğe uğramaktadır. Bu yolak büyüme faktörü, hormonlar veya sitokinler gibi farklı uyaranlar ile aktive olmaktadır. Çeşitlik büyüme faktörü ligandları transmembran reseptör tirozin kinaz (RTK)'ın N-terminal hücre dışı bölgesine bağlanarak RTK 'ın sitoplazmik bölgesinde otofosforilasyon gerçekleşerek aktive olmaktadır [64]. PIP2 'nin PIP3 'e dönüşümü gerçekleşerek yolak devam etmektedir. Ayrıca GRB2 üzerinden yürüyen alternatif bir yolak daha mevcuttur. Bu yolak MAPK yolağı olarak bilinmektedir ve sırasıyla SOS, RAS, RAF, MEK ve ERK proteinlerinin fosforilasyonu ile gerçekleşen, hücre büyümesi ve farklılaşmasına neden olan bir yoldur [65]. PIP3 oluşumu sonrasında PDK1 Serin241 üzerinden fosforile ederek yolak devam eder. Ancak bu sırada PIP2 PIP3 dönüşümü PTEN

proteini aracılığıyla kontrol edilerek dönüşüm engellenir. Fosforile edilmiş olan PDK1 proteini bir başka protein olan akt 'ı treonin 308 amino asidi üzerinden fosforile eder. Akt proteini serin 473 amino asidi üzerinden doğrudan mTORC2 proteini aracılığıyla da fosforlanarak aktif hale geçebilir. Fosforile olan akt TSC1/2 proteinini baskılayarak mTORC1 proteininin baskılanmasını engeller [66]. Ayrıca mTORC1 protein kompleksi halinde bulur ve mTOR, Raptor proteinlerini içinde barındırmaktadır. mTOR hücre metabolizmasında görev alan proteinlerin ekspresyonlarının düzenlemesi ve protein translasyonunun kontrolünü sağlanmasında görev alan önemli bir proteindir. Aktif durumda olan mTORC1 proteini mTOR proteinini serin 2448 amino asidi üzerinden fosforlanması, serin 24481 amino asidi üzerinde mTORC2 proteininin fosforlaşmasına bağımlı olarak çalışmaktadır. Oluşan bu döngü sonucunda mTORC1 proteininin baskıladığı ULK1 proteini serin 555 amino asidi üzerinden fosforlanarak otofaji sinyalinin başlatılmasını engellemek için kullanılır. ULK1 proteini inaktif edilebilmek için serin 757 amino asidi üzerinden fosforlanmalıdır [67]. mTORC1 proteini treonin 389 amino asidi üzerinden fosforladığı P70S6K proteini ile S6 ve eIF4E proteinlerinin regülasyonunu sağlar ve protein sentezini kontrol eder. Ayrıca eIF4E proteinine bağılı olarak translasyon kontrolünü 4E-BP1 proteininin regülasyonunu sağlayarak gerçekleştirir. Aynı zamanda hücre enerji metabolizmasındaki değişime bağılı olarak translasyon inhibisyonunu kontrol etmektedir. mTOR proteini farklı yolların kontrolünde görev almaktadır. Örnek verilecek olursa bunların arasında Lipin-1 proteinine bağılı lipid biyosentezi, Grb10 proteinine bağılı olarak lipoziz ve CLIP-170 proteinine bağılı olarakta mikrotübül organizasyonu gibi pek çok farklı yolda etkin rol oynamaktadır [68].

Akt proteini hücrenin sağ kalmasını sağlayan bir protein olup geri beslenme mekanizması ile çalışmaktadır. Akt proteini aracılığıyla hücre sağkalımı IKK α proteinin treonin 23 amino asidi üzerinden fosforlanması ve CREB proteininin serin 133 amino asidi üzerinden fosforlanması sonucu ilgili genlerin aktive olması gerçekleşir. Aynı zamanda BAD gibi apoptozu teşvik eden proteinleri baskılayarak bcl-2 ailesine ait proteinlerin ekspresyonlarını kontrol ederek hücre canlılığının korunmasını sağlamak ve hücre bölünmesinin durdurulması ile ilgili protein olan p27'nin baskılanmasını sağlayarak hücre bölünmesinin devamlılığını sağlamaktadır.

Akt proteini serin 166 ve serin 186 amino asidi üzerinden MDM-2 proteinini fosforlayarak p53 kontrolündeki apoptoz yolağını inhibe eder ve aynı zamanda kaspaza bağımlı apoptoz yolağını serin 196 amino asidi üzerinden Kaspaz9'u fosforlayarak engeller. Ayrıca SAPK yolağının inhibisyonunu da serin 647 amino asidi üzerinden MLK3 'ü, serin 83 üzerinden ASK1 'i fosforlayarak gerçekleştirir. Hücre ölümü ile ilgili genleri aktive olmasını sağlayan FOXO1 proteinini treonin 24, serin 256, serin 319; FOXO3 proteinini treonin 32, serin 253, serin 315; FOXO4 proteinini treonin 28, serin 193 ve serin 258 amino asitleri üzerinden fosforlayarak sağlamaktadır. Ayrıca akt proteini AMPK proteinini α alt birimindeki serin 487 amino asidi üzerinden fosforlayarak inhibe etmektedir [69].



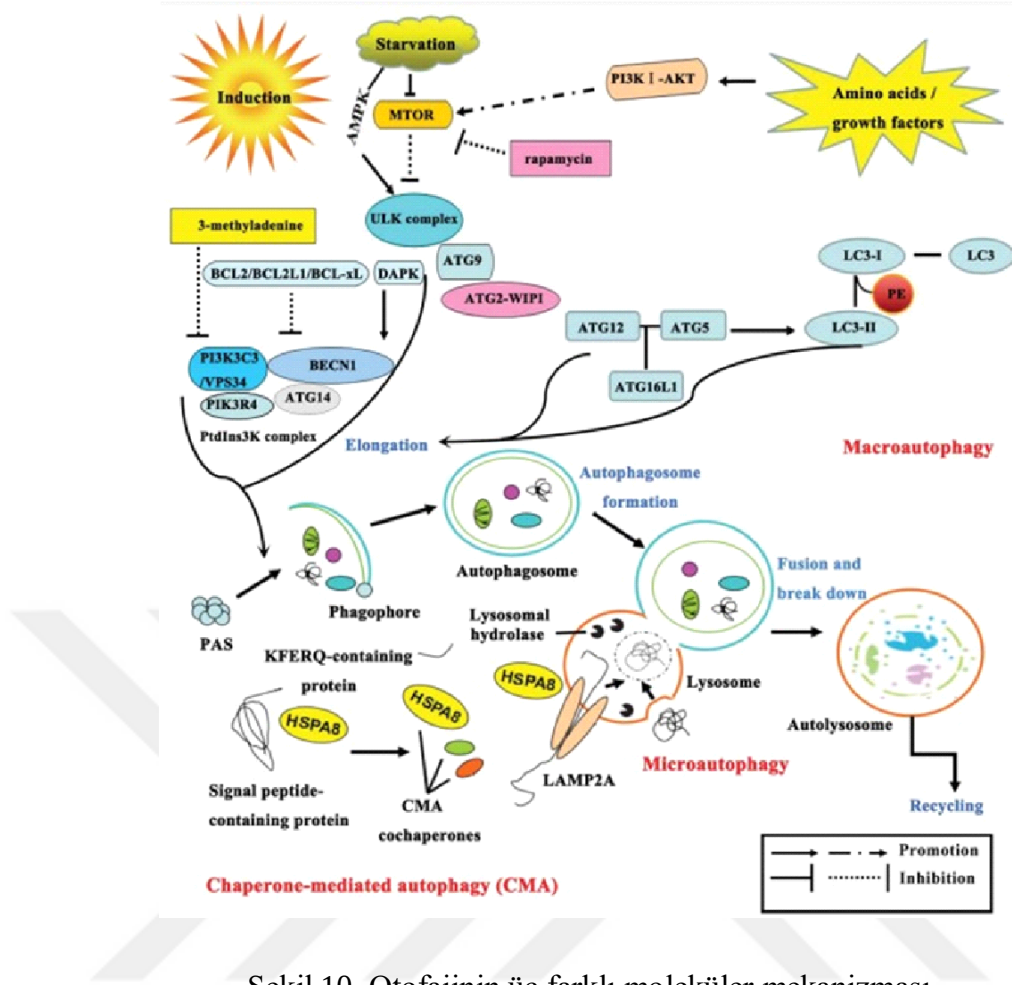
Şekil 9. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı

2.6. OTOFAJİ

Otofaji hücresel homeostazı sürdürmek amacıyla lizozomdaki hatalı veya eski sitoplazmik hücre bileşenlerinin yapılarını ve organellerini ortadan kaldırmak ve geri dönüşümlerini sağlamak amacıyla gerçekleşen evrimsel olarak korunmuş hücre içi yıkıcı bir süreçtir [83]. Otofaji besin stresi, hipoksi, sitotoksik kemoterapiler gibi çeşitli hücresel stresler aracılığıyla aktive olmaktadır. Otofaji fizyolojik açıdan besin

yoksunluğu gibi açlık strese yanıt olarak aktive olan proteinlerin ve lipidlerin dönüşümü için gerekli bir sistemdir. Uzun süreli açlık durumunda düzenlenmiş programlanmış hücre ölümü (PCD) mekanizması gözlenir [84]. Normal hücre veya kanserli hücreler gibi çeşitli etkenler sonucu değışmiş yapılı hücrelerde hayatta kalma süreci olarak görülebilmektedirler. Ayrıca otofaji hücrel içeriğın lizozomlara taşınması ve parçalanması yoluyla hücrel enerjinin geri dönüştürülmesini hedeflemektedir. Ancak otofaji enerjinin geri kazanımı olarak bilinse de tip 2 programlanmış hücre ölüm yolağı olarak da görülmektedir. Otofaji oluşumu temelde iki ana fonksiyonel tepki olarak ortaya çıkmaktadır. Bunlar, sitoplazmik materyal içermesi ve lizozomal bozunmayla sonuçlanmasıdır. Otofajinin lizozomal aracılı gerçekleşmesi sitoplazmik materyal içeriğı bulunan proteozomal degradasyon gibi diğer katabolik yollardan ayırt etmek için oldukça önemlidir. Lizozomal proteazlar polipeptitleri kendilerini oluşturan amino asitlerine kadar katabolize edebilmektedirler. Ayrıca lizozomal hidrolazlar lipidleri, şekerleri ve nükleik asitleri de degrade edebilirler [85].

Çeşitli otofaji türleri yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur ancak temelde üç hücrel süreci ifade eden otofaji bulunmaktadır. Bunlar; Mikrotofaji, Şaperon aracılı otofaji ve Makrotofaji olarak adlandırılmaktadır. Otofaji türleri arasında en büyük fark bozulacak kargo türleri ve lizozomlara kargoların taşınma yöntemidir. Otofaji ifadesinin kullanımı genelde Makrotofaji için geçerli olmakla birlikte bu zamana kadar veziküler bölmelerde büyük morfolojik değışiklikleri en iyi karakterize edilmiş olan türüdür [86].



Şekil 10. Otofajinin üç farklı moleküler mekanizması

2.6.1. Mikrotofaji

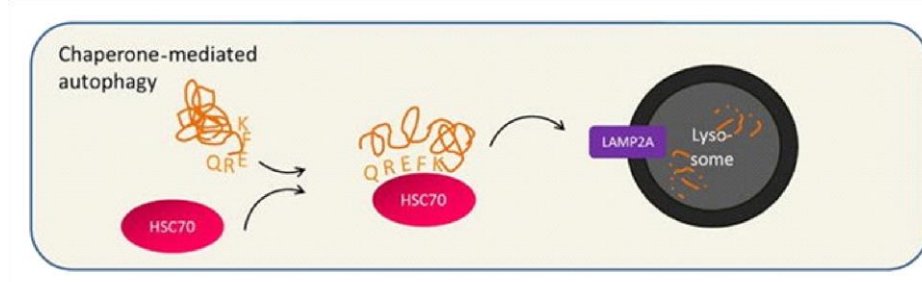
Mikrotofaji, sitoplazmik içeriğin bozunması sonucu lizozom ya da vakuolün yüzeyinde doğrudan membran invaginasyonu yoluyla içeriğin alındığı otofaji çeşididir. Otofajinin en az çalışılmış çeşididir ve maya hücrelerinde endozomal mikrotofaji olarak adlandırılmaktadır. İnvaginasyon olayı çıkıntı oluşumu ile beraber parçalama işlemi ile lizozom içerisine alınması ile gerçekleşmektedir. Mikrotofaji nitrojen açlığına bağlı olarak aktifleşmektedir. Ayrıca mTOR yoluyla aracılığıyla kontrol edilmektedir [87]. Mikrotofaji sürecinde kargo içeriği iletimi sırasında altında yatan moleküler mekanizma belirsizliğini korumaktadır. Mikrotofaji genellikle besin eksikliği ve hayatta kalma sürecinde kullanılmamaktadır. Organellerin boyutlarının korunması ve membran kompozisyonunun sabit kalması gibi etkenler durumunda aktif olarak kullanılmaktadır. Vakuoler taşıyıcı şaperon (VTC), vakuol ve hücre periferinde bulunan Mikrotofaji için

gerekli bir komplekstir. Mikrootofaji yolağının bloklanması için vakuoler taşıyıcı şaperonun delesyona uğraması gerekmektedir [88].

2.6.2. Şaperon Aracılı Otofaji

Şaperon aracılı otofaji (CMA) sitosolik proteinlerin parçalanmasını hedef alarak, lizozoma doğrudan verilmesi sonucu gerçekleşmektedir. Şaperon aracılı otofaji gelişmiş düzey ökaryotik hücrelerde görülmektedir. Bu otofaji türünde sadece çözünebilir proteinler degrade edilebilmektedir. Ancak organellerin degradasyonu söz konusu olmamaktadır. Şaperon aracılı otofajinin diğer sistemlerden ayırt edici özelliği vezikül oluşumu ve membran invagizasyonunun gerekmemesidir. Şaperon aracılı otofaji Hsc70 'e bağlı olarak ve homoloji sağlayarak gerçekleşmektedir. Bu otofaji HSPA8 'e bağlı KFERQ amino asidi sekansını taşıyan çözünebilir proteinleri kargo edebilir. Ayrıca sitozolik şaperon olarak bilinen KFERQ sitoplazmadaki proteinlerin birçoğunda bulunmaktadır. Organelleri, lipidleri, nükleik asitleri veya zarlara bağlı proteinleri kargo edememektedir. CMA çeşitli sitosolik proteinlerin kargolanmasında görev almaktadır. Metabolik düzenleme, genom bütünlüğünün korunması, yaşlanma, T-hücresi aktivasyonu, nörodejenerasyon ve onkogeneze gibi çeşitli patofizyolojik olaylarda ana düzenleyici rolü bulunmaktadır [89]. Ayrıca kanserde ki rolü de oldukça önemlidir. Makrootofaji inhibisyonu gerçekleştiğinde memeli hücrelerinde CMA indüklenmesi görülebilmektedir. Bu da otofajide ki değişimin diğerini telafi edebilir bir sistemle ilerlediğini göstermektedir.

CMA yolağında belirli proteinlerin KFERQ amino asit dizisini tanıyan ve ona bağlı olarak bulunan Hsc70 protein ile etkileşimi sonucu lizozomla ilişkili protein 2A 'nın (LAMP2A) aracılığıyla lizozoma bağlanmayı sağlar ve bir miktar açıklık oluşturularak hedeflenen protein parçalanmak üzere lizozoma yönlendirilerek gerçekleştirilir [90].



Şekil 11. Şaperon aracılı otofaji yolu

2.6.3. Makrotofaji

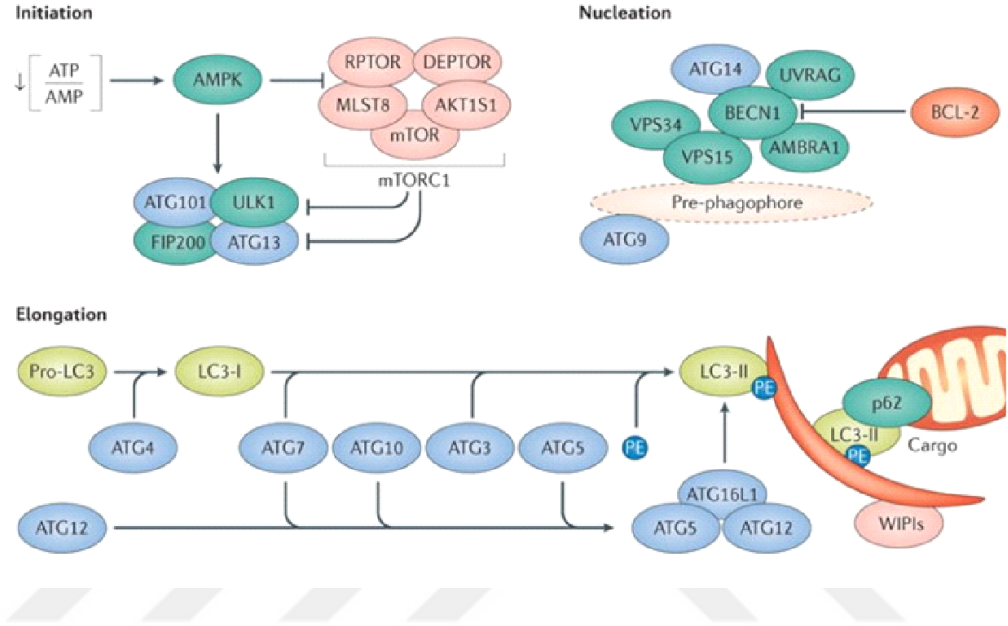
Makrotofaji hücrel homeostazın korunması için oldukça önemli bir katabolik süreçtir. 1962 yılında Ashford ve Porter tarafından yapılan incelemeler sonucu lizozomlarda bir artış ve lizozomların sitoplazmik bileşenleri sindirdiği bir süreç gözlemlendi ve 1963 yılında da Duve tarafından hücrel düzeyde kendi kendini yok etmeyi tanımlamak için “otofaji” ifadesi kullanıldı [91]. Makrotofaji hücre içerisinde yer alan organellerin ve proteinlerin otofagozom oluşturmasıyla ilerleyen daha sonra da lizozomlarla birleşerek fagoforların oluşturulduğu ökaryotik hücrelerde korunmuş olan bir hücrel bozunma süreci olarak ifade edilebilir. Makrotofaji, hasarlı organellerin veya yanlış katlanmış olarak bulunan proteinler gibi hücrel sitotoksik bileşenleri ortadan kaldırmak amacıyla ortaya çıkan bir süreçtir. Bu süreç, hücrel düzeyde sağ kalımı sağlayabilmek için besin sınırlayıcı koşullar altında gerçekleşmektedir. Makrotofaji sırasında hücrel temel unsurların korunması ve otofajinin başlama ve ilerleme aşamaları kontrollü bir şekilde ilerlemelidir. Kontrol işlemi pek çok kinaz ve sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşmektedir. Kontrol mekanizmaları arasında en önemli kinaz grupları fosfatidilinozitol 3-kinaz (PtdIns3Ks) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3Ks) yer almaktadır [92].

Fagoforlar çift membranlı bölmelerden oluşmaktadır. Otofagozom oluşturmak için hasarlı prpteinleri ve organelleri yutar. Daha sonra da otolizozom oluşumu için lizozomlarla birleşirler. Lizozomal hidrolazlar aracılığıyla yutulan kargo içerikleri degrade edilir ve sonrasında ya yeniden kullanılır ya da yapı taşlarına kadar ayrıştırılır. Bu süreçte hücre içi materyalin korunması oldukça önemli olup hücrenin

hayatta kalma sürecinde ve dış etkenlerle başa çıkabilme görevlerini üstlenmektedir. Dış etkenler hücresel düzeyde makrotofajiyi etkileyebilmektedir [93]. Makrotofaji çeşitli içsel ve çevresel streslere yanıt olarak aktive olmaktadır. Bu etkenler arasında; besin ve enerji sınırlayıcı koşullar, endoplazmik retikulum stresi, reaktif oksijen türleri (ROS), hormonal dengesizlik ve mikroorganizmalara maruz kalma yer alır. Makrotofaji işlemi sırasında sitoplazmik içerik seçici olmayan şekilde veya otofaji reseptörleri aracılığıyla seçici bir şekilde kargolama işlemi ile ilerlemektedir. Makrotofaji sürecinde gerekli olan ve hücresel sağ kalım için enerji üretimi söz konusu olmaktadır. Hücresel yenileme olarak adlandırılabilen makrotofaji uzun ömürlü, durgun ve farklılaşmış replikatif olmayan hücreler için oldukça önemli bir rol oynar. Otofajik süreç gelişim, farklılaşma, hücresel sağkalım ve bağışıklık tepkilerini düzenlenmesinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Sorunlu bir şekilde gerçekleşen otofajik süreç inflamatuvar ve enfeksiyöz patolojiler, kanser, nörodejeneratif bozukluklar, karaciğer hastalıkları ve yaşlanma ile ilişkili olmaktadır [97].

Otofaji ilişkili protein (ATG) hücre içerisinde spesifik bölgelere getirilerek fagofor oluşumu ve izolasyon membranının nükleasyonu ile otofajik süreç başlamaktadır. Hücresel açlık ve stres durumunda AMPK tarafından Ulk-1 proteini serin 555 amino asidi üzerinden fosforile olarak FIP200 ve ATG13 proteinleri ile beraber Beclin-1 ve Vps34 (PI3K classIII) proteinlerinin aktive edilmesi sağlamaktadır. Heterodimerizasyon halinde bulunan Beclin-1 ve Bcl-2, JNK tarafından bozularak Beclin-1 aktif hale getirilebilir. Vps15 (p150) ve Beclin-1 ortak karakterizasyonu sonucu Beclin-1 ve Vps34 aktive olur. Sonrasında oluşacak olan otofagozom için BIF-1, UVRAG ve Atg14 gibi proteinlerde süreç içerisinde rol almaktadır. Atg12-Atg5-Atg16 protein kompleksi oluşur [94]. Otofajik sürecin devamında LC3-II-PE oluşumu için LC3 proteini Atg4 tarafından LC3-I 'e daha sonra E1 olan Atg7 ile kesilir ve E2 olan ATG3 ile kesilen bölgeye lipid yapıda bulunan fosfatidiletanolamin (PE) yerleştirilerek gerçekleştirilir ve böylece fagofor oluşumunun ilk evreleri gerçekleşmiş olur. Hücre membranının hem iç yüzeyinde hem de dış yüzeyinde olacak şekilde LC3-II yer almaktadır. Nükleasyon olayı esnasında otofagozom oluşumu gerçekleşmiş ve kargo içeriği alınmış durumdadır. Otofagozom içerisinde yer alacak olan kargo makrotofaji markırı olan

SQSTM1/p62 veya ubiquitin ile işaretlenmiş olmalıdır. Otofagozom sonrası lizozom ile füzyon işlemi sağlanarak degradasyon sağlanır. Bu esnada işaretleme görevinde bulunan SQSTM1/p62 de degrade edilir. Sonrasında oluşan otolizozom içerisinde degrade edilmiş olan proteinler, organeller veya hücrenin yok etmek istediği tüm içerik yer almaktadır [95].

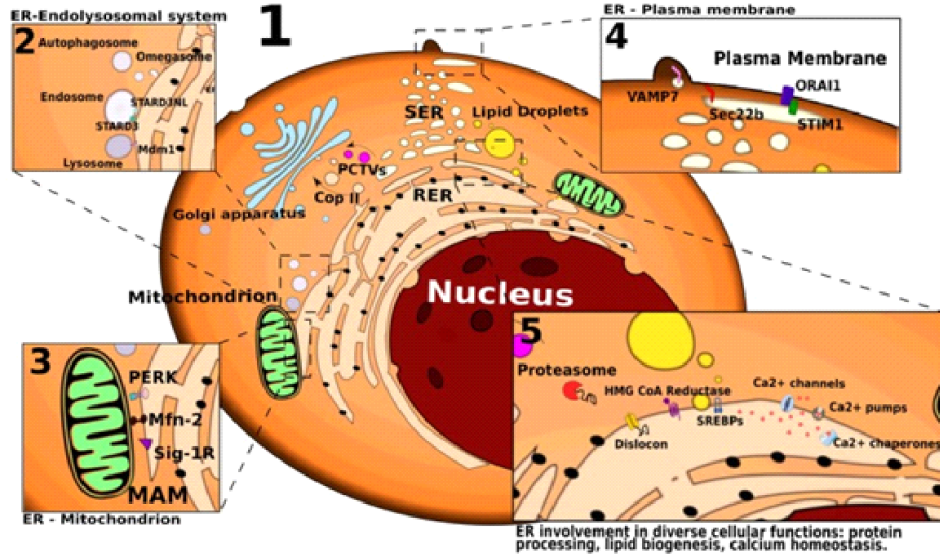


Şekil 12. Makrotofaji moleküler mekanizması [96]

2.7. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Endoplazmik Retikulum (ER) 1945 yılında Porter ve arkadaşları tarafından elektron mikroskobu aracılığıyla tavuk fibroblast benzeri hücrelerde gösterilmiştir. Endoplazmik retikulum sitoplazma boyunca uzanan uzun tübüllerden ve düzleştirilmiş disklerden oluşan bir ağ görünümüne sahiptir [70]. Endoplazmik retikulum zarının sitozolik yüzeyinde ribozom varlığı ve yokluğuna göre ayrılmaktadır, ribozom varlığında granüllü endoplazmik retikulum (PER) olarak adlandırılırken, ribozom yokluğunda granülsüz endoplazmik retikulum (SER) olarak adlandırılmaktadır. Ökaryotik sistemde hayati öneme sahip hücre içi organel olan endoplazmik retikulum, hücresel homeostazı koruyabilmek için birçok önemli role sahiptir [71]. ER, protein katlanması, post-translasyonel modifikasyonlar, taşıma, lipid sentezi, glikojen degradasyonu, detoksifikasyon, Ca^{+2} depolama ve salınımı gibi birçok temel olaylarda görev almaktadır [72]. ER birçok hücre içi organelle de

temasta bulunmaktadır. Bu organeller ve ER 'nin yapısı şekil 2.13 de ifade edilmiştir [81].



Şekil 13. Endoplazmik Retikulum molekülü ve diğer organellerle olan teması

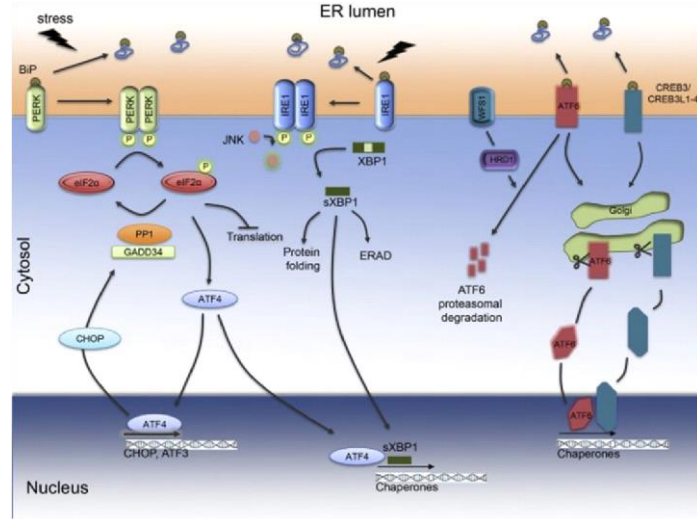
Protein transkripsiyonu sonrası haberci ribonükleik asitler olgunlaşmış protein üretimi için translasyona uğramak üzere ER lümenine aktarılır. ER 'deki herhangi bir sorun protein biyosentezi ve modifikasyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Bu süreç yanlış katlanmış protein (UPR) üretimine neden olmaktadır. Yanlış katlanmış proteinlerin birçoğunun hücrel metabolizma da bir görevi bulunmamaktadır ve bu nedenle de yeniden katlanma ya da protein degradasyonuna maruz kalmaktadırlar [73]. ER kontrol sistemi, yanlış katlanmış proteinlerin doğru katlanmasını ya da protein degradasyonuna yönlendirerek protein agregasyonunu engelleyen bir sistemdir. ER kontrol sistemi şaperonlar ve lektinler aracılığıyla gerçekleştirilir. ER kontrol sisteminde oluşan çeşitli fizyolojik ve patolojik etkenler sonucu bir sorun oluşur, bunun sonucunda da katlanmamış/yanlış katlanmış protein birikmesi ile endoplazmik retikulum stresi meydana gelir. Doğru protein katlanması protein sentezinde oldukça önemlidir. Endoplazmik retikulum stresi besin yoksunluğu, pH değişikliği, değişmiş glikolizasyon, kalsiyum yoksunluğu, oksidatif stres, DNA hasarı, viral enfeksiyon ve ATP tükenmesi sonrasında meydana gelmektedir [74]. ER stresi sonucu üç temel yolak aktifleştirecek hücrel strese karşı cevap üretilmesini

hedeflemektedirler. Bu yollar aynı anda veya farklı zamanlarda stres boyutuna göre aktiveleşebilirler. Hücresel stres sırasında hücrelerin temel amacı ER homeostazını geri kazanmak için UPR (katlanmamış protein cevabı) olarak adlandırılan evrimsel süreçte korunmuş olan sinyal iletim yolu aktive edilmesidir [75]. ER de biriken katlanmış veya yanlış katlanmış proteinleri tespit etmek için üç farklı ER transmembran sensörü yer almaktadır. Bunlar; inositol gerektiren enzim-1 α (IRE1 α), RNA bağımlı protein kinaz (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) olup ER stresinin üstesinden gelmeyi hedeflemektedirler. ER stresi çok yoğun olduğunda ve geri döndürülemediğinde UPR, içsel apoptoz yolağı üzerinden hücreyi ölüme götürür. Endoplazmik retikulum stresi sonucunda oluşan yanlış katlanmış protein cevabı hücre canlılığının korunması ve ER homeostazının sağlanması veya geri döndürülemeyen ER stresine bağlı öncü inflamatuvar cevaplarla hücre ölümünün başlatılması üzerinden ilerlemektedir [76].

Endoplazmik retikulum stresinin ilk oluşum aşamasında moleküler şaperonlar başarısız olması proteostaz bakımını bozar. ER stresinin olumsuz etkilerinin üstesinden gelebilmek için bir dizi farklı strateji geliştirilir. Bu aşamada yeni protein sentezleri engellenir ve birikmiş proteinler için birçok şaperon geni transkripsiyonel düzeyde indüklenir ve yanlış katlanmış proteinleri proteazomal bozunma için ER ile ilişkili bozunma sistemini (ERAD) aktive etmektedir. Endoplazmik retikulum stresi, orta aşamadayken yanlış katlanmış protein cevabı (UPR) ile ER homeostazı desteklenirse; endoplazmik retikulum stresi ileri aşamalarda hücresel apoptoza neden olmaktadır [77].

ER stresi sonrası hücrede IRE1 α otofosforile olur ve sonrasında transkripsiyon faktörü olan XBP1 alternatif olarak kesilir ve translasyona uğrar. Bunun sonucunda şaperon proteinler eksprese olur ve ER-bağımlı protein degradasyonu (ERAD) yolağı aktive edilir. Ayrıca IRE1 α ER de biriken protein miktarının azaltılmasına ve mRNA degradasyonuna neden olmaktadır. Aynı zamanda apoptozda da etkin rol alır. Bunu da apoptotik sinyal kinaz 1 (ASK1) aktivasyonu ve sonrasında da Jun-N terminal kinaz (JNK) ve p38-MAPK aktivasyonuna sebep olarak gerçekleştirir. JNK proteininin inhibisyonu ya da aktivasyonu Bim ve Bcl-2 proteinlerinin interaksyonu sonucu gerçekleşmektedir. p38-MAPK fosforilasyonu sonrasında CHOP proteini

aktive olur ve apoptoz yönünde değişiklikler gözlenir. Ayrıca apoptotik süreçle ilgili olan Bim ve DR5 proteinlerinde artışa neden olurken Bcl-2 proteinin de azalmaya neden olmaktadır [78]. ER stresi ile PERK proteinlerin fosforilasyonu gerçekleşerek aktifleştirilir. PERK proteini de serin51 amino asidi üzerinden eIF2 α (ökaryotik başlatıcı faktör 2 α) fosforile eder, bu proteinde selektif olarak ATF4 aktive eder. eIF2 α proteininin aktivasyonu ile devam eden yolak Er de protein birikimini azaltır. PERK tarafından NRF2 ve KEAP1 proteinleri bozunur ve sonucunda nükleer eritrosit 2 p45-ilişkili faktör 2 (NRF2) fosforilasyonu yoluyla aktivasyonuna neden olmaktadır. NRF2 ve ATF4 proteinlerinin fosforilasyonu oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarına neden olmaktadır. Buda antioksidan genlerinin ekspresyonuna sebep olarak artış göstermekte olan reaktif oksijen türevlerine (ROS) karşı gerçekleşir. PERK ve ATF4 proteinlerinin fosforilasyonu sonrası öncül apoptoz cevabı olarak C/EBP homolog proteininin (CHOP) seviyesi arttırılarak gerçekleştirilir [79]. Yanlış katlanmış protein cevabının (UPR) diğer bir yolağı olan ATF6 proteininin aktifleşmesi sonrası golgi organelinde SP1 ve SP2 olarak adlandırılan iki farklı kesim noktasına sahip proteazlar ile kesilir. ERAD ve XBP1 ile ilişkili olan proteinler kesilmiş ATF6 proteini şaperonları kodlayan gen bölgesinin ekspresyonunu regüle etmektedir [80] (Şekil 14).



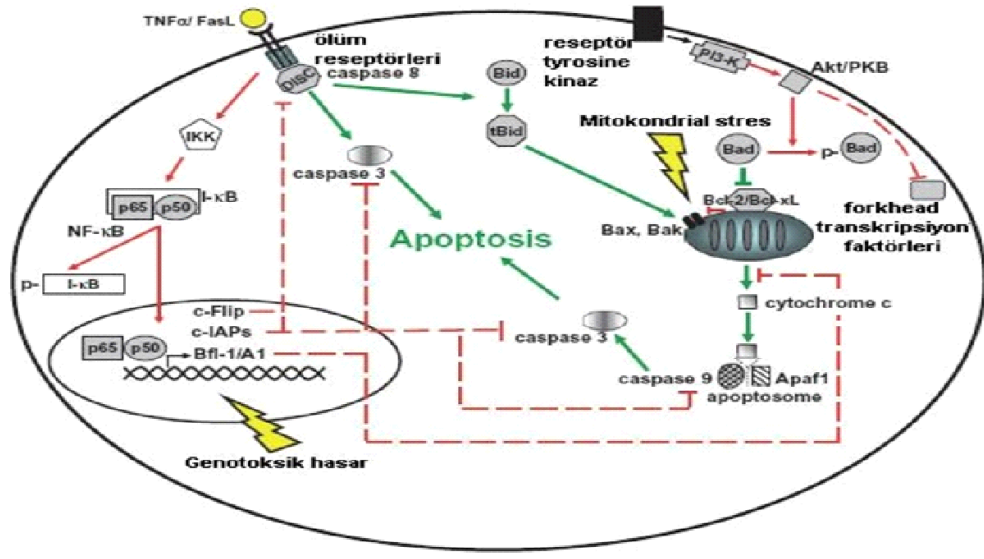
Şekil 14. Endoplazmik retikulum stresi sonucu katlanmamış protein cevabının moleküler mekanizması [82]

2.8. APOPTOTİK HÜCRE ÖLÜMÜ

1972 yılında Kerr tarafından ortaya konulan apoptoz, programlanmış hücre ölüm yolağı olarak nitelendirilmektedir. Hücre apoptoz için tüm gerekli bilgileri içermektedir. Hücresel düzeyde ölüm kararı alındığında apoptotik sürecin doğru bir şekilde ilerlemesi için koordine edilmiş bir aktivasyon süreci ve birçok alt programın yürütülmesi gerekmektedir. Apoptotik sürecin ilerlemesi hücre küçülmesi ile başlayarak kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma yoluyla ilerlemektedir [98]. Apoptoz, gelişim ve doku homeostazında önemli bir rol almaktadır. Apoptozun herhangi bir etken sonucu anormal bir şekilde düzenlenmesi çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Apoptoz sonucu ölüm emri ile fagositlerin toplanmasını sağlayan uyarıcı sinyallerin aktive olması söz konusu olmaktadır. Apoptoz ilk zamanlarda çevredeki dokuları etkilemeyen sessiz bir süreç olarak kabul edilmekteyken şuan, komşu hücreler üzerinde ciddi etkilere sebep olabilecek sinyallerin kaynağı olduğu anlaşılmıştır. Çeşitli etkenler sonucu hücresel düzeyde oluşabilecek stres ve yaralanma gibi durumlarda apoptoz geçiren hücreler, büyüme ve doku onarımı için mitojenik ve morfojenik sinyal proteinlerinin salgılanmasını tetikleyebilmektedir [99]. Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz çeşitli fizyolojik süreçlerde rol almaktadır. Fetal gelişim veya organizmanın yetiştikine dönüşümü sırasında hücrelerin hızlı ve sürekli üretimi söz konusudur. Sonrasında oluşum tamamlandığında hücresel apoptoz yolağı görev alacaktır. Apoptoz vücut dengesinin gelişmesi ve korunmasında oldukça önemli bir rol alır. Aynı zamanda bağışıklık sisteminde de etkin rol almaktadır. İşlevini yerine getiremeyen hücreler, tümör hücreleri ve patojen aracılı enfekte olmuş hücrelerin organizmadan yok edilmesinde oldukça önemlidir. Apoptotik sürecin hatalı gerçekleşmesi veya deregülasyonu kanser ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli sorunlara yol açmaktadır. Aynı zamanda aşırı apoptoz ise nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hastalıklar ve AIDS gibi hastalıkların gelişimine neden olabilmektedir [100]. Ayrıca, aktif bir işlem olan apoptoz enerji gerektiren bir süreç ile ilerlemektedir.

Apoptotik hücre ölümü sürecinde pek çok anahtar rol oynayan proteinler bulunmaktadır. Kaspazlar olarak adlandırılan sistein-aspartik proteazlar ile hücresel ölüme hazırlık, hücresel yapıların degradasyonu ve çevresel hücrelerde stresin

minimum da tutulması gibi süreçlerde etkin rol oynamaktadırlar. Bcl-2 ailesi proteinleri hem apoptotik süreci tetiklemede hem de anti-apoptotik süreçte apoptozun engellenmesin de görev almaktadır. Proapoptotik ve antiapoptotik süreçte yer alan proteinler arasındaki denge ile hücre sağkalımı ve ölümü arasında kalan dengede belirleyici rol oynamaktadır. Apoptoz içsel (mitokondriyal) ve dışsal (ölüm reseptörleri aracılı) apoptoz olmak üzere iki farklı yolak üzerinden aktive olmaktadır [101].



Şekil 15. Apoptozun moleküler mekanizması [102]

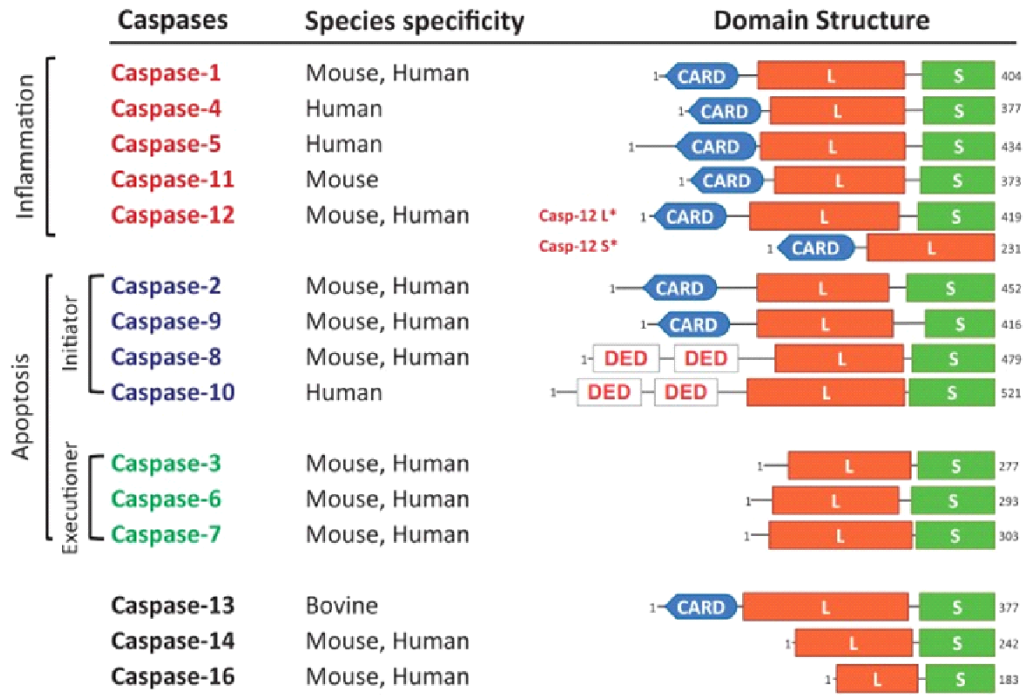
2.8.1. Kaspazlar

Kaspazlar (Cysteine **Asp**-specific proteases) metazoanlar boyunca korunmuş olup apoptoz, sağ kalım, enflamasyon, farklılaşma gibi pek çok hücreyel olaylarda etkin rol oynayan sistein proteaz ailesi üyeleridir. Hücre ölüm yolağı olan apoptozun ana efektörleridirler. Sistein bölgelerinin katalitik bölge olarak kullanan kaspazlar proteolitik enzimlerdir. Ayrıca kaspazlar hedef protein üzerinde bulunan aspartik asit bölgesinin yanından spesifik olarak kesim yapmaktadırlar [111]. Kaspazlardaki düzensizlik pek çok hastalığa neden olduğu için terapötik hedef olarak kullanılırlar. Düzensizliğinin sebep olduğu hastalıklar arasında kanser, kalp hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, osteoartrit, romatoid artrit gibi önemli rahatsızlıklar yer

almaktadır. İnflamasyonda görev alan kaspazlar öncü sitokin aktivatörleri olarak görev yaparlar. Kaspazlar ~ 20 kDa ve ~ 10 kDa 'lık büyük ve küçük katalitik alt birimlerin ardışık değişken boyutlu bir amino-terminal bölgesinden oluşmaktadır. Kaspazlarda ki bu iki katalitik bölge proteaz bölgesini oluşturmaktadır. Başlatıcı kaspazların amino-terminal bölgeleri kaspaz alım bölgesini veya ölüm efektör bölgelerini oluştururlar. Apoptotik süreçte yer almaları oldukça önemli olan kaspazlar iki grup altında incelenebilir. Bunlardan biri başlatıcı kaspaz grupları olurken diğeri ise sonlandırıcı kaspaz gruplarıdır. Spesifik ölüm yolaklarında görev alan başlatıcı kaspazlar ilk aktive olan protein gruplarından oluşmaktadır. Aynı zamanda iki aşamalı olarak ilerleyen kaskad aktivasyonunda sonlandırıcı kaspazları da aktive etme görevleri bulunmaktadır. Kaspaz aktivitelerindeki düzensizlik hücresel süreç için oldukça önemlidir. Bu nedenle de hücreler kaspaz proteinlerini öncü form da bulundurmakta ve kesilmedikleri sürece aktive olmamaktadırlar [112].

Apoptoz da rol oynayan kaspazlardan içsel apoptoz yolağında kaspaz 9 ve kaspaz 2, dışsal apoptoz yolağında ise kaspaz 8 ve kaspaz 10 başlatıcı kaspazlar olarak görev alırlar. İçsel apoptoz yolağında yer alan kaspaz 9 sitozol de monomerik yapıda bulunmaktadır. Ancak aktif olduğunda dimerik yapıdadır. Mitokondriyal membran potansiyeli bozulan içsel apoptoz yolağında oluşan apoptozom kompleksi kaspaz 9 'un kesilip aktive olmasını sağlar. Bunu da N-terminal kaspaz aktivasyon çağırıcı domeyin (CARD) aracılığıyla Apaf-1 'in kaspaz 9 'u apoptozom kompleksine çağırmasıyla gerçekleştirir. İçsel apoptoz yolağında rol oynayan diğeri bir kaspaz grubu olan kaspaz 2, apoptotik cevaba bağlı DNA hasarında görev almaktadır. Kaspaz 2 'nin aktivasyonu kaspaz 9 gibi Apaf-1 proteinine bağlı olarak gerçekleşmemektedir. Kaspaz 2 'nin aktivasyonu kaspaz 9'a göre CARD proteininden daha kompleks yapıdaki proteinlerle interaksiyonu sonucu gerçekleşmektedir. Kaspaz 8 ve kaspaz 10 immün sistem tarafından aktivasyonları sağlanarak dışsal apoptoz yolağında efektif rol oynamaktadır [113]. Dışsal apoptoz yolağın aktivasyonu tümör nekroz faktör reseptör tip 1 (TNFR1) ailesi üyesi olan transmembran reseptörü FAS (CD95) ligasyonu ile gerçekleşmektedir. FAS reseptörünün hücre yüzeyinde agregat oluşturması ligasyon ile gerçekleşmektedir. Agregat oluşumu sonrası FADD (FAS ile ilişkili ölüm domeyinine sahip protein), FAS reseptörünün hücre içi bölgesine çağırılır. Oluşan komplekste FADD N-terminal

ölüm efektör domain (DEDs) bölgesi aracılığıyla kaspaz 8 çağrılır. DISC (ölüm başlatıcı sinyal kompleksi) ifade edilen bölgede bulunmaktadır. Oluşan kompleks de kaspaz 8 'i aktive eder. Kaspaz 8 'in aktive olması kesilip dimerize yapıya ulaşması sonucu gerçekleşir. Dışsal apoptoz yolağı insan hücrelerinde kaspaz 10 aracılığıyla gerçekleştirilir ve bazen de kaspaz 8 'in yerini alır. Başlatıcı kaspazların yanı sıra sonlandırıcı kaspazlar da bulunmaktadır. Sonlandırıcı Kaspazlar arasında kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7 yer almaktadır. İçsel ve dışsal apoptoz yolaklarında görev alırlar. Kaspaz 3 ve kaspaz 7 sitozolde inaktif durumda ve dimer halinde bulunurlar. Domainler arası bağlanma bölgelerinden kesilebilen kaspazlar kısıtlı proteoliz ile aktifleşebilir ve kesilimleri için başlatıcı kaspazlara ihtiyaç duyarlar [114,115].

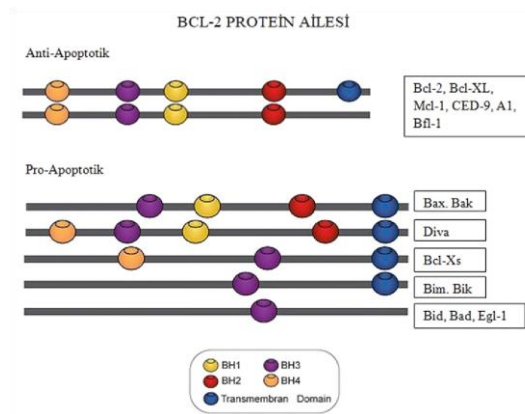


Şekil 16. Kaspazların moleküler yapısı ve fonksiyonel sınıflandırılması [116]

2.8.2. BCL-2 Ailesi

İçsel ve dışsal yolaklar üzerinden ilerleyen apoptozda, içsel apoptoz yolağı ile yakından ilişkili B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) protein ailesi, memeli hücrelerinde apoptotik faktörlerin salınımını başlatarak hücreyi ölüme götürme ya da apoptozun gerçekleşmesini engellemek için mitokondrinin bütünlüğünü düzenlemede görev almaktadır. Ayrıca kaspaz aktivasyonu üzerinde de rol oynamaktadırlar. Bcl-2

protein ailesinin pro-apoptotik (apoptoza teşvik eden faktörler) ve anti-apoptotik (apoptozu önleyici faktörler) proteinleri arasındaki antagonizm aracılık eder ve bu etkileşim süreç içerisinde organizmalarda korunmuş vaziyettedir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki etkileşimin moleküler temeli, ilgili proteinlerin korunmuş olan sekanslarına dayanmaktadır. Bcl-2 protein ailesinde bulunan her bir proteinin Bcl-2 Homoloji (BH) motifleri olarak bilinen dört çeşit olarak bulunan korunmuş dizilerden oluşmaktadır [117]. Apoptoz sürecinde görev alan Bcl-2 protein ailesi üyelerinde BH3 domain içeren gruplar tarafından yolak aktive olmaktadır. Öncü apoptoz por oluşum proteinlerinden olan BAX (Bcl-2 ilişkili X protein) ve BAK (Bcl-2 antagonist/katil) ile BİM (Bcl-2-etkileşim hücre ölümü düzenleyicisi), BİD (BH3-etkileşim ölüm agonist domeyini), PUMA (p53-anlatımı artmış apoptoz başlatıcısı) gibi proteinlerin etkileşimi sonucu aktive olmaktadır. Bax ve Bak mitokondri membran yüzeyinde allosterik yapıların değişimine uğrayarak mitokondri membranında por oluşumunu sağlamaktadırlar. BH domainleri arasından BH1, BH2 ve BH3 domainleri hidrofobik girintiler oluştururken, BH3 domaini ise anti-apoptotik proteinlerin bağlanma bölgelerini oluşturmaktadır. Ayrıca BH4 domeyini ise endoplazmik retikulumda kalsiyum pompalarının kontrolünün gerçekleştirilebilmesi için inositole bağlanmada kullanılmaktadır. BH domeyini dışında Bcl-2 protein ailesi üyelerinde MBR (membran bağlanma bölgesi) de bulunmaktadır. Bcl-2 protein ailesi üyeleri MBR bölgeleri aracılığıyla membranla interaksiyona geçebilmektedir [118,119,120].



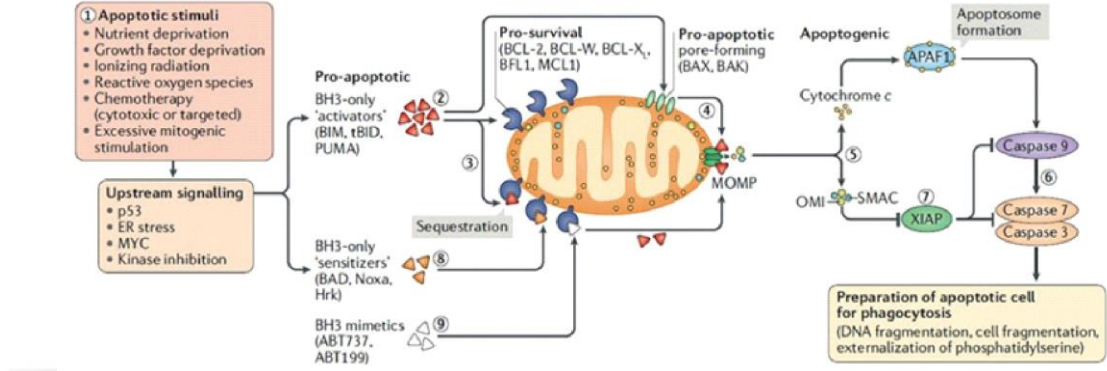
Şekil 17. Bcl-2 protein ailesinin moleküler yapısı ve domainleri

2.8.3. İçsel Apoptoz Yolağı

İçsel apoptoz yolağı mitokondriyal apoptoz yolağı olarak da adlandırılmaktadır. Hücre canlılığının belirteci olarak görülen mitokondri üzerinde oluşan geri döndürülemez değişiklikler ile yolak aktifleşmektedir. İçsel apoptoz yolağı, oksidatif stres, aşırı kalsiyum yüklenmesi ve DNA hasarı gibi hücre içi stres koşulları altında tetiklenen, hücre içi sinyallerin üretilmesi ve hücre içi biyokimyasal değişikliklere yol açarak gerçekleşir. Uyarı sonrası membran potansiyelinin değişimi ile mitokondriyal transmembran bozulmaya uğrayarak geçirgenlik artırılır. İçsel apoptoz yolağı mitokondriyal membran boşluğundan proapoptotik protein salınımını başlatan Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilmektedir [103].

Memeli hücrelerinde Bcl-2 ailesi proteinlerinden olan Bax ve Bak öncü apoptoz proteinleri aracılığıyla yolağın aktivasyonu sağlanır. İçsel apoptoz sinyali almayan hücrelerin mitokondri membranında Bak proteini lokalize olmaktadır Bax sitoplazmada serbest olarak bulunur. İçsel apoptoz sinyali alındığında Bax ve Bak proteinleri mitokondri membranına yönelerek oligomerik membran porlarını oluştururlar. Oluşan oligomerik membran porlarının ortadan kaldırılması için antiapoptotik Bcl-2 protein ailesi üyeleri Bak ve Bax 'a bağlanarak inaktif olmalarını sağlarlar. İçsel apoptoz yolağı esnasında oluşan porlar öncü apoptotik faktörlerin mitokondriden sitoplazmaya geçişine izin vermektedir. Bax ve Bak proteinlerinin oluşturduğu oligomerik komplekse veya antiapoptotik Bcl-2 proteinlerine BH-3 proteinleri doğrudan bağlanarak nötralize edilmesi sağlanmaktadır. Oluşan oligomerik kompleks sonrası oluşan porlarda mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c, Smac ve endonükleaz G apoptotik proteinlerinin geçişi sağlanır. Sitoplazmaya geçişi sağlanan sitokrom-c Apaf-1 ile etkileşim kurarak apoptozom oluşumu sağlar. Oluşan apoptozom kompleksi içerisindeki Apaf-1 kaspaz 9 'a bağlanır. Bu şekilde kaspaz 9 aktivitesi oldukça yüksek bir noktaya ulaşmış olur. Apoptozom içerisinde yer alan kaspaz 9 prokaspazlarla oligomerik bir yapı oluşturur. Kaspaz 9, kaspaz 3 'ü keserek hücre ölüm kaskadını artırıcı yönde etki yaparken kaspaz 9 kendini keserek kompleksten ayrılır. Kaspaz 9 'un ayrılması inaktif olmasına neden olur. Bu da apoptozom aktivitesinin sınırlanması için oldukça önemlidir. Kaspaz 3 efektör kaspazları keserek ve BH-3 domeyinine sahip Bid proteinini keserek apoptotik

aktiviteyi artırır. Kesilen Bid aracılığıyla geri dönüşümlü bir döngü olarak Bax ve Bak aktivasyonu artarak sitokrom-c ve Smac salınımı sağlanır, sonrasında ise kaspaz 9 aktivasyonu görülür [104,105].

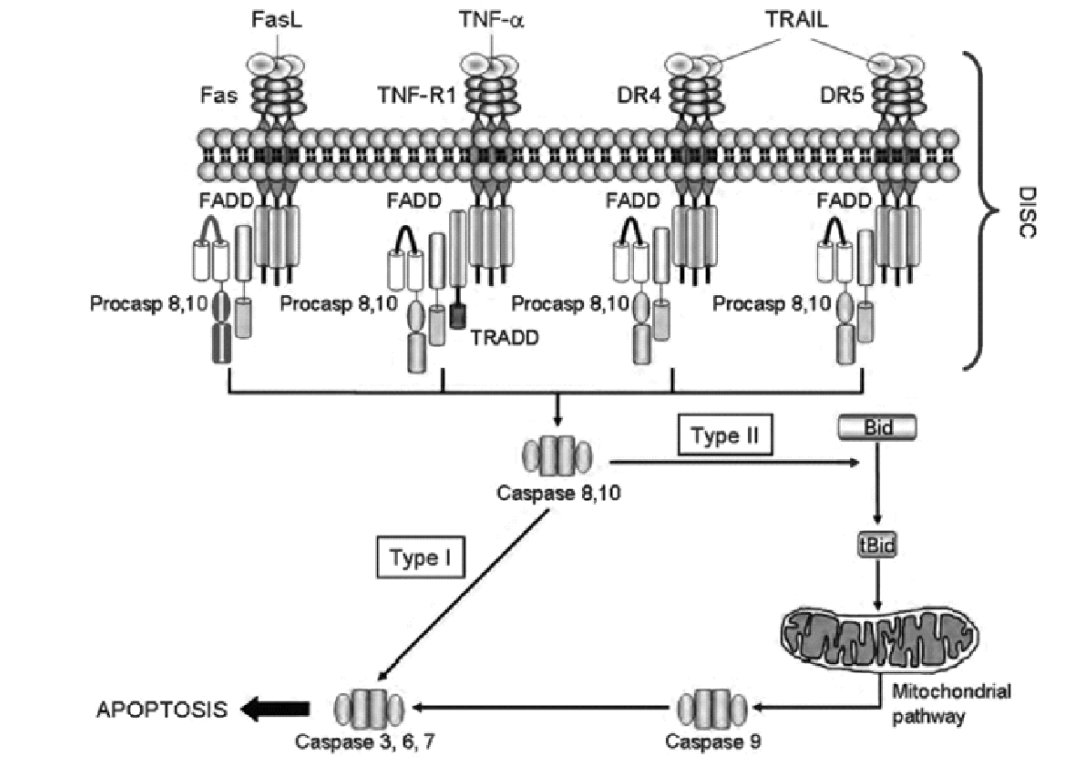


Şekil 18. İçsel Apoptoz Yolağı [106]

2.8.4. Dışsal Apoptoz Yolağı

Dışsal apoptoz belirli transmembran reseptörlerin aynı kökenli ligandlarına bağlanması sonucu tetiklenen sinyal yolağıdır. Bu transmembran reseptörler, ölüm reseptörleri (DR) olarak da bilinirler. Ölüm reseptörleri tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin üyeleridir. Ölüm reseptörleri ile dışsal apoptotik yolak aktive hale getirilir. Bilinen sekiz DR bulunmakta olup DR4 ve DR5 kanser hücrelerinde eksprese edilmektedir. Ölüm reseptörleri arasında Fas, TNF α reseptör 1 (TNF-R1) yer alırken bu reseptörlerin ligandları FasL ve TNF α olmaktadır. Tümör nekroz faktör reseptör ailesi üyelerinden olan Fas, üç sisteince zengin domain içeren tip I membran proteinidir. Fas reseptör proteininin sitoplazmik kısmı yaklaşık seksen ölüm domaini bulundurmaktadır. Bu domainler tüm ölüm reseptörleri ile paylaşılmaktadır. Fas reseptörünün ligandı olan Fas ligandı trimerik yapıdadır. Sitotoksik T lenfositlerinin membranında bulunmaktadır [107]. Fas reseptörüne ligandı bağlandığı anda dışsal apoptoz yolağı aktive olmaktadır. Aktif hale geçmiş olan Fas konformasyonel değişikliğe uğrayarak hücresel kaskad da sinyal iletiminin başlamasına neden olmaktadır. Aktif haldeki Fas, FADD adaptör proteini ile birleşerek DISC kompleksinin oluşumunu sağlamaktadır. Öncü kaspaz 8 'in ölüm efektör domaininden DISC kompleksi bağlanır. Standart hücresel koşullar altında

öncü kaspaz 8 proteini monomerik yapıda bulunurken DISC kompleksi ile bağlandığında dimerizasyona uğrayarak katalitik aktivite sergilemektedir. Oluşan dimerik yapılar komşu dimerizasyon geçirmiş proteinleri keserek serbestleştirir. Sonucunda da heterotetramer aktif kaspaz 8 kompleksi oluşur. Aktif haldeki kaspaz 8 aracılığıyla kaspaz kaskadı için gerekli olan kaspazlar aktive olmaktadır. Kaspaz 8 'in diğer bir görevi de Bid proteinini BH-3 domaininden keserek içsel apoptoz yolağının başlatılmasını sağlamaktır. Hücre yüzeyinde transmembran nitelikte Fas reseptörü bulunurken hücre ölüm kaskadından kaçışı nasıl sağladığı oldukça önemlidir. Hücreler cFLIP olarak adlandırılan kaspazlar ilişkili proteini bulundurlar. Bu protein hücre içerisinde katalitik aktivitesi olmayan kaspaz 8 'e benzer nitelikte bir proteindir. cFLIP yüksek ekspresyon seviyesinde hücrede bulunduğu için öncü kaspaz 8 monomerlerine bağlanarak hücresel düzeyde ölüm yolağının aktive olmasını engelleyici düzeyde etkili enzim oluşturmaktadır [108,109].



Şekil 19. Dışsal Apoptoz Yolağı [110]

3 MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1.MATERYALLER

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo A bölümünde yer almaktadır.

3.1.2. Hücre Kültürü Malzemeleri

Hücre kültüründe kullanılan malzemeler Tablo B bölümünde yer almaktadır.

3.1.3. Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar Tablo C bölümünde yer almaktadır.

3.1.4. Çözeltiler

Kullanılan çözeltiler ve içerikleri Tablo D bölümünde yer almaktadır.

3.1.5. Antikorlar

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Model Hücre Hatları

A549 (ATCC® CCL-185™) akciğer kanseri hücresi olup 58 yaşında Kafkas kökenli erkek bireyden eksplant kültürü yoluyla elde edilmiştir. Epitel benzeri ve adherent yapıdaki A549 akciğer kanseri hücre hattı aynı zamanda uygun bir transfeksiyon konakçısıdır. Bu hücrelerin % 24'ünde meydana gelen 66 modal kromozom sayısına sahip bir hipotriploid insan hücre hattıdır. 64 (% 22), 65 ve 67 kromozom sayımına sahip hücreler de nispeten yüksek frekanslarda meydana geldi; daha yüksek ploidileri olan oran % 0.4'de düşüktü. Tüm hücrelerde tek kopya halinde 6 işaret mevcuttur. Bunlar der (6) t (1; 6) (q11; q27); 8 del (6) (p23); del (11) (q21), del (2) (q11), M4 ve M5'dir. Çoğu hücrede iki X ve iki Y kromozomu vardır. Bununla birlikte, analiz edilen 50 hücrenin % 40'ında bir veya her iki Y kromozomu

kaybedilmiştir. N2 ve N6 kromozomlarının hücre başına tek kopyası vardır; ve N12 ve N17 genellikle 4 kopyaya sahiptir. Sitogenetik bilgiler, ATCC'deki ilk tohum stoğuna dayanmaktadır. Bazı hücre hatları için literatürde sitogenetik instabilite bildirilmiştir. M. Lieber ve ark. A549 hücrelerinin, lesitini, sitidin difosfokolin yolunu kullanarak yüksek oranda doymamış yağ asitleri sentezleyebildiğini ortaya koymuştur.

BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) normal insan bronşiyal epitel hücrelerinden otopsi yoluyla elde edilmiştir. Bu hücre hattı uygun bir transfeksiyon konakçısıdır. Hücreler seruma tepki olarak skuamöz farklılaşma geçirme yeteneğini korur ve farklılaşma ve / veya karsinogenezi indüklemeye veya etkileme yeteneği için kimyasal ve biyolojik ajanları taramak için kullanılabilir. Hücrelere bir adenovirüs 12-SV40 virüs hibriti (Ad12SV40) bulaşmış ve klonlanmıştır. Hücreler, immünsüprese edilmiş farelerde tümörojenik değildir.

3.2.2. Hücre Kültürü

Akciğer kanseri hücresi olan A549 (ATCC® CCL-185™) ve normal insan bronşiyal epitel hücresi olan BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda 37°C 'lik hücre inkübatöründe, RPMI-1640 besiyerinde %10 fetal sığırsı serumu (FBS) ve 10 U/ml Penisilin/ Streptomisin ile büyütülmüştür. Hazırlanmış olan besiyeri hücre kültürü ile uyumlu 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip +4°C de 50ml 'lik falkonlarda muhafaza edilmiştir. Hücreler 25 veya 75cm² 'lik hücre kültürü petrilerinde büyütülmüştür.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler konfluent duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Hücreler pasajlanarak ilgili deneyler için ekime alınabilir. Hücreler besiyerinden uzaklaştırılarak 75cm² 'lik petri kabı için 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanır. Daha sonra 75cm²'lik petri kabı için 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) çözeltisi ilave edilerek %5 CO₂ ve %95

nem içeren ortamda 37°C 'lik hücre inkübatöründe 5 dakika bekletilir. Hücrelerin kalktıklarından emin olunduktan sonra 1:1 oranında RPMI-1640 besiyeri ilave edilerek tripsin inaktif hale getirilir ve petri kabı yıkanarak 15 'lik falkona toplanır. Hücreler 500 g (2000 rpm) de 5 dakika santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırılarak 1ml RPMI-1640 besiyeri ile hücreler pipetajlanarak homojen bir hücre süspansiyonu elde edilir. Neubauer hemositometresinin kanalına hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak hemositometrede bulunan 25 kare içerisindeki hücre sayımı gerçekleştirilir ve 10^4 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre miktarı hesaplanır. 75 cm² 'lik petri kabına 8×10^5 hücre ekilerek pasajlama işlemi tamamlanır.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Petri yüzeyine adhere durumundaki hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile yüzey etkileşimleri kaldırılır. %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37°C 'lik inkübatörde 5 dakika bekletilir. Daha sonra 1:1 oranında besiyeri ile muamele edilerek enzim aktivitesi inhibe edilen hücreler 15 'lik falkona toplanır. 500 g (2000 rpm) de 5 dakika santrifüjlenir. Hücreler 1ml freezing medya içerisinde çözülerek kriyo tüpe alınır ve önce -80°C' de daha sonrada sıvı azot tankında inkübe edilebilir.

3.2.5. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azottan çıkarılan hücreler hızlıca çözülerek üzerine 1:1 oranında besiyeri ilave edilir. Hücreler 500 g (2000 rpm) de 5 dakika santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler besiyerlerinde çözülür. Oluşan homojen çözeltideki hücreler 25 veya 75 cm² 'lik petri kaplarına ekimleri yapılarak inkübatörde muhafaza edilir.

3.2.6. Hücre Canlılığının Belirlenmesi (MTT Testi)

Hücre canlılığının belirlenmesi için 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) ajanı kullanılmıştır. MTT ajanı içerisinde bulunan tetrazolium halkası, canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri sayesinde parçalanır ve mor renkli formazan tuzu oluşturur. Sonucunda da kolorimetrik yöntem ile hücre canlılığının belirlenmesi hedeflenmiştir. A549 akciğer

kanseri ve BEAS-2B normal bronşiyal epitel hücreleri 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu petrilere ekilir. 1 gün boyunca inkübatörde inkübe edilen hücreler 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M Abemasiklib olacak şekilde uygulanır. İlaç uygulamasından 24 saat sonra 10 μ l MTT ajanı uygulanır. 4 saat boyunca inkübe edilen hücreler besiyerinden uzaklaştırılarak oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için her kuyucuğa 100 μ l dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek karanlıkta oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir ve sonrasında mikropılaka ELISA okuyucusu kullanılarak ikili dalga boyunca (570 ve 655nm’de) absorbans ölçümü yapılır.

3.2.7. Hücre Sağ kalım Analizi

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B normal bronşiyal epitel hücreleri 10×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyucuklu petrilere ekilir. Gece boyunca inkübe edildikten sonra, hücrelere canlılık analizi sonrası belirlenen dozlarda abemasiklib uygulanarak her iki hücre hattı için 24, 48 ve 72 saatlik ilaç uygulamaları tamamlandıktan sonra hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırılarak 500 g (2000 rpm) de 5 dakika santrifüj edilir. Hücre pelleti 100 μ l PBS içerisinde çözülerek 1 μ l Tripkan mavisi eklendikten sonra Neubauer hemositometresinin kanalına hücre süspansiyonundan 10 μ l alınarak hemositometre de bulunan 25 karede içerisindeki canlı hücre sayımı gerçekleştirilir ve 10^4 ile çarpılarak canlı hücre sayısı hesaplanır.

3.2.8. Yara İyileşme Deneyi

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B normal bronşiyal epitel hücreleri 35mm^2 ‘lik petri kabına 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılır. Gece boyunca hücreler %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37°C ‘lik inkübatörde inkübe edilir. Daha sonra petri tabanı 1000 μ l ‘lik pipet ucu ile hücreler kaldırılmadan çizilir. Belirlenen miktarlarda abemasiklib uygulaması ile petri kabındaki hücrelerin 12, 24 ve 48 saat boyunca ilaç ile muamele edilerek inkübe edilir. Petri tabanında oluşan yarıkların belirtilen saatlerde mikroskopta çekimi alınır ve daha sonra kristal viyole ile boyanarak mikroskopta çekimi alınarak sonuçlar tekrarlanır.

3.2.9. Asılı Damla Hücre Modeli

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B normal bronşiyal epitel hücreleri 60mm² 'lik petri kabının kapaklarına, 20µl besiyer içerisinde 1x10⁴ hücre olacak şekilde homojen bir çözelti oluşturur ve mikro pipet yardımıyla damla damla bırakılır. İlaç uygulaması için, 1x10⁴ hücre 1 µM Abemasiklib içeren besiyer içinde 20 µl final hacminde homojen çözelti hazırlanarak 60 mm² 'lik petri kapağına mikro pipet yardımıyla damla damla bırakılır. Petrilere kaplarının içerisine 1 ml PBS eklenerek kapak kısmı dikkatlice kapatılır. Petri kabındaki hücreler hareket ettirilmeden %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37°C 'lik inkübatörde inkübe edilir. Belirlenen süre inkübasyonu sonrası hücreler mikroskopta kapak dikkatlice oynatılmadan ve damla modeli bozulmadan görüntüleri alınır.

3.2.10. Hücre Akış Sitometrisi ile PI Boyama Analizi

Abemasiklib'in A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B normal bronşiyal epitel hücrelerinde hücre döngüsü üzerine etkisini belirlemek amacıyla PI boyaması sonrasında akış sitometrisi analizi gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu petrilere 3x10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılır ve gece boyunca hücrelerin yapışması bekledikten sonra canlılık testi ile belirlenen dozlarda ilaç uygulanarak 24 saat boyunca inkübe edilir. Pasajlama işlemi gibi hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırılarak besiyerinde enzim inhibisyonu sonrası 500 g (2000 rpm) de santrifüjlenir ve süpernatant uzaklaştırılarak hücreler %70 'lik etanol ile muamele edilerek sonrasında +4°C de 1 hafta fiksasyon işlemi gerçekleştirilir. İnkübasyon sonrası etanol uzaklaştırılarak 1 ml 1X PBS içerisinde 1 µl PI (1 mg/ml) boyası olacak şekilde boyama işlemi gerçekleştirilir ve hücreler karanlıkta 30 dakika boyunca inkübatörde bekletildikten sonra akış sitometrisinde okutma işlemi gerçekleştirilir.

3.2.11. Total Protein İzolasyonu

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B normal bronşiyal epitel hücreleri 100 nm 'lik petrilere 1x10⁶ hücre olacak şekilde ekim yapılır. Bir gece yapışması beklenen hücreler canlılık testi ile belirlenen dozlarda abemasiklib ile muamele edilerek 24

saat etüvde inkübe edilir. Daha sonra hücreler 1xPBS çözeltisi ile kazıyıcılar yardımıyla petriden toplanarak 2 dakika boyunca +4°C de 13.200 rpm de santrifüjlenir. Bu işlem petrideki tüm hücreler toplanıp çöktürülene kadar tekrarlanır. Santrifüj ile çöktürülen hücrelere 1x CLB ile muamele edilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilir. Daha sonra 20 dakika boyunca +4°C de 16000 rpm de santrifüj edilerek süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alınır ve uzun süreli saklama koşulları için -80°C de muhafaza edilir.

3.2.12. Fosfatlanmış Protein İzolasyonu

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B normal bronşiyal epitel hücreleri 100 nm 'lik petrilere 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılır. Bir gece yapışması beklenen hücreler canlılık testi ile belirlenen dozlarda abemasiklib ile muamele edilerek 24 saat etüvde inkübe edilir. Daha sonra hücreler 1xTBS çözeltisi ile kazıyıcılar yardımıyla petriden toplanarak 2 dakika boyunca +4°C de 13.200rpm de santrifüjlenir. Bu işlem petrideki tüm hücreler toplanıp çöktürülene kadar tekrarlanır. Santrifüjle çöktürülen hücrelere 1x p-CLB ile muamele edilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilir. Daha sonra 20 dakika boyunca +4°C de 16000 rpm de santrifüj edilerek süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alınır ve uzun süreli saklama koşulları için -80°C de muhafaza edilir.

3.2.13. Protein Miktarının Bradford Analizi ile Belirlenmesi

Protein izolasyonu sonrası -80°C de muhafaza edilen proteinlerin miktar tayinini yapabilmek amacıyla Bradford tekniği kullanılır. 96 kuyucuklu petri kullanılarak konsantrasyonu 1,5 µg/ml olan Bovine Serum Albumin (BSA) (1,5-7,5) µg/µl arası artan dozlarda uygulanarak standart bir eğri oluşturulur. Protein örneklerinden belirlenen sıra ile 1 µl/kuyu ilave edilerek 200 µl Bradford solüsyonu ile muamele edilir. 5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra örnekler 595 nm dalga boyunda mikropilaya okuyucu da okutulur. Çıkan absorban değerlerine göre proteinlerin konsantrasyon değerleri belirlenir.

3.2.14. İmmüno blotlama Analizi

3.2.14.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması

İmmüno blotlama tekniği için bradford analizi ile konsantrasyonu belirlenen proteinlerin 5X Laemmli yükleme tamponu ile 40 µg protein örnekleri 1:5 oranında karıştırılarak 5 dakika 95°C de denatüre edilir. Örnekler SDS-PAGE jeline yüklenmek üzere hazır hale getirilmiştir. Bu bekleme süresi içinde örnekler buzda tutulur.

3.2.14.2. SDS-PAGE

%12 'lik sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel (SDS-PAGE) hazırlanır. SDS-PAGE jel sistemi için uygun tank sistemi kurularak soğuk 1X yürütme tamponu içerisine jel sistemi yerleştirilir. Protein belirteçleri de kullanılarak belirlenen sıra ile önceden hazırlanmış proteinler jel sistemine yüklenir. Protein örnekleri 85 V sabit gerilim ile 3 saat boyunca yürütülür.

3.2.14.3. Proteinlerin Membran Üzerine Transferi ve Membran Bloklama

SDS-PAGE jel sisteminde yürütülen proteinler yükleme jelinden uzaklaştırılarak ayırma jeli dH₂O 'ya alınır. Poliviniliden florid (PVDF) membran kullanılmadan önce membran aktifleştirmek amacıyla %100 metanol içerisinde bir miktar tutularak ıslak transfer sistemi için transfer tamponu içerisinde filtre kağıtlarıyla beraber akımın yönüne bağlı olarak sandwich şeklinde hazırlanan sistem, 300mA de 1 saat boyunca transfere alınır. Transfer sonrası PVDF membran üzerine geçen proteinler %5 yağsız süt tozu (%0,1 Tween 20 içeren 1xTBS) içerisinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalayıcıda bekletilir.

3.2.14.4. Antikor Bağlanması ve Membranların Görüntülenmesi

1 saat boyunca %5 yağsız süt tozunda bloklanan membran 1:1000 olarak hazırlanan proteine özgü birincil antikor içerisine alınarak 1 gün boyunca +4 °C de muamele edilir. Birincil antikora özgü ikincil antikora alınmadan önce 10 dakika da bir değiştirilmek üzere 3 kez 1X TBS-Tween içerisinde çalkalayıcıda muamele edilir. Daha sonra 1:3000 olarak hazırlanmış olan ikincil antikor ile 1 gün boyunca +4°C de muamele edilir. Görüntüleme işlemi için hazırlanan membran 10 dakikada bir değiştirilmek üzere 3 kez 1XTBS-Tween ile 1 kez de 1XTBS ile muamele edilir. Kemilüminesans A ve B çözeltileri hazırlanarak karanlıkta membran ile 3 dakika kadar muamele edilir. Ardından membran Bio-Rad ChemiDoc™ görüntüleme sistemine yerleştirilerek sonuçlar elde edilir.

3.2.15. Floresan Boyama

3.2.15.1. Propidyum İyodür (PI) Boyama

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B bronşiyal epitel hücreleri 6 kuyucuklu petriye 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılır ve 1 gün boyunca hücrelerin yapışması için 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. Daha sonra belirlenen dozlarda ilaçlama işlemi gerçekleştirilerek 24 saat boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. 1xPBS ile yıkanan hücreler üzerine 1ml 1xPBS ilave edilerek her bir kuyucuğa 2 µg/ml PI (ana stok: 50mg/ml) uygulanarak 15 dakika boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildikten sonra floresans mikroskobu ve ışık mikroskobunda görüntüleri alınarak ölü hücreler belirlenir.

3.2.15.2. 3,3-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür (DIOC₆) Boyama

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B bronşiyal epitel hücreleri 6 kuyucuklu petriye 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılır ve 1 gün boyunca hücreler yapışması için 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. Daha sonra belirlenen dozlarda ilaçlama işlemi gerçekleştirilerek 24 saat boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. 1xPBS ile yıkanan hücreler üzerine 1ml 1xPBS ilave edilerek her bir

kuyucuğa 400 nm DIOC₆ uygulanarak 15 dakika boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. Sağlıklı mitokondri membranını boyayarak canlı hücreler belirlenir. Sağlıklı mitokondri membranına sahip hücrelerin floresans mikroskopunda eksitasyonu 488 nm, emisyon 525 nm 'de yeşil olarak görüntülenir.

3.2.15.3. 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B bronşiyal epitel hücreleri 6 kuyucuklu petriye 5x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılır ve 1 gün boyunca hücreler yapışması için 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. Daha sonra belirlenen dozlarda ilaçlama işlemi gerçekleştirilerek 24 saat boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. 1xPBS ile yıkanan hücreler üzerine 1ml 1xPBS ilave edilerek her bir kuyucuğa 5 mg/ml DAPI uygulanarak 10 dakika boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. DNA 'ya bağlanan boyanın floresans mikroskopunda eksitasyonu 350 nm, emisyon 420 nm 'de mavi olarak görüntülenir.

3.2.15.4. MitoTracker Boyama

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B bronşiyal epitel hücreleri mitokondri zar potansiyeline bağlı canlılığı belirlemek amacıyla mitotracker (100 nM) boyaması yapılmıştır. Hücreye nüfuz eden mitokondri problemleri canlı hücrelere girdiğinde mitokondriyumdaki tiyol gruplarına bağlanarak mitokondri içerisinde tutulur. 6 kuyucuklu petriye 5x10⁴ hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılır ve 1 gün boyunca hücreler yapışması için 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. Daha sonra belirlenen dozlarda ilaçlama işlemi gerçekleştirilerek 24 saat boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. 1xPBS ile yıkanan hücreler üzerine 1ml 1xPBS ilave edilerek her bir kuyucuğa 0,8 µg/ml MitoTracker Red (ana stok: 10 mM) uygulanarak 30 dakika boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildikten sonra floresans mikroskobu ve ışık mikroskopunda görüntüleri alınır.

3.2.15.5. Akridin Turuncusu (AO) Boyama

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B bronşiyal epitel hücreleri 6 kuyucuklu petriye 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılır ve 1 gün boyunca hücreler yapışması için 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. Daha sonra belirlenen dozlarda ilaçlama işlemi gerçekleştirilerek 24 saat boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. 1xPBS ile yıkanan hücreler üzerine 1ml 1xPBS ilave edilerek her bir kuyucuğa 2 mg/ml Akridine Turuncusu uygulanarak 10 dakika boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilerek floresans mikroskobunda çekime alınır.

3.2.15.6. BODIPY Boyama

A549 akciğer kanseri ve BEAS-2B bronşiyal epitel hücreleri 6 kuyucuklu petriye 5×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapılır ve 1 gün boyunca hücreler yapışması için 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. Daha sonra belirlenen dozlarda ilaçlama işlemi gerçekleştirilerek 24 saat boyunca 37 °C lik %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilir. Medya uzaklaştırılarak 500µl %4 paraformaldehit ilave edilerek 30 dakika etüvde inkübe edilir. Daha sonra %4 paraformaldehit uzaklaştırılarak 1ml 1xPBS ilave edilir ve 1mg/ml BODIPY boyası ilave edilerek 30 dakika etüvde inkübe edilir. Üzerine 5 mg/ml DAPI boyası ilave edilerek 10 dakika daha etüvde inkübe edildikten sonra BODIPY ve DAPI için ayrı floresans mikroskobunda görüntüler alınarak iki görüntü merge edilir.

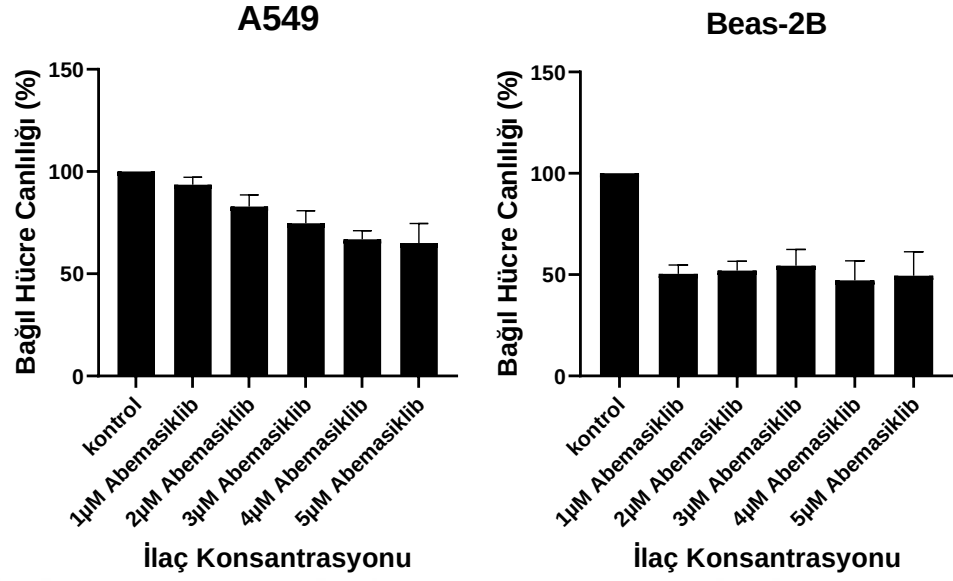
3.2.16. İstatistiksel Analizler

MTT hücre canlılığı testi ve hücre sağkalımı analizi ile ilişkili veriler GraphPad Prism 6 yazılımı (La Jolla California USA, www.graphpad.com) ile grafik halinde düzenlenerek iki yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Akış sitometrisi ile PI boyama sonuçlarının analizi BD Accuri C6 Plus (RRID:SCR_014422) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. İmmüno blotlama sonuçlarıyla alakalı kantitatif veriler Image J yazılımı kullanılarak elde edilmiş ve her kondüsyondaki veriler kontrol grubuna oranlanarak verilmiştir.

4 SONUÇLAR

4.1 ABEMASİKLİB UYGULAMASI A549 KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI VE BEAS-2B NORMAL BRONŞİYAL EPİTEL HÜCRE HATTI ÜZERİNDE HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Abemasiklib uygulamasının hücre canlılığı üzerindeki etkisinin gösterilmesi amacıyla küçük hücreli olmayan akciğer kanseri A549 ve normal bronşiyal epitel hücresi Beas-2b üzerinde doza bağlı olarak MTT testi gerçekleştirilmiştir. Akciğer kanseri A549 hücre hattı üzerinde uygulanan abemasiklib artan doza bağlı olarak hücre canlılığını azaltıcı yönde etki etmiştir. Aynı zamanda normal bronşiyal epitel hücresi olan Beas-2B hücre hattı üzerinde de artan doz da uygulanan abemasiklib hücre canlılığını azaltıcı yönde etki etmiştir. Akciğer kanseri hücre hattı olan A549 üzerinde 5 μ M abemasiklib uygulaması % 65 hücre canlılığı gösterirken, bronşiyal epitel hücresi olan Beas-2B hücre hattı üzerinde 1 μ M abemasiklib uygulaması %50 hücre canlılığı göstermektedir. Hücre canlılığının belirlenmesi aşamasında %50 canlılık hedeflenmektedir. Kanserli hücrelerin hedeflemesine bağlı olarak organizmadaki sağlıklı hücrelerin ve doku homeostazının korunması üzerine belirtilen düzeyde canlılık hedeflenmektedir. Beas-2B hücre hattı üzerinde 1 μ M abemasiklib uygulaması hücre canlılığını oldukça yüksek düzeyde etkilerken A549 hücre hattı üzerinde 1 μ M abemasiklib uygulaması %93 hücre canlılığı sergilemektedir. Ayrıca Beas-2B hücre hattı üzerinde 3 μ M abemasiklib uygulaması %54 hücre canlılığı gösterirken, A549 hücre hattı üzerinde 3 μ M abemasiklib uygulaması %74 hücre canlılığı göstermektedir. Test sonucunda en uygun doz aralığı olarak 1 μ M ve 3 μ M ilaç dozları belirlenmiştir (Şekil 20).

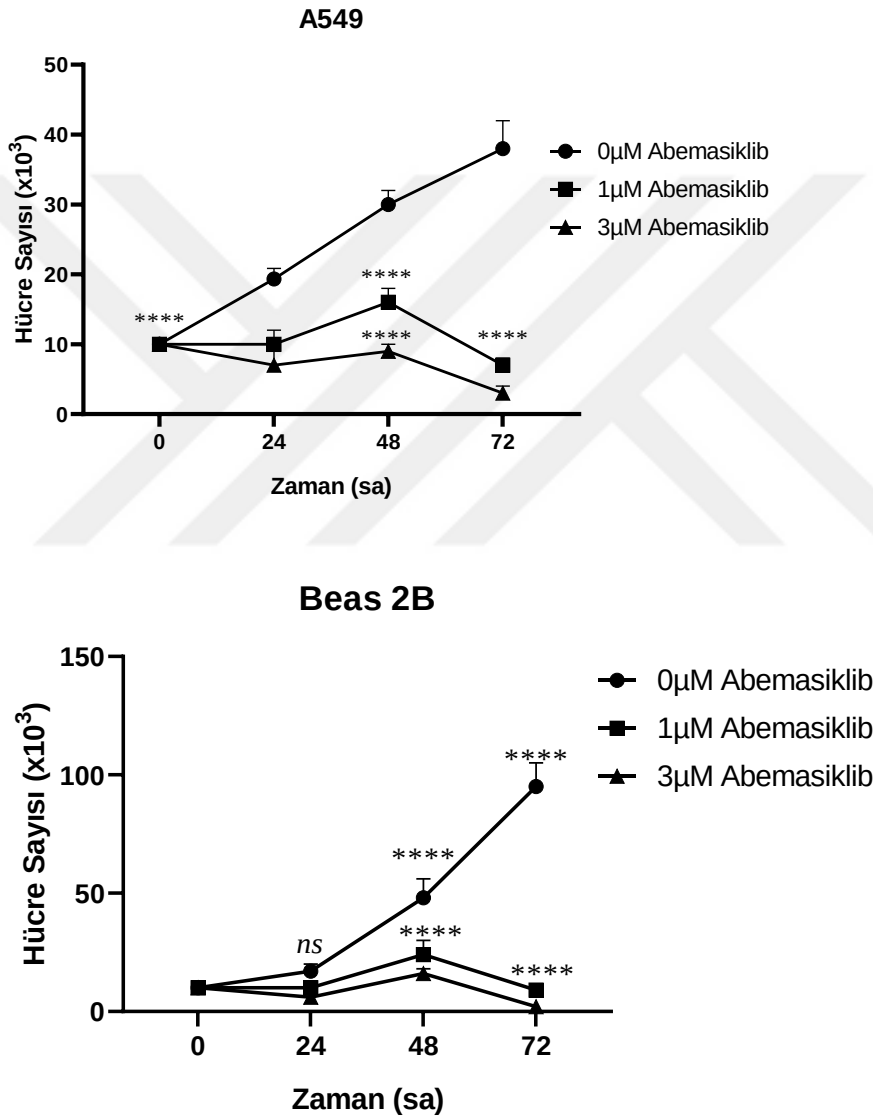


Şekil 20. A549 ve Beas-2B hücre hatlarında abemasiklib uygulamasının bağıl hücre canlılığı üzerindeki doza bağlı etkilerinin MTT yöntemi ile gösterilmesi (****P<0,0001; ***P=0,0008)

4.2 ABEMASİKLİB UYGULAMASI A549 KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTI VE BEAS-2B NORMAL BRONŞİYAL EPİTEL HÜCRE HATTI ÜZERİNDE ZAMANA BAĞLI HÜCRE SAĞKALIMI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Abemasiklib uygulamasının küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ve normal bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B üzerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre sağkalım analizi gerçekleştirilmiştir. MTT testi ile belirlenen dozlarda ilaç uygulaması sonucu hücrelerin ilaca maruz kalması ile 24, 48 ve 72 saatlik maruziyet durumlarında hücresel düzeyde ilacın etkinliği ve sağ kalım düzeylerinin belirlenmesi hedeflenerek tripan mavisini ile hücreler boyanarak ışık mikroskopunda aracılığıyla sayılarak kontrol grubuyla kıyaslama sonrası canlılık üzerinde zamana bağlı değişim gösterilmiştir. Buna bağlı olarak artan dozlarda abemasiklib uygulaması hücre canlılığı üzerinde zamana bağlı olarak etkinlik gösterirken, artan dozlarda daha etkin rol oynadığı söylenilmektedir. A549 akciğer kanseri hücre hattında ilk 24 saatte yüksek dozda hücre proliferasyonunu durdurucu

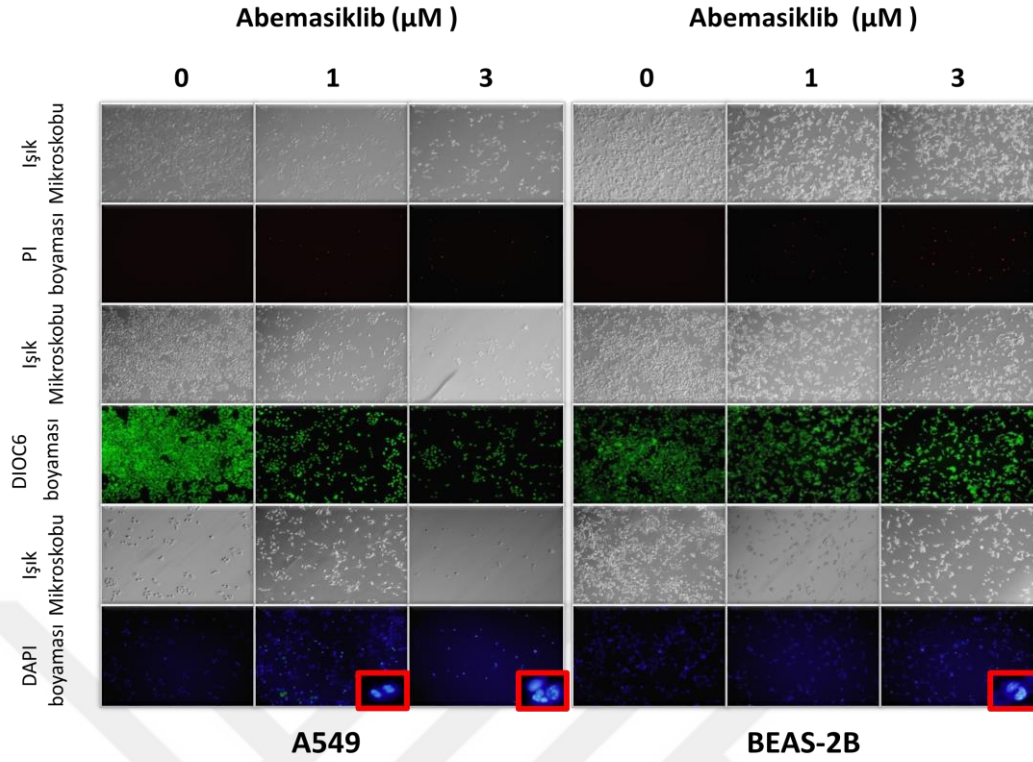
yöne ek olarak canlılığı azaltıcı yönde etki etmektedir. Ancak 48 saatte hücre proliferasyonu artış gösterirken kontrole kıyasla hücre sayısında azalma görülmektedir. 72 saatte ise hücre canlılığı azalmaktadır. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında da 24 saatte proliferasyon engellenir ve doza bağlı olarak canlılığı azaltıcı yönde etki ederken 48 'inci saatte hücre proliferasyonunda bir miktar artış görülür. Ancak 72'inci saatte hücre canlılığı azaltıcı yönde etki etmektedir. Ayrıca hücre sağkalımı üzerinde ki etki de doza bağlı bir şekilde artmaktadır (Şekil 21).



Şekil 21. A549 ve Beas-2B hücre hatlarında abemasiklib uygulamasının hücre sağkalımı üzerinde zamana bağlı etkinliğinin gösterilmesi (****P<0,0001; ns)

4.3 ABEMASİKLİB UYGULAMASI A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE FLORESAN BOYALAR ARACILIĞIYLA CANLI VE ÖLÜ HÜCRE OLUŞUMLARININ BELİRLENMESİ

A549 akciğer kanseri hücre hattı ve Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattı üzerinde abemasiklib uygulaması doza bağlı olarak hücre ölümü üzerinde etkinlik göstermektedir. Buna bağlı olarak canlı ve ölü hücrelerin gösterilmesi amacıyla floresan boyalar kullanılarak gösterilmeye çalışılmıştır. Propidyum iyodür canlı hücre zarından geçiş yapamaz ancak ölü hücrelerin morfolojik yapılarının değişmesi ile hücre zarından geçişi sağlanır. Propidyum iyodür aracılığıyla nükleik asitlerin boyanması gerçekleştirilerek ölü hücrelerin mikroskop altında kırmızı belirteçler halinde görülmesi sağlanmıştır. A549 akciğer kanseri hücre hattı ve Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattı üzerinde doza bağlı olarak artan kırmızı belirteçler floresan mikroskobunda net bir şekilde gösterilmektedir. Kanser hücre hattında 3µM abemasiklib uygulanması sonucu oluşan ölü hücreler 1 µM abemasiklib uygulanması sonucu oluşan ölü hücre belirteçlerine göre oldukça fazladır. Aynı durum bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B için de görülmektedir. Aynı zamanda genetik materyalin işaretlenmesinde kullanılan DAPI boyası ile de açık mavi renkte DNA kırıkları gösterilmektedir. A549 hücre hattı üzerinde doza bağlı olarak artan kırıklar mevcutken Beas-2B hücre hattında ise oluşan kırıklar yüksek dozda tespit edilmiştir. DAPI boyama ile işaretlenen DNA kırıkları kırmızı çerçeve içerisinde gösterilmektedir. Ölü hücrelerin floresan altında gösterilmesi dışında canlı hücrelerin gösterilmesi amacıyla mitokondri membran potansiyeli bozulmamış hücrelerin boyanması ile hücre canlılığının mitokondri organeli üzerinden gösterilmesi amacıyla DIOC₆ floresan boyası kullanılmıştır. A549 akciğer kanseri hücre hattı ve bronşiyal epitel hücre hattı Beas-2B üzerine uygulanan abemasiklib hücre canlılığını engelleyici yönde etki ettiğini göstermek amacıyla uygulanan DIOC₆ floresan boyama ile ilaç dozuna bağlı olarak her iki hücre hattında da hücre canlılığı azalmış ve canlı hücreler yeşil floresan renk ile işaretlenmiştir (Şekil 22).

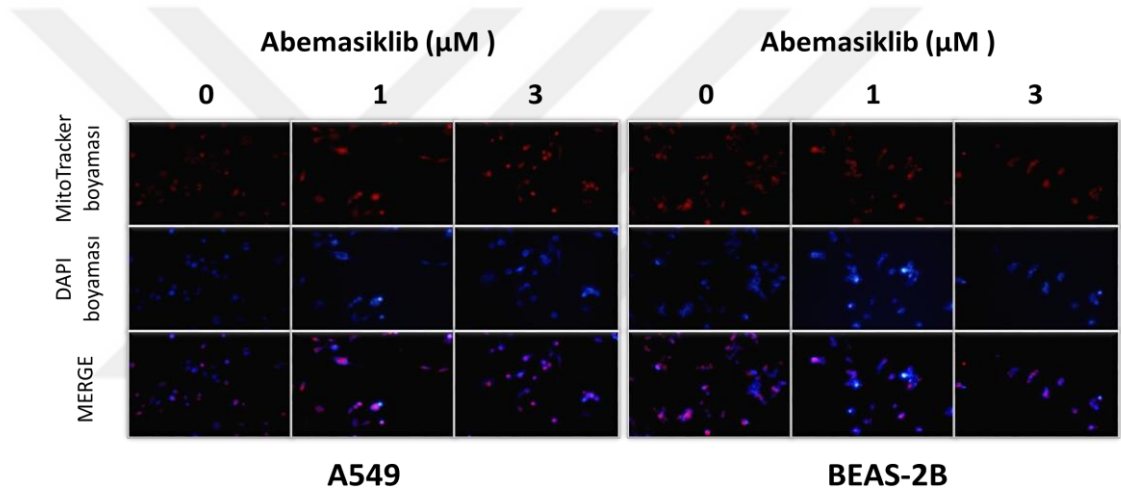


Şekil 22. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının hücre ölümü üzerinde etkisinin PI, DIOC₆ ve DAPI floresan boyaları ile gösterilmesi

4.4 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE MİTOKONDRIYAL MEMBRAN POTANSİYELLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ve bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B morfolojik yapılarını kazandıktan sonra üzerine abemasiklib uygulanması sonucu mitokondriyal membran potansiyeli üzerine ilacın etkinliğinin gösterilmesi amacıyla mitoTracker boyama gerçekleştirildi. Hücre zarını geçebilen ve mitokondriyi işaretleme kullanılan boya aktif mitokondri de birikmektedir. Mitokondriyal bozunmayı analiz etmek için kullanılan bu yöntem ile floresan yoğunluğunda ilaçla beraber azalma gözlemlenmektedir. Doza bağlı olarak her iki hücre hattında da kontrole kıyasla oluşan kırmızı floresan işaretlemeler abemasiklib etkinliği ile hücre canlılığındaki azalmaya bağlı olarak floresan işaretlemelerin miktarlarındaki azalma tespit edilmiştir. Aynı zamanda DNA kırıklarının tespit edilmesinde kullanılan floresan boyalar arasında yer alan DAPI ile açık mavi işaretlemeler halinde işaretleme yaparsak mitokondriyal bozulmanın yanında oluşan DNA kırıkları da

görülmektedir. Artan ilaç dozuna bağlı olarak DNA kırıkları oluşumu kontrole kıyasla DAPI boyama ile gösterilmiştir. Her iki hücre hattında da kontrole kıyasla artan ilaç dozlarına bağlı olarak mitoTracker boyaması ile kırmızı lekelerin yoğunluğundaki azalmanın görülmesiyle birlikte DAPI boyama ile de azalan kırmızı işaretlemelerin yanında DNA kırıkları da gösterilmiş olup merge ile üst üste getirilen iki floresan görüntüleri ile her iki boyanın ilacın dozuna ve etkinliğine bağlı olarak görüntüsü sunulmuştur (Şekil 23). Böylece akciğer kanseri hücre hattı olan A549 1 μM abemasiklib uygulaması hücre canlılığını azalttığı ve bu etkinin 3 μM abemasiklib uygulamasının ise kontrol hücrelere kıyasla daha fazla hücre canlılığına ket vurduğu tespit edilmiştir.

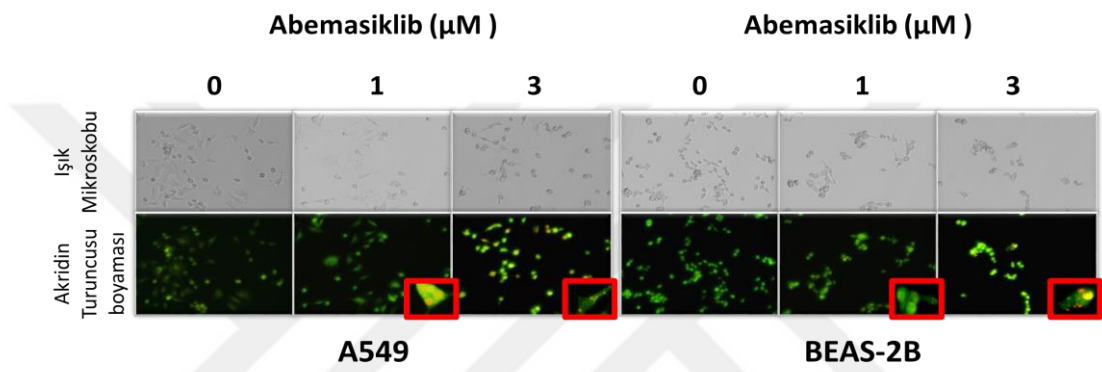


Şekil 23. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının MitoTracker ve DAPI floresan boyaları ile gösterilmesi

4.5 ABEMASİKLİB UYGULAMASI İLE A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE AKRIDİN TURUNCUSU FLORESAN BOYAMA İLE GÖSTERİLEREK OTOFAJİK VAKUOL OLUŞUMLARININ İNCELENMESİ

A549 akciğer kanseri ve Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattı üzerine uygulanan abemasiklib 'in otofajik süreçteki rolünü ve etkinliğini göstermek amacıyla floresan mikroskobu aracılığıyla akridin turuncusu boyama gerçekleştirilmiştir. Akridin turuncusu DNA ve RNA tespitinde kullanılmakta olup ayrıca etkin haldeki makrofajların tespitinde de kullanılmaktadır. Akridin turuncusu sitoplazmik içeriği

yeşil floresans şeklinde gösterirken asidik vezikülleri turuncu floresans olarak işaret etmektedir. 1 μM abemasiklib uygulaması ile A549 hücre hattında oluşan asidik veziküller görülmektedir. İlaç dozuna bağlı olarak 3 μM abemasiklib uygulamasında oluşan asidik veziküllerde otofajik süreci ifade etmektedir. Aynı zamanda artan ilaç dozuna bağlı olarak kontrole kıyasla oluşan asidik veziküller de artış görülmektedir. Beas-2B hücre hattında 1 μM abemasiklib uygulanması sonucu kontrole kıyasla asidik vezikül oluşumunun doza bağlı olarak 3 μM abemasiklib uygulaması sonucuna kıyasla yüksek dozda asidik veziküllere rastlanmıştır (Şekil 24).

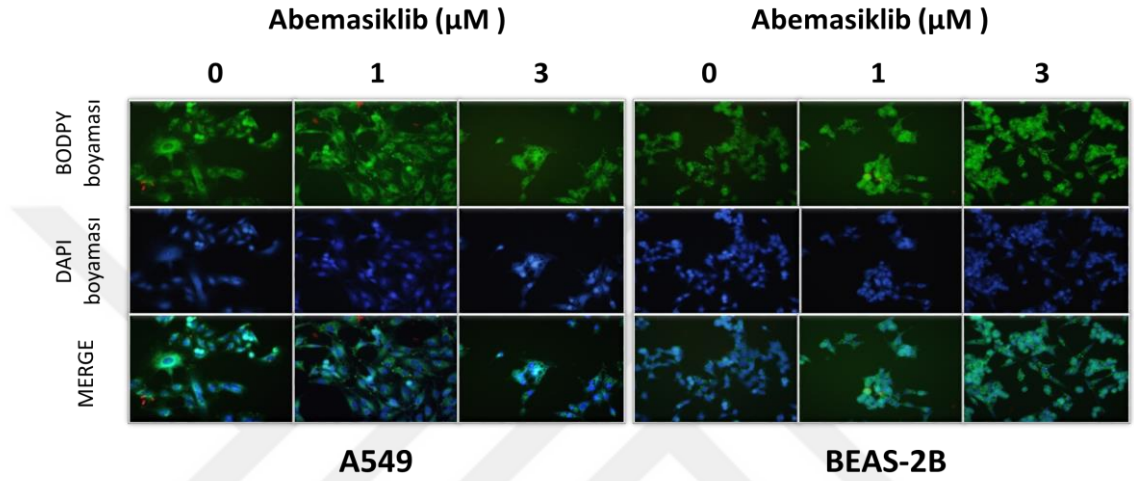


Şekil 24. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının akridin turuncusu floresan boyası ile gösterilmesi

4.6 BODPY BOYAMASI İLE ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE LİPİD DAMLACIKLARINA ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

BODPY boya hücrelerdeki hücre altı lipidleri ve yağ asitlerini irdelemek için kullanılmaktadır. A549 akciğer kanseri hücre hattı ve Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattı üzerine uygulanan abemasiklib hücre canlılığı üzerinde negatif düzenleyici olarak rol oynamaktadır. Buna bağlı olarak bodpy boyama ile yağ asitlerini ve nötr lipidlerin dağılımlarını ve hareketliliğini göstermek amacıyla kullanılmaktadır. A549 hücre hattında kontrol grubunda bodpy floresan boyama ile lipid damlacıkları gösterilmiştir. Doza bağlı olarak artan miktarda kullanılan abemasiklib ile hücre canlılığı üzerine etkisi sonucu yüksek dozda lipid damlacık oluşumunun kontrole kıyasla azaldığı görülmekte iken 1 μM ilaç dozunda ise artan lipid damlacıkları görülmektedir. Beas-2B hücre hattında ise durum tam tersi olarak seyretmektedir.

Kontrole kıyasla yüksek dozda abemasiklib kullanımında lipid damlacık oluşumu artarken 1 μ M abemasiklib kullanımında kontrole kıyasla lipid damlacık oluşumu azalmaktadır. Aynı zamanda uygulanan DAPI floresan boyama ile nükleus işaretlenmiş ve aynı zamanda açık mavi olarak görülen DNA kırıkları ifade edilmiştir. Merge ile iki floresan görüntü üst üste getirilerek BODPY ve DAPI floresan boyamalarının hücre üzerinde birlikte gösterilmiştir (Şekil 25).

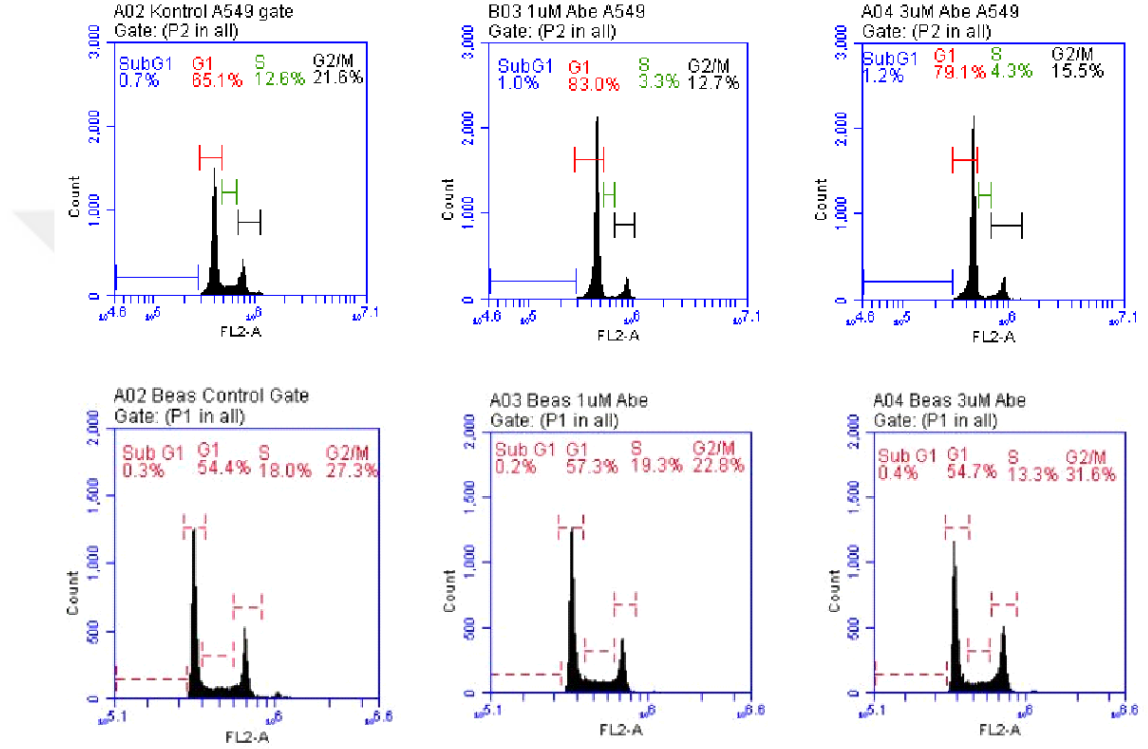


Şekil 25. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının bodpy ve DAPI floresan boyaları ile gösterilmesi

4.7 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Abemasiklib hücre döngüsünün G1 aşamasında RB fosforilasyonunu engelleyerek G1-S geçişinin blokajını sağlamaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen hücre akış sitometrisi ile PI boyama analizi ile kullanılan ilacın hücre döngüsü sırasında hangi faz üzerinde blokaja neden olduğunu göstermek hedeflenmiştir. A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerine abemasiklib uygulaması hücre döngüsünün G1 aşamasında blokaja neden olmuştur. Kontrol grubunda G1 aşamasında %65.1 oranında hücre tespiti söz konusuysen, 1 μ M abemasiklib uygulaması sonucu bu oran %83'e çıkmaktadır. Aynı zamanda 3 μ M abemasiklib uygulaması sonucu da bu oran %79.1'i göstermektedir. Kanser hücre hattı üzerinde uygulanan abemasiklib

doza bağı olarak G1 aşaması blokaj da efektif rol oynamaktadır. Beas-2B normal bronşiyal epitel hücre hattında ise kontrol grubunda G1 aşamasında %54.4 oranında hücre tespiti söz konusuken 1 μ M abemasiklib uygulaması sonucu bu oran %57.3, 3 μ M abemasiklib uygulaması sonucu ise %54.7'yi göstermektedir. Abemasiklib uygulaması bronşiyal epitel hücrelerinde hücre döngünün G1 aşamasında tutulumunu sağlamamaktadır (Şekil 26).



Şekil 26. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının hücre döngüsü üzerinde etkisinin PI boyama yöntemi ile akış sitometrisinde gösterilmesi

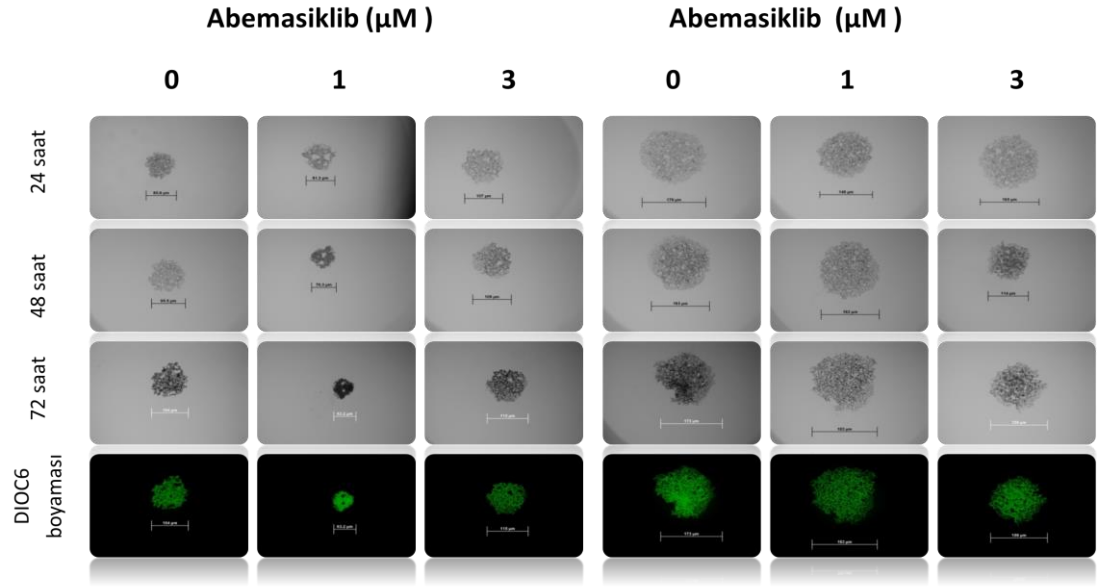
4.8 A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ABEMASİKLİB UYGULAMASININ 3D SFEROİD HÜCRE MODELİ İLE GÖSTERİLMESİ

Geleneksel olarak oluşturulan 2D hücre modellerine kıyasla günümüzde 3 boyutlu sferoid modellerinin oluşturulması yaygın olmaktadır. Buna bağlı olarak tercih edilen 3D sferoid modeli ile hücre canlılığına bağlı koloni oluşumunun gösterilmesi hedeflenmiştir. Tercih edilen ilaç dozlarına bağlı olarak artan dozlarda hücre canlılığının azalması sonucu koloni oluşturma potansiyellerinin düşmesi ve oluşan 3

boyutlu sferoid modellerin de koloni çaplarının güne bağlı olarak değişimi söz konudur.

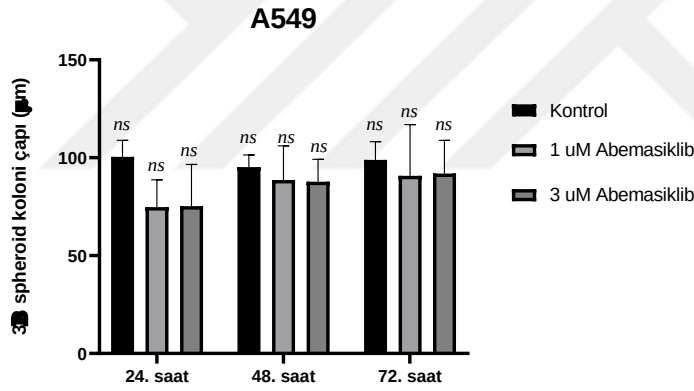
Akciğer kanseri hücre hattı olan A549 üzerinde zamana bağlı olarak kontrol gruplarında 3 boyutlu sferoid yapısında koloni çapında 24 saatte 85.8μm, 48 saatte 95.5μm; 72 saatte 104μm olarak bir artış söz konuyken, 1 μM abemasiklib uygulaması sonucu koloni çaplarında 24 saatte 81.3μm, 48 saatte 70.3μm, 72 saatte 63.2μm azalma görülmektedir. 3 μM abemasiklib uygulaması ile 24. saate 107μm, 48 saatte 109μm ve 72 saatte 115μm tespit edilmiştir. 3 μM abemasiklib uygulaması ile 24. saate bağlı olarak koloni çapında bariz bir sonuç görülmezken yinede 72. saatte yüksek dozda da efektif bir sonuç elde edilmiştir. Akciğer kanseri hücresinde ki sonuçların yanı sıra bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B hücrelerinde kontrol gruplarının 24 saatte 179μm, 48 saatte 163μm ve 72 saatte 173μm olarak tespit edilmiştir. Böylece zamana bağlı olarak koloni oluşturma potansiyellerinde çapa bağlı bir artış söz konuyken, 1 μM abemasiklib uygulaması sonucu 24 saatte 148μm, 48 saatte 163μm, 72 saatte 183μm 3 boyutlu sferoid yapısının morfolojisini koruduğu ve zamana bağlı olarak ilaç dozunun etkisinin minimum düzeyde seyrettiği görülmektedir. 3 μM abemasiklib uygulaması ile 24. saate 165μm, 48 saatte 114μm ve 72 saatte 159μm tespit edilmiştir. 3 μM abemasiklib uygulamasının 48. saatte koloni çapında klme söz konusuyken 72. saatte koloni çapında bariz bir artış söz konusu olmaktadır.

Oluşan 3D sferoid hücre modellerinde 72. saatte DIOC₆ boyama ile oluşan iki hücre hattında da 3 boyutlu yapının daha net irdelenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca her iki hücre hattında da tekrar sayısına bağlı olarak koloni çaplarındaki değişim GraphPad uygulaması ile grafiğe dökülerek gösterilmiştir (şekil 27).

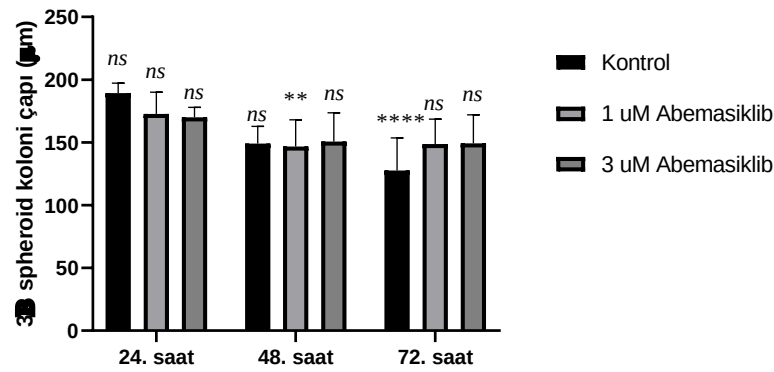


A549

BEAS-2B



Beas-2B



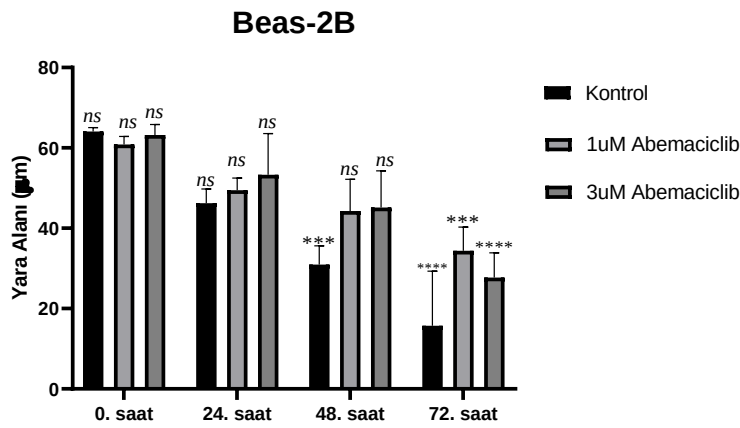
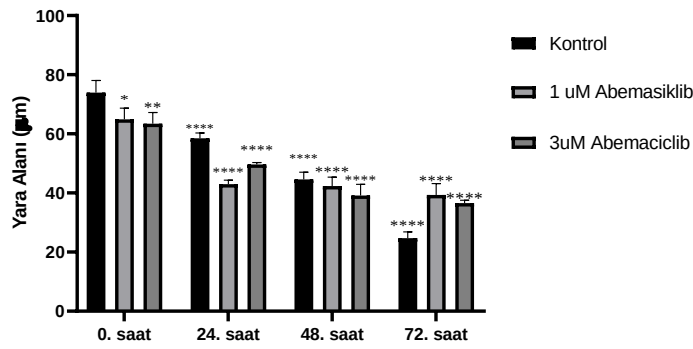
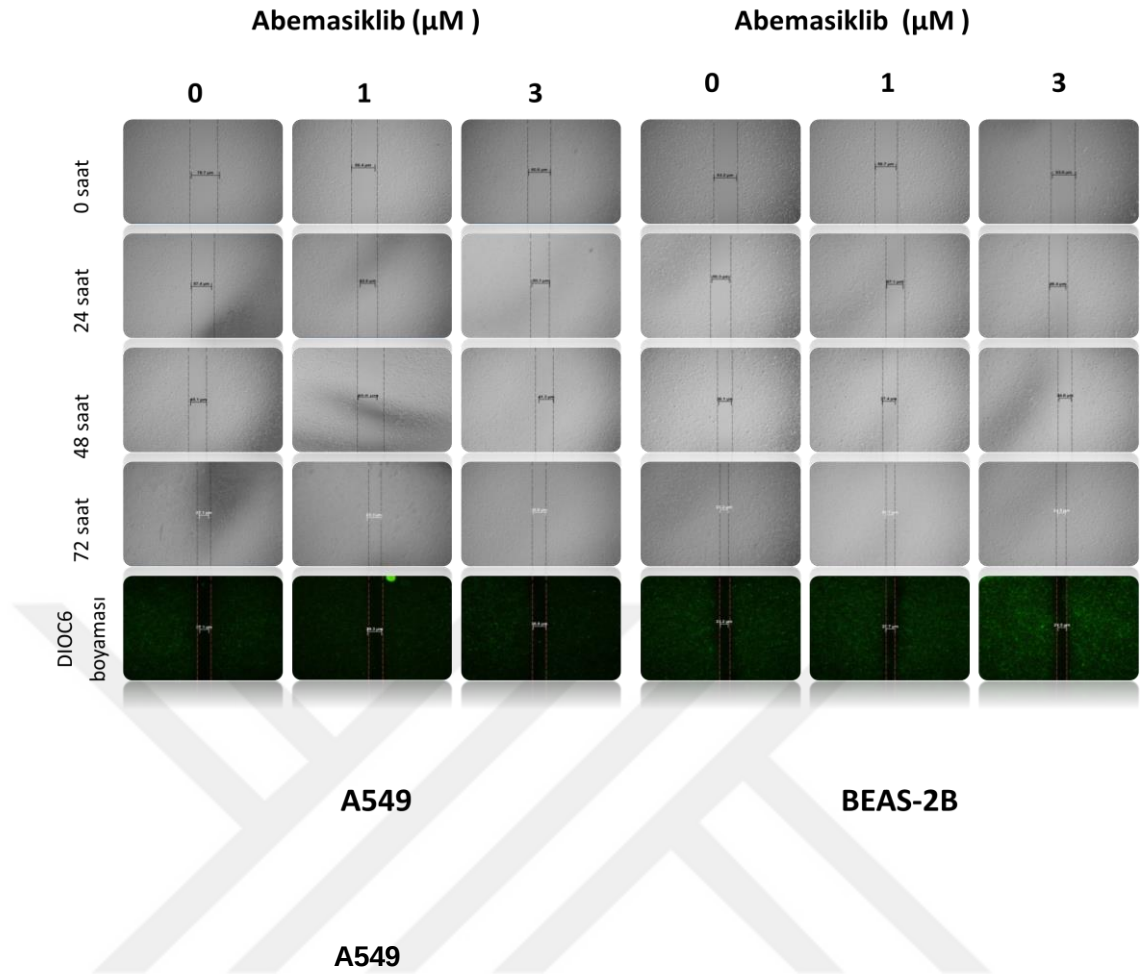
Şekil 27. A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde abemasiklib uygulamasının 3D sferoid yapısı ile koloni oluşum potansiyellerinin gösterilmesi (**** $P < 0,0001$; ** $P = 0,0081$; ns)

4.9 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE ETKİSİNİN YARA İYİLEŞME YÖNTEMİYLE GÖSTERİLMESİ

Akciğer kanseri ve bronşiyal epitel hücre hatlarına abemasiklib uygulaması ile lateral hücre hareketi üzerine etkilerini irdelemek üzere yara iyileşme analizi uygulanmıştır. Ayrı ayrı değerlendirilecek olursa A549 akciğer kanseri hücre hattında 0. saatte açılan yarığın kapanma yönünde hareket ettiği görülmektedir. 1 μ M abemasiklib uygulaması sonucu 0. saatte oluşan yarığın zamana bağlı bir şekilde ilacın etki mekanizması gereği kontrol grubuna kıyasla daha yavaş bir kapanma söz konusu olmaktadır (42,6 μ m ****p<0,0001). Ayrıca 48. saatte oluşan yarığın çapındaki genişlemede bariz olarak görülmektedir (40,6 μ m ****p<0,0001). Yüksek dozda uygulanan abemasiklib ile oluşan yarığın kapanma hızında minimum bir azalış söz konudur.

Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattı üzerindeki lateral hareket sonucu yara iyileşme analizindeki etkisi değerlendirilecek olursa kontrol grubunda zamana bağlı olarak oluşan yaraların kapanma yönünde hareket ettiği görülmektedir. 1 μ M abemasiklib uygulaması sonucu epitel hücrelerinde etki görülmemekte ve yarığın düzeyi kontrol grubu oranında kapanma yönünde ilerlemektedir (36,8 μ m ***p =0,0009). Yine aynı şekilde 3 μ M abemasiklib uygulamasında da benzer sonuçlar söz konusu olmaktadır (34,8 μ m ****p<0,0001). Epitel hücrelerinde lateral hareket ile hücrelerin yarıkları kapanma yönündeki ilerleyişi ilacın etki mekanizmasının epitel hücre hatlarında kanser hücre hattına bağlı olarak efektif rol sergilediğini göstermektedir. Akciğer kanseri hücre hattındaki ilacın efektif rolü çarpıcı bir şekilde görülmektedir.

Oluşan yarığa bağlı olarak hücre hareket sonucu kapanma oranları ve hücre yapısını daha net ifade edebilmek için 72. saatte DIOC₆ uygulaması gerçekleştirilerek mikroskopik düzeyde görüntü elde edilmiştir. Aynı zamanda gerçekleştirilen tekrara bağlı olarak GraphPad analiz programı aracılığıyla istatistiksel veri analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 28).

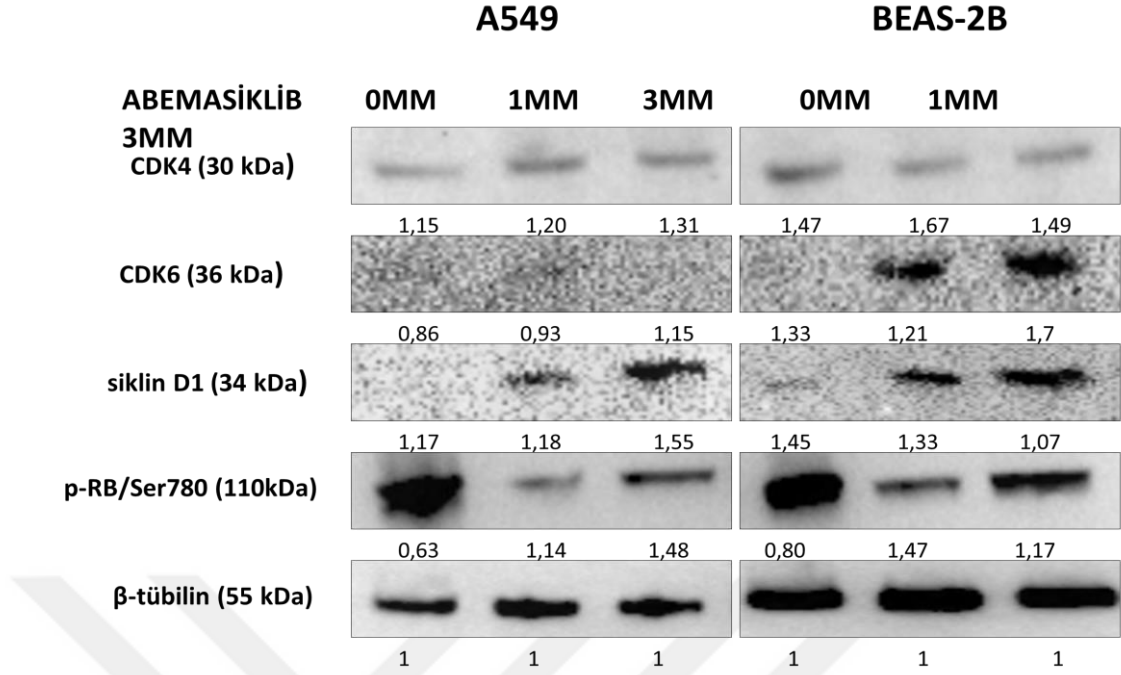


Şekil 28. A549 ve Beas-2B hücre hatları üzerine abemasiklib uygulamasının yara iyileşme üzerine etkisinin gösterilmesi (****P<0,0001; ***P=0,0009; ***P=0,0002; **P=0,0068; *P=0,0297; ns)

4.10 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİSİNİN İMMÜNOBLOTLAMA İLE GÖSTERİLMESİ

Akciğer kanseri ve bronşiyal epitel hücre hattı üzerinde abemasiklibin rolünü irdelemek amacıyla immünoablota ile etki mekanizmasına bağlı olarak çeşitli protein düzeylerinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Bilindiği üzere abemasiklib hücre siklusunun G1 aşamasında CDK4 ve CDK6 üzerinde blokaja bağlı olarak RB nin fosforilasyonunu etkilemektedir.

CDK4 protein seviyesi A549 akciğer kanseri hücre hattında 1 µM abemasiklib uygulaması ile artarken 3 µM ilaç uygulaması ile protein seviyesi kontrole kıyasla artsada 1 µM abemasiklibe göre protein seviyesinde daha az artış görülmektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında ise CDK4 protein ifadesinin seviyesinde spesifik bir değişiklik söz konusu değildir. CDK6 protein ifadesi A549 hücre hattında 1 µM abemasiklib uygulamasında artış gösterirken, doza bağlı olarak 3 µM abemasiklib uygulamasında protein anlatımında bir farklılık görülmemektedir. Beas-2B hücre hattında ise CDK6 protein seviyesinde artış doza bağlı bir şekilde spesifik olarak ifade edilmektedir. Siklin D1 protein düzeyleri değerlendirilecek olursa A549 akciğer kanseri hücre hattında ilaç dozuna bağlı olarak anlatımda artış görülmektedir. Beas-2B hücre hattında da artan ilaç dozuna bağlı olarak protein seviyesinde artış görülmektedir. p-RB proteini hücre siklusunun ilerlemesinde kritik bir proteindir. Buna bağlı olarak protein düzeyi irdelemek istenmiştir. Proliferasyona bağlı olarak hücre siklusunda etkin rol oynayan retinablastoma proteininin fosforilasyon düzeyinde ilaç dozuna bağlı olarak anlatımında azalma görülmektedir. Her iki hücre hattında da 1 µM abemasiklib de efektif rol oynamaktadır. Yükleme kontrolü olarak β-tübilin kullanılmıştır (Şekil 29).

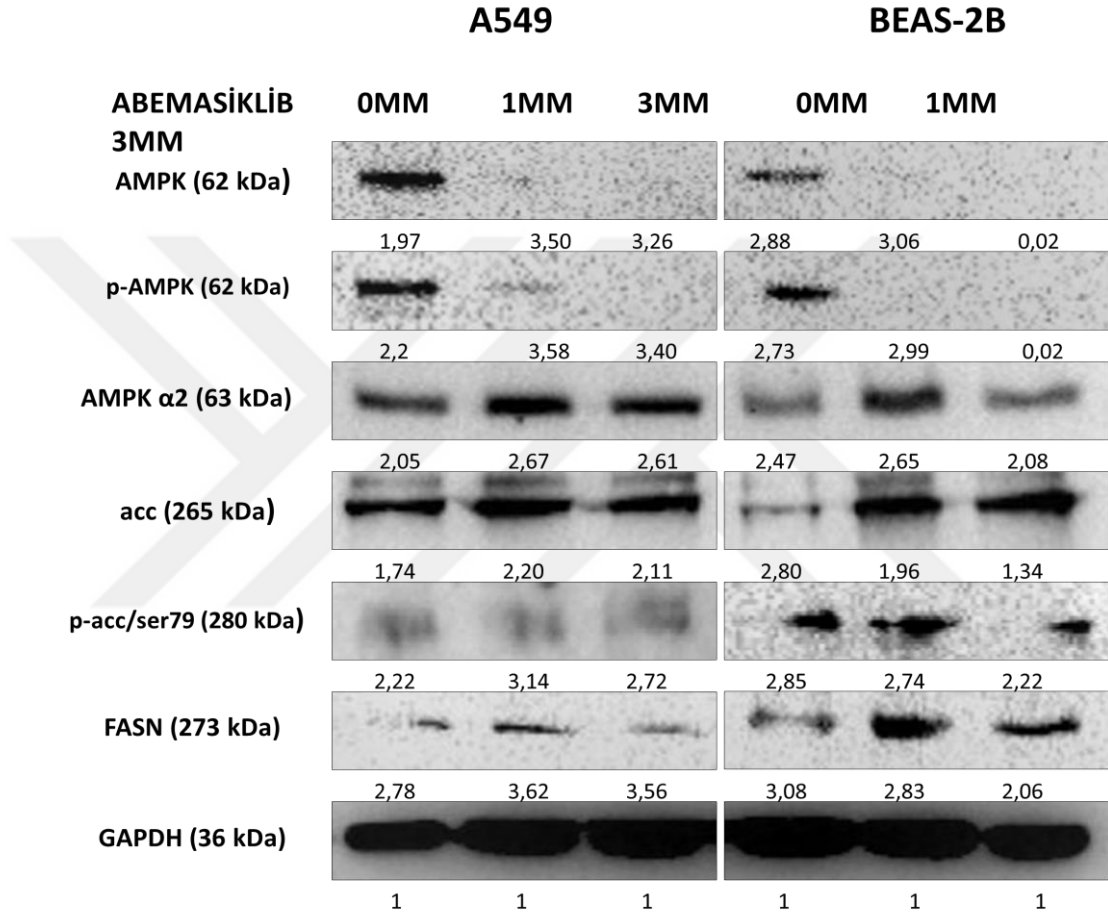


Şekil 29. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları üzerine etkisinin immünoblotlama aracılığıyla gösterilmesi

4.11 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA ENERJİ METABOLİZMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Abemasiklib'in enerji metabolizması üzerindeki efektif rolünün irdelenmesi için akciğer kanseri hücre hattı ve bronşiyal epitel hücre hattı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Enerji stresinin anahtar rolü olarak görev alan AMPK proteininin seviyesini belirlemek amacıyla immünoblotlama gerçekleştirilmiştir. A549 ve Beas-2B hücre hattında doza bağlı olarak AMPK protein anlatımı azalmaktadır. p-AMPK protein anlatımı aynı oranda doza bağlı olarak azalmaktadır. AMPK $\alpha 2$ protein seviyesi değerlendirilecek olursa A549 akciğer kanseri hücre hattında 1 μ M abemasiklib uygulaması ile protein seviyesi artış gösterirken 3 μ M abemasiklib uygulamasında protein anlatımında artış gösterse de düşük doz kadar efektif rol oynamamaktadır. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında 1 μ M abemasiklib uygulaması ile protein seviyesi artış gösterirken 3 μ M abemasiklib uygulamasında ki protein seviyesi artışı düşük doza oranla minimum derecede kalmaktadır. Asetil CoA karboksilaz ve p-Asetil CoA karboksilaz protein seviyeleri değerlendirildiğinde

protein anlatımında ilaç ile beraber artış göstermekte olduğu tespit edilmiştir. Ancak en efektif artış 1 μ M abemasiklib uygulamasında görülmektedir. FASN proteinini irdelendiğinde ise protein seviyesi artış göstermekte ve en etkin artışı da 1 μ M abemasiklib uygulamasında görülmektedir. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır (Şekil 30).

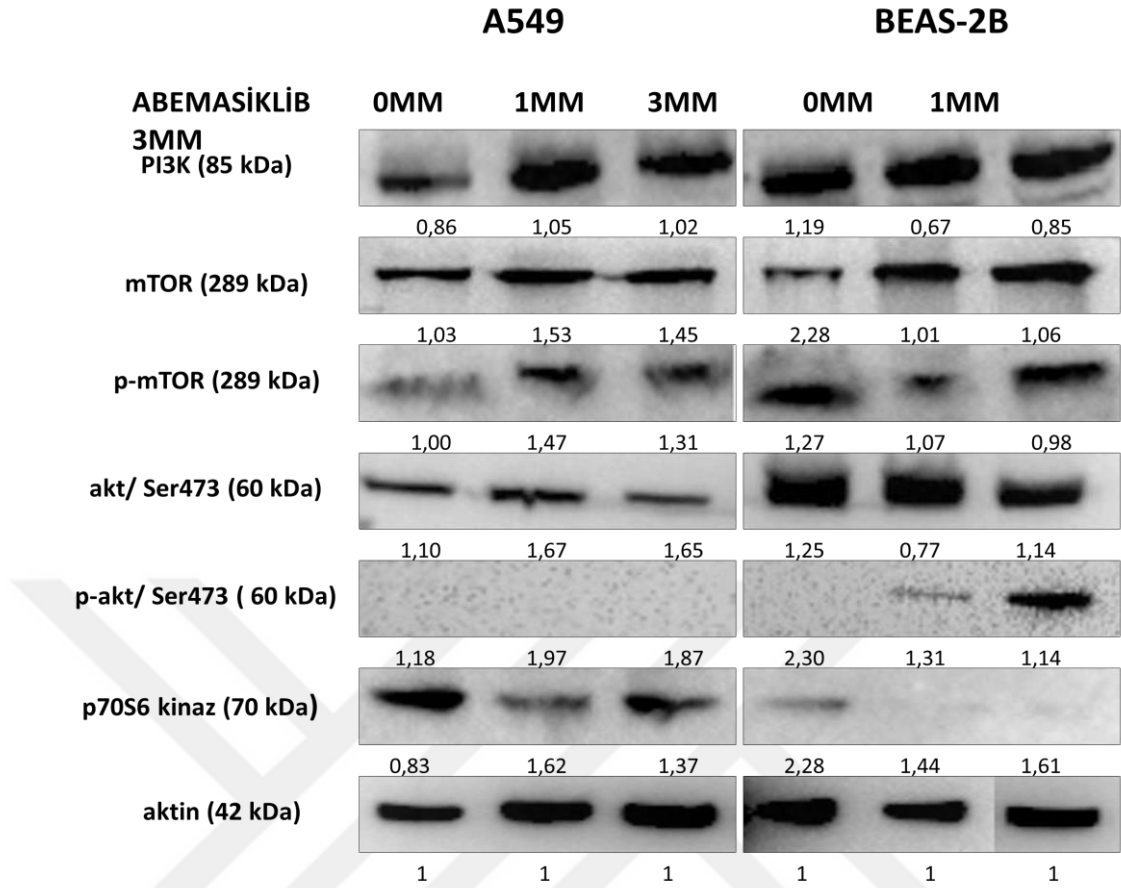


Şekil 30. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları üzerindeki enerji metabolizmasına bağlı etkisinin gösterilmesi

4.12 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA PI3K-mTOR-akt YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Hücresel metabolik işlevde kritik bir rol oynayan PI3K-mTOR-Akt yolağı ve enerji metabolizmasına ile olan ilişkisini irdellemek amacıyla immünoblotlama analizi

gerçekleştirilmiştir. Bu anlamda yolakta kritik rol oynayan proteinler üzerinde durulmuştur. Akciğer kanseri hücre hattı olan A549'un PI3K protein seviyesi en etkin olarak 1 μ M abemasiklib uygulaması ile artmakta Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında da en etkin artış düşük doz terapötik ajan kullanımında gerçekleşmektedir. AMPK sinyal yolağı ile ilişkisi bilinen mTOR sinyal yolağı, A549 hücre hattında düşük dozda terapötik ajan kullanımıyla protein seviyesinde artış gösterirken, Beas-2B hücre hattında bir artış görülmektedir. p-mTOR protein düzeyi irdelendiğinde ise akciğer kanseri hücre hattı olan A549 protein ifadesi doza bağlı bir şekilde artış gösterirken, A549 için efektif özellik gösteren 1 μ M abemasiklib uygulamasıyla Beas-2B bronşiyal epitel hücresinin protein seviyesinde azalma görülmektedir. Yolağın diğer majör elemanı olan Akt proteininin seviyesi değerlendirildiğinde A549 hücre hattında 3 μ M abemasiklib uygulaması ile anlatım düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Aynı durum Beas-2B hücre hattı içinde görülmektedir. p-akt protein düzeyi irdelendiğinde ise A549 hücre hattı için protein anlatım profili belirlenmemişken, Beas-2B hücre hattında doza bağlı bir artış görülmektedir. PI3K-mTOR-Akt sinyal yolağının diğer bir kritik proteini olan p70S6 kinaz seviyesi değerlendirildiğinde 1 μ M abemasiklib uygulamasının her iki hücre hattında protein seviyesinde belirgin bir azalma görülmektedir. Yükleme kontrolü olarak aktin kullanılmıştır (Şekil 31).

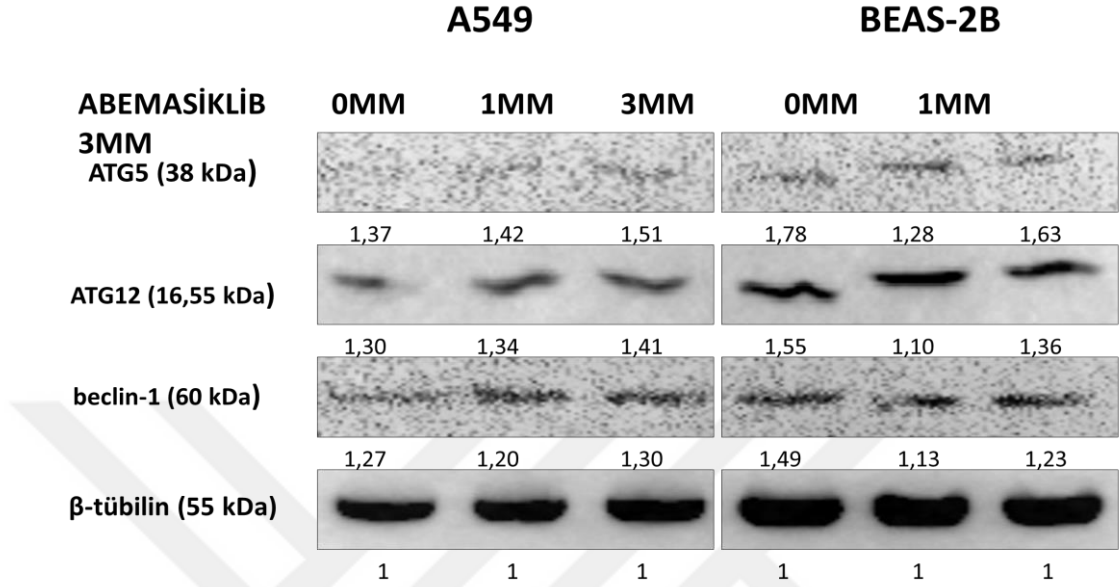


Şekil 31. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları ile PI3K yolu üzerine etkisinin gösterilmesi

4.13 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA OTOFAJİ YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Akciğer kanseri ve bronşiyal epitel hücre hattı üzerinde abemasiklib uygulamasının terapötik etkinliğinin irdelenmesi amacıyla otofajik süreçteki rolü anlaşılmak üzere immünoiblottlama analizi gerçekleştirilmektedir. Bu kapsamda otofajik yolak da önemli olan kritik proteinlerin seviyeleri incelenmiştir. A549 akciğer kanseri hücre hattında ATG5 protein seviyesinde ilaç dozuna bağlı anlatımında artış görülmektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında belirgin bir artış görülmemektedir. ATG12 protein seviyesi A549 akciğer kanseri hücre hattında doza bağlı olarak protein anlatımında bir artış gösterirken, Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında kayda değer bir farklılık görülmemektedir. Otofajik sürecin diğer bir elemanı olan beclin-1, A549 akciğer kanseri hücre hattında doza bağlı olarak belirgin bir artış gösterirken Beas-

2B bronşiyal epitel hücre hattında kayda değer bir farklılık tespit edilememiştir. Bu aşamada yükleme kontrolü olarak β -tubulin proteini kullanılmıştır (Şekil 32).

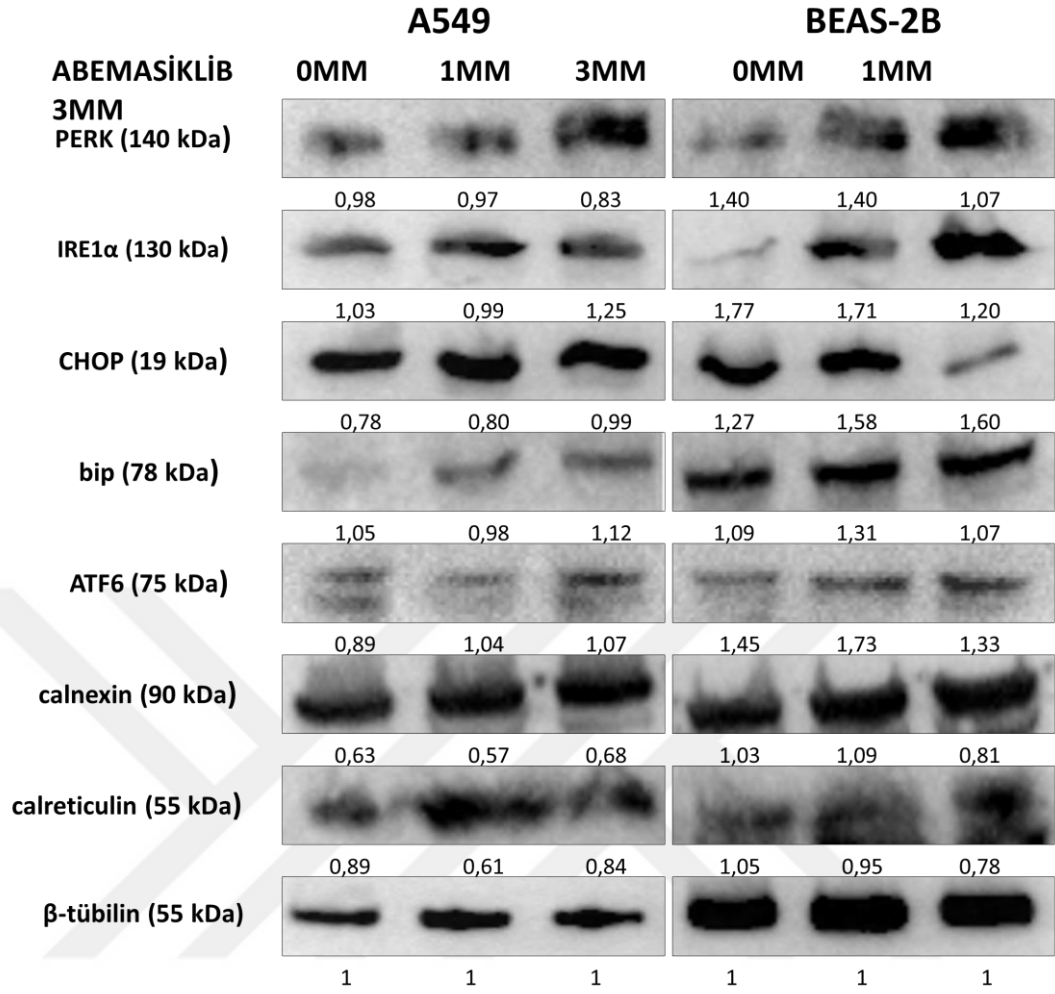


Şekil 32. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları ile PI3K yolu üzerine etkisinin gösterilmesi

4.14 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Akciğer kanseri ve akciğer bronşiyal epitel hücre hatlarına terapötik ajan olarak uygulanan abemasiklibin hücre hatları üzerindeki endoplazmik retikulum stres rolünün incelenmesi üzerine immünoblotlama analizi gerçekleştirilmiştir. Endoplazmik retikulum stres rolünde majör proteinler incelenmiştir. A549 akciğer kanseri hücre hattında PERK protein seviyesinde doza bağlı olarak artış görülmektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında PERK protein seviyesi aynı şekilde doza bağlı olarak artmaktadır. A549 akciğer kanseri hücre hattında IRE1 α protein anlatımında 1 μ M abemasiklib terapötik ajan kullanımıyla artış göstermektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında doza bağlı olarak bir artış görülmektedir. CHOP protein seviyesi incelendiğinde A549 akciğer kanseri hücre hattında doza bağlı olarak protein ifadesinde artış görülürken Beas-2B bronşiyal

epitel hücre hattında doza bağı olarak azalma ifade edilmektedir. Bip sinyali ise her iki hücre hattında artış gösterirken, ATF6 proteini A549 akciğer kanseri hücre hattında 1 μ M abemasiklib ajanı uygulamasında protein seviyesinde bir miktar azalma görülürken 3 μ M abemasiklib uygulaması ile protein seviyesinde artış görülmektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında ise doza bağı olarak protein seviyesinde artış görülmektedir. Endoplazmik retikulum stres proteinleri arasında yer alan diğ er bir protein olarak calnexin A549 akciğer kanseri hücre hattında doza bağı olarak artış göstermekte Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında da protein seviyesinde doza bağı artış görülmektedir. Calreticulin protein seviyesi her iki hücre hattında doza bağı olarak artış göstermektedir. Bu aşamada yükleme kontrolü olarak hücresel homeostazda seviyesi değışmeyen β -tubulin proteini kullanılmıştır (şekil 33).

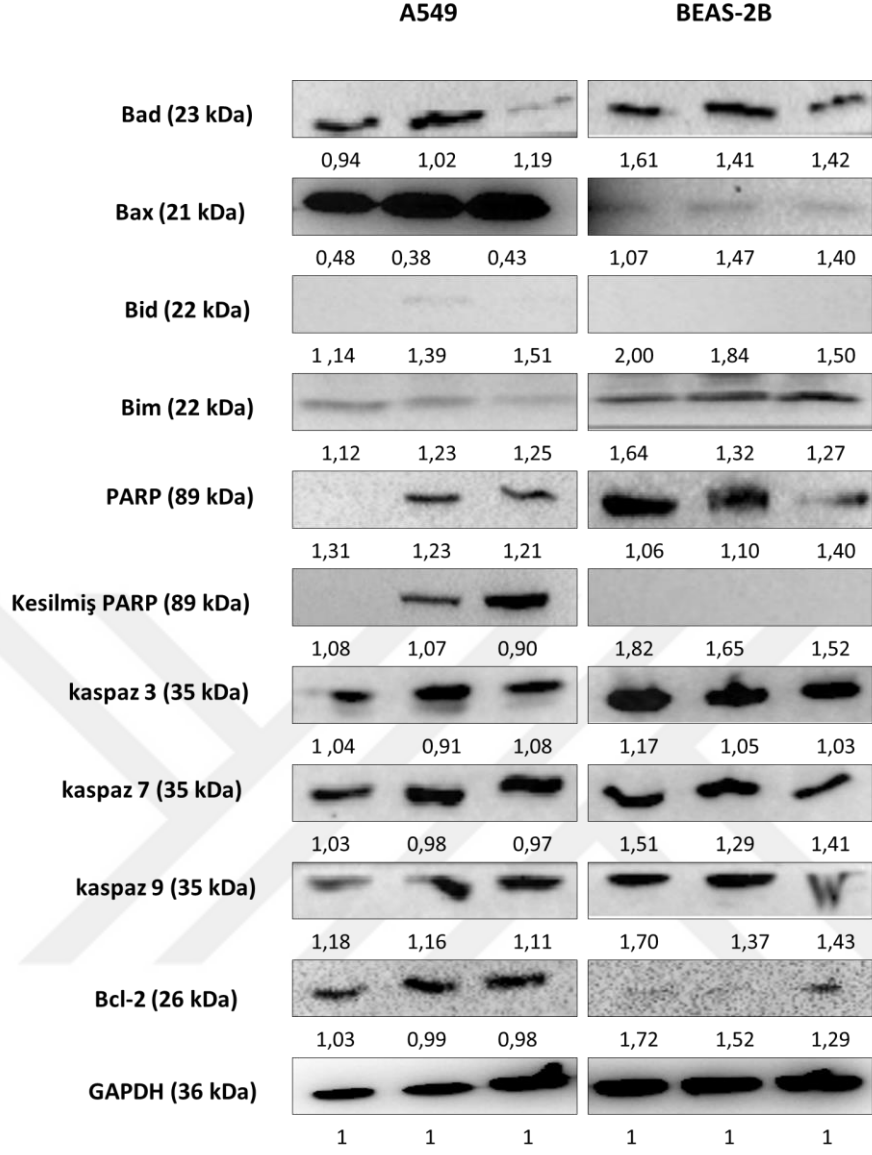


Şekil 33. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatları ile Endoplazmik Retikulum Stresi üzerine etkisinin gösterilmesi

4.15 ABEMASİKLİB UYGULAMASININ A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

Hücre sel yolakta kritik rol oynayan hücre sel ölüm yolağı olarak adlandırılan apoptoz, terapötik ajan kullanımı sonucu akciğer kanseri hücre hattında ve bronşiyal epitel hücre hattında efektif rolünün incelenmesi için immünoblotlama analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda içsel ve dışsal apoptoz yolağında yer alan önemli proteinler üzerine odaklanılmıştır. A549 akciğer kanseri hücre hattında bad protein seviyesi 1 µM abemasiklib uygulamasıyla artış gösterirken, 3 µM abemasiklib uygulamasıyla belirgin bir azalma göstermektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında 1 µM abemasiklib uygulamasıyla artış gösterirken, 3 µM abemasiklib

uygulamasıyla spesifik bir azalış göstermektedir. Bax protein seviyesi A549 akciğer kanseri hücre hattında doza bağlı olarak artış gösterirken, Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında belirgin bir farklılık görülmemektedir. Bid protein seviyesi A549 akciğer kanseri hücre hattında 1 μ M abemasiklib uygulamasıyla bir miktar artış gösterirken, 3 μ M abemasiklib uygulamasında kontrol grubuna kıyasla belirgin bir farklılık göstermemektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında belirgin bir farklılık görülmemektedir. Bim protein seviyesi A549 akciğer kanseri hücre hattında doza bağlı olarak bir miktar azalış sergilerken belirgin bir sonuç göstermemektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında ise 3 μ M abemasiklib kullanımında bir artış görülmektedir. PARP protein seviyesi A549 akciğer kanseri hücre hattında kontrol grubunda anlatım görülmezken doza bağlı olarak artış gösterdiği ifade edilmektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında ise doza bağlı olarak protein seviyesinde belirgin bir azalma göstermektedir. Kesilmiş PARP proteininin seviyesi incelendiğinde ise Beas-2B hücre hattında belirgin bir değişiklik görülmezken, A549 akciğer kanseri hücre hattında kontrol grubunda anlatım görülmezken doza bağlı olarak artış göstermektedir. A549 akciğer kanseri hücre hattında kaspaz 3, kaspaz 7 ve kaspaz 9 proteinlerinin seviyesinde doza bağlı olarak artış görülmektedir. Kritik olarak en önemli artışın ise 1 μ M abemasiklib terapötik ajanında sergilediği görülmektedir. Beas-2B hücre hattında ise kaspaz 3, 7, 9 proteinlerinin seviyesinde belirgin bir değişiklik görülmektedir. Anti-apoptotik süreçte etkin rol oynayan bcl-2 proteininin seviye A549 akciğer kanseri hücre hattında doza bağlı olarak bir miktar artış sergilemektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında ise kontrol grubunda anlatımı bulunmazken 3 μ M abemasiklib terapötik ajanının etkisiyle artış göstermektedir. Bu aşamada yükleme kontrolü olarak hücrel homeostazda seviyesi değişmeyen GAPDH proteinleri tercih edilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. Abemasiklib uygulamasının A549 ve Beas-2B hücre hatlarının apoptoz üzerine etkisinin gösterilmesi

5 TARTIŞMA

Tez araştırması kapsamında incelenen akciğer kanseri dünya genelinde kansere dayalı ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır [4]. Aynı zamanda akciğer kanseri dünya genelinde de oldukça sık görülmektedir. Bu sıklıkta görülmesinin başlıca nedenleri arasında akciğer kanserinin geç teşhisi yer almaktadır [5]. Belirti ve farklılaşmış bir doku tespiti dışında teşhis edilebilir bir yöntem henüz mevcut değildir. Buna bağlı olarak hastalarda ileriki evrelerde tespit edilip tedavi uygulanmaya çalışmasından ötürü de oldukça etkili ve çoklu mekanizmaları etkileyebilen terapötik ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Akciğer kanserinin gelişim ve ilerlemesinde pek çok faktör yer almaktadır. Bu faktörler arasında yer alan en büyük etkenler arasında da tütün ve tütün ürünlerinin kullanımı yer alır. Akciğer kanserinin görülmesi, ilerlemesi ve tekrarlaması üzerine yapılan pek çok çalışmada sigara kullanımının etkisi görülmektedir. Bunun yanı sıra da zehirli gazlara maruz kalma, kimyasal maddeler, genetik faktörler gibi pek çok etkende mevcut olmaktadır [8,9]. Kadın ve erkekler arasında dünya genelinde görülme sıklığı arasında da farklı sonuçlar yer almaktadır. Özellikle erkek hastalarda görülme sıklığı ilk sıralarda yer alırken kadınlar arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Erkek ve kadın hastalar arasındaki bu yoğunluk farkının tütün ve tütün ürünlerinin erkekler arasındaki kullanımının sıklık ve yoğunluğuna bağlı olarak nitelendirilmiştir [7]. Günümüze kadar ki süreç zarfında yapılan pek çok çalışma akciğer kanserine ışık tutmak amacıyla ve tedaviye bir adım daha yaklaşmak için gerçekleştirilmektedir. Ancak sonuçlar neticesinde akciğer kanserinde pek çok yan etkiye ve kanser hücrelerinin tedaviye karşı direnç kazanması ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle akciğer kanseri üzerine daha çok çalışma yapılması gerekmekte ve farklı terapötik etkinliğe sahip yeni ilaç kullanımı sağlanmalıdır.

Akciğer kanseri gelişim ve ilerlemesi sırasında en etkili yol olarak hücresel proliferasyon görülmektedir. Buna bağlı olarak hücre döngüsü üzerinde bir etki gerçekleştirilerek akciğer kanserinin ilerlemesinin engellenmesi hedeflenmektedir. Hücre döngüsü kontrol mekanizmaları ele alındığında döngünün ilk aşamasında proliferasyonu engellemenin etkinlik açısından daha doğru olacağı düşünülmüştür. CDK 4/6 inhibitörlerinin bu aşamada ki rolleri ele alındığında hücre döngüsünün G1

aşamasından S fazına geçişi engelledikleri bilinmektedir [38]. Bilinen ve efektif olarak kullanılan CDK 4/6 inhibitörleri EMA ve FDA onayı alarak aromataz inhibitörleri (anastrozol/letrozol) veya fulvestrant ile kombinasyon tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmışlardır [36]. CDK 4/6 inhibitörleri olan palbociclib, abemasiklib ve ribosiklib benzer farmakokinetik ve farmakodinamik profiller sergilemekle beraber aynı etki mekanizmalarına sahiplerdir. Eli Lilly and Company Research Laboratories bilim insanları tarafından biyokimyasal tarama yoluyla tanımlanmış olan abemasiklib pek çok kanser türünde etkin rol oynamaktadır. Ayrıca abemasiklib FDA tarafından 28 Eylül 2017 tarihinde endokrin tedaviyi takiben hastalık ilerlemesi ve metastatik ortamda HR-pozitif, HER2-negatif ilerlemiş veya metastatik meme kanseri olan yetişkin hastaların tedavisi için monoterapi olarak onaylanmıştır [49]. CDK4 ve CDK6'nın ATP-bağlama alanının yarışıl bir inhibitörü olarak hareket eden abemasiklibin antineoplastik aktivitesi mevcuttur [41]. Abemasiklibin meme kanseri, melanoma, kolorektal, glioblastoma, kan kanseri ve akciğer kanseri gibi kanser türleri arasında ki etkinliği *in vitro* ve *in vivo* deneyler sonucu gösterilmiştir [46]. Ayrıca tümör ksenograft modelleri üzerinde de doza bağlı antitümör aktivitesi gösterdiği bilinmektedir. Abemasiklib kan-beyin bariyerini de spesifik olarak geçebilme kabiliyeti gösterirken metastatik lezyonlar üzerinde de merkezi sinir sistemini etkileyen antitümör aktivitesi mevcuttur [42,47].

Gerçekleştirilen tez çalışmaları sonucuna göre abemasiklibin akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ve normal bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B hücre hattının üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Bu kapsamda MTT deneyi gerçekleştirilerek *in vitro* koşullar altında abemasiklibin hücre canlılığı üzerindeki etki mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. İşlevsel olarak mitokondrinin tetrazolium tuzlarının redüksiyonu sonucu mitokondrideki dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla mor renkli formazan kristallerinin oluşturulmasıyla gerçekleştirilen renk değişimi kolorimetrik yöntem aracılığıyla absorbansa bağlı olarak hücre canlılığının değerlendirilmesi hedeflenmektedir. Oluşan formazan miktarı ile canlı hücre sayısı belirlenir. Buna bağlı olarak gerçekleştirilen MTT testi için doz belirleme işleminde düşük dozda efektif rol oynadığı bilinen abemasiklib için uygun doz belirleme de 1-5 μM aralığı seçilmiştir [126]. Literatür araştırmaları ışığında SW1736 ve C643 hücre hatlarında abemasiklib doz aralığı 1, 2.5, 5 μM doz aralığı belirlenmiştir [127]. Aynı zamanda

MiaPaCa 2, Panc-1 ve HS 766T hücre hatlarında da düşük dozda abemasiklib kullanımında efektif bir rol sergilediği görülmektedir [128]. Yapılan çalışmaların sonrasında ilerleyen aşamalarda yüksek organizmalarda efektif rolü irdelenecek olan ilacın sağlıklı hücreleri üzerindeki rolü de değerlendirileceği için %50 canlılık oranı uygun görülmektedir. Yapılan *in vivo* deneylerde de buna dikkat edildiği ve abemasiklibin düşük dozlardaki efektif rolü görülmektedir [129]. Buna bağlı olarak akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ve bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B için en efektif rol 1 μ M ve 3 μ M abemasiklib uygulaması olarak belirlenmiştir (Şekil 20). MTT testi sonrası belirlenen dozlarda zamana bağlı olarak hücre sağkalımı analizi gerçekleştirilerek *in vitro* koşullar altında hücre hatlarındaki maruziyetin zamana bağlı etkinliği araştırılmıştır. Literatür araştırmalarında çeşitli kanser türleri yanı sıra baş boyun skuamöz hücreli karsinomda da bizim gerçekleştirmiş olduğumuz analiz ile eşdeğer sonuçlar sunduğu görülmektedir [130]. MTT testine bağlı olarak hücre sağkalım analizinde de doza bağlı olarak hücre canlılığındaki azalma görülmektedir. Buda iki deney sonucunun birbirini desteklediğini göstermektedir. Hücre sağ kalımının A549 hücre hattında abemasiklibin zamana bağlı olarak kontrole kıyasla farklı dozlardaki etkinliği kanser hücrelerindeki hücre döngüsünü engelleyerek proliferasyonun önlenmesi ve çeşitli ölüm yollarını hedefleyebileceği düşündürmektedir (Şekil 21).

Canlılık üzerine diğer sitotoksik etkinin gösterilmesi amacıyla floresans boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Canlı hücre membranlarından geçişi sağlanamayan promidium iyodür aracılığıyla ölü hücrelerin morfolojik yapılarındaki değişiklik sonucu membrandan geçişi sağlanır ve floresans mikroskopunda nükleik asitlerin işaretlenmesi ile kırmızı noktalar halinde görüntülenmesi sağlanır [131]. Daha önce yapılan araştırmalarda propidyum iyodür ölü hücrelerin gösterilmesinde kullanıldığı ifade edilmiştir [132,133]. A549 hücre hattında kontrol grubunda sağlıklı hücrelerin varlığı ve ilaç dozuna bağlı olarak ölü hücre sayılarında artış görülmekte ve bu sonuçlar daha önce gerçekleştirilen MTT ve hücre sağkalım analizi ile eşdeğer sonuçlar sunmaktadır. Buda bize abemasiklibin hücre döngüsünü üzerindeki etkinliğine bağlı olarak ölüm yollarına yönlendirmekte ve araştırmaların kapsamının daha derinlemesine yapılmasını sağlamaktadır. Beas-2B hücre hattında da propidium iyodür aracılığıyla ölü hücrelerin gösterilmesi hedeflenmiştir. Burada

da doza bağılı olarak kırmızı floresans noktalarda artış görülmekte ancak A549 hücre hattına göre daha yoğun kırmızı floresans nokta görülmesi kontrol gruplarındaki hücresel yoğunlukla ilişkilendirilmektedir. Hücresel düzeyde ölüm yönünde ilerleyen mekanizmanın DNA kırıkları üzerinden gösterilmesi amacıyla DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarla DAPI boyama ile DNA kırıklarının oluşması abemasiklib sitotoksik etki mekanizmasında yer aldığını göstermektedir [134]. A549 hücre hattında her iki dozda da oluşan DNA kırıkları kanser hücresi üzerinde abemasiklib uygulamasının etkinliğini göstermektedir. Aynı zamanda da doza bağılı olarak DNA kırıklarında ki artış abemasiklib etkinliğinin kanser hücrelerinde efektif rol sergilediğini göstermektedir. Beas-2B hücre hattında da sadece yüksek dozda DNA kırıkları saptanmış buda ilacın bronşiyal epitel hücrelerinde genetik materyal aracılı etkisinin daha düşük bir seyir izlediğini ve aynı zamanda da kanser hücrelerindeki genetik materyale bağılı kırıkları tetiklediği bilgisini sunmaktadır. Aynı zamanda oluşan DNA kırıkları hücreleri apoptoza uğratarak DNA onarım mekanizmalarının etkin olmadığını göstermektedir. Ölü hücreler dışında sağlıklı hücrelerinde floresans mikroskobu altında gösterilmesi amacıyla hücre canlılığının mitokondri organeli aracılığıyla DIOC₆ boyama aracılığıyla mitokondri membran potansiyeli bozulmamış hücrelerin floresans mikroskobu altında gösterilmesi hedeflenmiştir [135]. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda farklı ilaçlarında akciğer kanseri hücre hattı olan A549 üzerinde DIOC₆ boyama ile canlı hücreler floresans aracılığıyla gösterilmiştir [136]. Yapılan deneyler ışığında A549 hücre hattında abemasiklib uygulaması doza bağılı bir şekilde hücre canlılığını azaltıcı yönde etki etmişken DIOC₆ boyama ile floresans altında canlı hücrelerin gösterilmesi hedeflenmiştir. Aynı şekilde Beas-2B hücre hattında da aynı hedef doğrultusunda DIOC₆ boyama gerçekleştirilerek sağlıklı hücrelerin varlığı gösterilmiş ve artan ilaç dozuna bağılı olarak sağlıklı hücre sayısındaki azalma da yine aynı doğrultuda ilerlemiş olduğu sergilenmiştir (Şekil 22). Burada gerçekleştirilmiş olan floresans sonuçlar sağlıklı hücrelerle birlikte ölü hücrelerin değerlendirilmesine bağılı olarak değişen korelasyonun gösterilmesi ve buna bağılı olarak ilacın etkinlik yönlerinin değerlendirilmesi hedeflemektedir.

Floresans boyalar arasında yer alan mitoTracker hücre zarını geçerek aktif mitokondride birikir ve mitokondriyi işaretlemeye kullanılır. Uygulanan boyama ile

mitokondriyal bozunma ilaç dozuna bağılı olarak azalma göstermektedir [137]. Abemasiklibin doza bağılı bir şekilde hücre canlılığı üzerindeki etkisi daha önce MTT ve hücre sağkalım analizinin yanı sıra propidium iyodür gibi floresans boyalar ile gösterilmiştir. Ayrıca mitoTracker floresans boyama ile de farklı bir açıdan gösterilmeye çalışılmıştır. Doza bağılı olarak A549 hücre hattında kontrole kıyasla azalan hücre canlılığına bağılı olarak daha düşük yoğunlukta kırmızı floresan probalar görülmektedir. Kontrol ile kıyaslandığında Beas-2B hücre hattında da floresan probalar da azalma çarpıcıdır. Hücresel düzeyde mitokondriyal bozunma gerçekleşmesi apoptoz yolağının etkin rol oynadığını göstermektedir [103]. Aynı zamanda DNA kırıklarının gösterilmesi amacıyla DAPI floresan boyama gerçekleştirilmiştir. Mitokondriyal potansiyel dışında da oluşan DNA kırıkları DNA onarımının gerçekleşmemesi sebebiyle hücresel apoptoz yolağında etkinlik sergilediği söylenebilir [103,124,125]. Ayrıca ER stres sonrasında da DNA hasarının meydana geldiği bilinmekte olup gerçekleştirilen tez çalışmasında bu süreçte ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiştir (Şekil 23) [74].

Hücresel düzeyde ilacın etki mekanizmasına bağılı olarak canlılık üzerinde ki etkisi ve buna bağılı olarak ilaca maruz kalan hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerinin gösterilmesi amacıyla 3 boyutlu sferoid hücre modeli oluşturulmuştur. Daha önce gerçekleştirilmiş olan bir çalışmada EGFR mutasyonu taşıyan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri üzerinde abemasiklibin efektif rolü 3D sferoid model ile aracılığıyla hücre sayısında azalma gösterilmiştir [138]. 3 boyutlu sferoid model ile abemasiklibin tek başına kullanımının yanı sıra pek çok farklı ilaç ile kombine kullanımı ve 3D sferoid modelde koloni oluşumun gösterilmesi zamana bağılı olarak çapında küçülme gösterilmiştir [139]. Literatür ile eşdeğer olarak gerçekleştirilmiş olan çalışmada A549 akciğer kanseri hücrelerinde zamana bağılı olarak kontrol gruplarına kıyasla 3 boyutlu sferoid yapısının oluşumunda koloni çapında azalma ölçülmüştür. En efektif doz ise 1 μ M abemasiklib olarak belirlenmiştir. İlerleyen saatler de çaptaki azalmada daha önceki yapılmış olan çalışmalarla eşdeğer olarak ilerlemektedir [138]. Akciğer kanseri hücrelerinde ki sonuçların yanı sıra bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B hücrelerinde kontrol gruplarının zamana bağılı olarak koloni oluşturma potansiyellerinde çapa bağılı bir artış söz konuyken, 1 μ M abemasiklib uygulaması sonucu 3 boyutlu sferoid yapısının morfolojisini koruduğu

ve zamana bağılı olarak ilaç dozunun etkisinin minimum düzeyde seyrettiği görülmektedir. 3 μ M abemasiklib uygulamasının 48. saatte koloni $\mathcal{C}$ apında küçölme söz konusuyken 72. saatte koloni $\mathcal{C}$ apında bariz bir artış söz konusu olmaktadır (Şekil 27). Sonuç olarak 1 μ M abemasiklibin uygulamasının etkin olarak hücre canlılığına ket vurarak, mitokondriyal membran potansiyelini düşürüp, koloni oluşumunu engellediği A549 akciğer kanseri hücrelerinde gösterilmiştir.

Yara iyileşme deneyi esas olarak Hücre göçüne bağılı olarak gerçekleşir. Hücre-hücre etkileşimini esas alarak ilacın dozuna ve süresine bağılı proliferasyon hızı ile ilişkili yöntemleri kapsamaktadır [140]. Yapılan bir çalışmada insan kolorektal kanser hücrelerinde abemasiklib monoterapi ve BYL719 ile kombine terapisi ile kolorektal kanser hücre hatları olan Caco-2 ve SNU-C4 üzerinde hücre göçü, yara iyileşme analizi ile gösterilmiş ve abemasiklibin hücre göçünü önemli ölçüde inhibe ettiği ifade edilmiştir [141]. A549 akciğer kanseri hücre hattında 0. saatte açılan yarık ile zamana bağılı olarak hücre proliferasyonuna bağılı olarak oluşan yarığın kapanma yönünde hareket ettiği görülmektedir. 1 μ M abemasiklib uygulaması sonucu 0. saatte oluşan yarığın zamana bağılı bir şekilde ilacın etki mekanizması gereği kontrol grubuna kıyasla daha yavaş bir kapanma söz konusu olmaktadır. Ayrıca 48. saatte oluşan yarık $\mathcal{C}$ apındaki genişlemede bariz olarak görülmektedir. Yüksek dozda uygulanan abemasiklib ile oluşan yarıktaki proliferasyonuna etkisi üzerine 0. saatte bağılı olarak oluşan yarığın $\mathcal{C}$ apındaki minimum bir azalış söz konudur. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattı üzerindeki lateral hareket sonucu yara iyileşme analizindeki etkisi değerlendirilecek olursa kontrol grubunda zamana bağılı olarak oluşan yaraların kapanma yönünde hareket ettiği görülmektedir. 1 μ M abemasiklib uygulaması sonucu epitel hücrelerinde etki görülmemekte ve yarık düzeyi kontrol grubu oranında kapanma yönünde ilerlemektedir. Yine aynı şekilde 3 μ M abemasiklib uygulamasında da benzer sonuçlar söz konusu olmaktadır. Epitel hücrelerinde lateral hareket ile hücrelerin yarıkları kapanma yönündeki ilerleyişi ilacın etki mekanizmasının epitel hücre hatlarında kanser hücre hattına bağılı olarak efektif rol sergilediğini göstermektedir. Akciğer kanseri hücre hattındaki ilacın efektif rolü $\mathcal{C}$ arpıcı bir şekilde görülmektedir (Şekil 28). Literatür ile eşdeğer sonuçlar görülmekte ve ilacın hücre göçünde etkin rol sergilediği akciğer kanseri hücre hatlarında da gösterilmektedir.

Hücre döngüsü, hücrelerin çoğalma sürecinin gerçekleştiği ve bu esnada kontrol mekanizmalarının yer aldığı, sonucunda da ana hücreden 2 kardeş hücrenin oluştuğu sürecin tamamını oluşturmaktadır [23]. Özellikle kanser hücrelerinde hücresel proliferasyon ortak özellik olup oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Gerek dokuda yer edinmesi gerekse metastatik özellik kazanıp farklı dokulara ulaşması sonrasında proliferasyon sürekli ve devamlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Akciğer kanserin de özellikle odaklanılan noktada abemasiklibin bir hücre döngüsü kontrol noktalarından olan CDK 4/6-siklin D1 blokajında görev aldığı bilinmekte olup sarkom hücre hatlarında hücre döngüsü blokajına sebep olarak döngünün G1 aşamasında tutulumuna neden olmaktadır [142]. Ayrıca daha önce yapılmış olan bir çalışmada da pek çok akciğer kanseri hücre hatlarının yanı sıra A549 hücre hattı içinde analiz gerçekleştirilmiş olup hücre döngüsünün G1 aşamasında tutulum görüldüğü gösterilmiştir [143]. Literatür ışığında A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerine abemasiklib uygulaması hücre döngüsünün G1 aşamasında blokaja neden olmuştur. Kontrol grubunda G1 aşamasında %65.1 oranında hücre tespiti söz konusuken 1 μ M abemasiklib uygulaması sonucu bu oran %83 e çıkmaktadır. Aynı zamanda 3 μ M abemasiklib uygulaması sonucu da bu oran %79.1 i göstermektedir. Kanser hücre hattı üzerinde uygulanan abemasiklib doza bağlı olarak G1 aşaması blokaj da efektif rol oynamaktadır. Beas-2B normal bronşiyal epitel hücre hattında ise kontrol grubunda G1 aşamasında %54.4 oranında hücre tespiti söz konusuken 1 μ M abemasiklib uygulaması sonucu bu oran %57.3, 3 μ M abemasiklib uygulaması sonucu ise %54.7 'yi göstermektedir. Akciğer kanseri hücre hattında abemasiklib daha öncede pek çok kanser türünde ifade edildiği gibi hücre döngüsünün G1 aşamasında tutulumuna neden olmuştur. Ancak bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B de hücre döngüsü üzerinde bir etki sergilenmektedir. Buda epitel hücrelerinin proliferasyonlarını devam ettirdiğini ancak canlılığın azalmasına bağlı olarak farklı bir yolağı tetiklediğini ve bunun irdelenmesi gerektiği bilgisini bize sunmaktadır (Şekil 26). Abemasiklibin etki mekanizması kapsamında hücre döngüsü üzerindeki rolünün irdelenmesi üzerine immüno blotlama analizi gerçekleştirilmiştir. Retinoblastoma fosforilasyonu ile ilerleyen hücre döngüsünün G1-S fazı geçişi kritik rol oynamaktadır. Literatür araştırmalarında Uvea melanomu hücre hatlarında abemasiklib uygulaması üzerine p-RB protein ifadesinde doza bağlı azalma görülmekte ve CDK4 siklinD1 protein seviyelerinde ise doza bağlı olarak artış olduğu gözlenmektedir [144]. Akciğer kanseri hücre hatları üzerinde daha önce

yapılan bir çalışmada p-RB protein seviyesinde doza bağılı olarak abemasiklib kullanımıyla azalma görülürken, CDK4, CDK6 ve siklin D1 protein seviyelerinde doza bağılı olarak artış görülmektedir [134]. Başka bir çalışmada da abemasiklib tedavisi, MiaPaCa 2, Panc-1 ve HS 766T hücre hatlarında p-RB protein seviyelerinde azalma görülmektedir [138]. Akciğer kanseri hücre hattı olan A549 üzerinde yapılan çalışmada CDK4 protein seviyesi 1 µM abemasiklib uygulaması ile artarken 3 µM ilaç uygulaması ile protein seviyesi kontrole kıyasla artsada 1 µM abemasiklibe göre protein seviyesinde daha az artış görülmektedir. Beas-2B bronşiyal epitel hücre hattında ise CDK4 protein ifadesinin seviyesinde belirgin bir değişiklik söz konusu değildir. CDK6 protein ifadesi A549 hücre hattında 1 µM abemasiklib uygulamasında artış gösterirken doza bağılı olarak 3 µM abemasiklib uygulamasında protein anlatımında farklılık görülmemektedir. Beas-2B hücre hattında ise CDK6 protein seviyesinde artış doza bağılı bir şekilde belirgin olarak ifade edilmektedir. Siklin D1 protein düzeyleri değerlendirilecek olursa A549 akciğer kanseri hücre hattında ilaç dozuna bağılı olarak protein anlatımında artış görülmektedir. Beas-2B hücre hattında da artan ilaç dozuna bağılı olarak protein seviyesinde artış görülmektedir. p-RB proteini ilaç dozuna bağılı olarak protein anlatımında azalma görülmektedir. Her iki hücre hattında da 1 µM abemasiklib de efektif rol oynamaktadır (Şekil 29). Sağkalım analizi ve floresans boyalar ile birlikte hücre akış sitometrisi ile PI boyama, yara iyileşme ve sferoid hücre modeli dahil birçok çalışmamızda abemasiklibin düşük dozda efektif rol oynadığı görülmektedir. Buda ilerleyen süreçte *in vivo* koşulda çalışabilmesi için bize ışık tutacaktır.

Hücresel düzeyde abemasiklib uygulaması üzerine otofajik cevabın aydınlatılması amacıyla akridin turuncusu floresans boyama gerçekleştirilmiştir. Lizozomlar içinde bazik moleküller birikerek pH'ın artmasına neden olur buda lizozomal fonksiyonları etkilemektedir. Akridin turuncusunun pH'ı emisyon spektrumuna bağılı olarak değişen bir boyadır. Nötr pH'daki sitozol ve çekirdeği yeşil, işlevsel lizozomları ise asidik pH da kırmızı olarak boyar [145]. Daha önce yapılmış olan bir çalışmada 1 µM abemasiklib uygulaması ile MBA-MB-468 hücre hattında lizozomal asidifikasyon lizozomların vakuol oluşumu ile ilerlediği gösterilmiştir [146]. A549 hücre hattında düşük dozda dahi vezikül oluşumu gözlenmiş ve buna bağılı olarak yüksek dozda da vezikül oluşumunda yoğunlaşma görülmüştür. Aynı zamanda

bronşiyal epitel hücre hattı olan Beas-2B’de düşük dozda vezikül oluşumunun yüksek doza kıyasla daha düşük bir düzeyde olduğunu göstermektedir (Şekil 24). Bu sonuçlara bağlı olarak otofajik süreç daha derinlemesine irdelenmek istenmiştir. Bunun için immünoiblotlama gerçekleştirilerek otofajik süreçte rol oynayan kritik protein seviyeleri irdelendi. Yapılan bir çalışmada A549 akciğer kanseri hücre hattı dahil farklı hücre hatlarında abemasiklib uygulamasının otofajik süreçteki rolü geniş kapsamlı olarak irdelenmiştir. Çalışmada CDK 4/6 inhibitörlerinin kanser hücre hatlarında sitosidal etkiye sebep olduğu, abemasiklibin en güçlü sitotoksik etkiye neden olduğu ve ayrıca apoptoz, nekroptoz, otofajik hücre ölümü ile tutarlı olmayan bir hücre ölümünü indüklediği, abemasiklibin sitoplazmik vakuol oluşumu ile ilişkili yeni bir hücre ölüm türünü indüklediği ortaya çıkarmışlardır [147]. Gerçekleştirmiş olduğumuz immünoiblotlama analizlerine bağlı olarak otofajik süreçle ilgili proteinlerin seviyelerinde dikkate değer bir farklılık olmaması literatür ile eşdeğer sonuçlar ortaya koyduğunu göstermektedir. otofajik süreçte abemasiklibin rolü aydınlandıktan sonra apoptotik süreçteki rolüde irdelenmek istenmiştir. Bu kapsamda çeşitli protein seviyeleri irdelenmiştir. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda CDK 4/6 inhibitörlerinin proliferasyonu inhibe ettiği ve glioma hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada Bax protein anlatımının 5 µM abemasiklib uygulaması ve üzerine çıkılması ile protein ifade seviyesinde artış sağlandığı görülmekte, benzer sonuç olarak bcl-2 protein seviyesinde de yüksek dozda protein ifadesinde değişim görülmektedir [148]. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada da benzer sonuçlar yer almaktadır. Aynı sonuçların akciğer kanseri hücre üzerinde benzer sonuçlara neden olduğunu göstermektedir. Bir diğer çalışmada da abemasiklibin meme ve yumurtalık kanseri hücre hatlarında apoptotik süreçte rol oynadığını göstermekte, aynı zamanda kaspaz protein ifade seviyelerinde azalmanın hücre hattına bağlı olarak değiştiğini bize göstermektedir. Meme kanseri hücre hatlarında değişiklik göstermezken, yumurtalık kanseri hücre hatlarında protein ifadesinde azalma görülmektedir [149]. Bu literatür bilgisine bağlı olarak akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücrelerinde de benzer sonuçlar görülmektedir. Apoptotik süreçte de otofajik süreç gibi rol oynadığı ancak farklı bir ölüm yoluğ üzerinden proliferasyona bağlı hücre sel canlılığın etkilendiği söylenilmektedir.

Akciğer kanseri hücrelerinde proliferasyona bağlı olarak hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyici aktiviteye sahip abemasiklib terapötik ajanının hücresel düzeyde aktivitesini sağlayan ve devamlılığının olabilmesi için enerji metabolizmasının efektif rolü söz konusu olmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda pek çok kanser türünde enerji stresi gösterilmiştir [155]. Abemasiklib uygulaması ile proliferasyon engellenmeye çalışıldığından hücresel düzeydeki enerji durumu kontrol edilmek istenmektedir. Kanser hücrelerinde CDK 4/6 inhibitörü olarak kullanılan abemasiklib AMPK- α 2 alt biriminin doğrudan fosforilasyonu yoluyla AMPK aktivitesini inhibe eder ve kanser hücresi enerji yoksunluğu yaşayarak apoptotik süreç tetiklenir. İnhibitörler ile yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda AMPK 'ya bağlı artmış oksidatif metabolizma sergilemekte ancak CDK 4/6 inhibitörleri hücresel enerji yoksunluğuna sebep olmaktadır [156]. AMPK aktivasyonunun, karaciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde tümör ilerlemesine karşı çıkabileceğine dair artan bir farkındalık vardır ve ayrıca abemasiklib'in hepatoselüler karsinoma da hücre canlılığı ve PP5/AMPK ekseninde etkisinin olduğu gösterilmiştir [157]. Bu sebeple akciğer kanseri hücre hatları üzerindeki efektif rolü araştırılmıştır. Gerçekleştirilen immünoyotlama analizine sonuçlarına göre abemasiklib uygulanması ile AMPK ve p-AMPK protein ifadelerinde azalma görülmektedir. Buda daha önce farklı kanser türlerinde gösterilmiş olan abemasiklibin efektif rolünün akciğer kanseri hücre hatlarında da efektif rol oynadığını göstermektedir (Şekil 30). AMPK yolağındaki enerji yoksunluğu ile ilerleyen süreçte hücre altı lipidleri ve yağ asitlerini irdelemek amacıyla bodipy floresans boyama gerçekleştirildi. Ayrıca bodpy, floresan boyama ile yağ asitlerini ve nötr lipidlerin dağılımlarını ve hareketliliğini göstermek amacıyla kullanılmaktadır [158]. AMPK yolağının günümüzde glikoz, lipid, protein metabolizması, çeşitli aşağı akış metabolik kinazların fosforilasyon durumunu geçici olarak değiştirerek veya transkripsiyonel olarak adaptasyonu etkileyerek veya enerji algılama üzerindeki etkisi dahil birçok etkeni kapsadığı bilinmektedir [50]. Oluşan lipid damlacıkları ile birlikte DAPI floresan boyama gerçekleştirilerek DNA kırıklarının gösterilmesi ve DNA onarım mekanizmasının inaktif olduğu şartlar altında hücresel apoptoz yolağı altında etkili olduğu ve buna bağlı lipid damlacıkları ile birlikte oluşan floresan görüntünün üst üste getirilmesiyle birlikte görselleştirilmesi sağlanarak birlikte değerlendirilmesi sağlanmıştır (Şekil 25).

CDK 4/6 siklin D1 aktivitesi ER/PR/AR, NF-kB, MAPK lar, STAT lar, Wnt/ β -katenin, PI3K/akt/mTOR gibi karmaşık bir ağ tarafından düzenlenir [150]. Büyüme faktörü reseptörü üzerinden PI3K/akt/mTOR yolağı ile ilerleyen CDK 4/6 siklin D1 kompleks oluşumu ve buradan da proliferasyona bağlı hücre döngüsünün ilerlemesi meme kanserinde gösterilmiştir [151]. Akt proteininin fosforilasyonu CDK 4/6 inhibitörleri için kazanılmış direnç mekanizması olarak bilinmektedir. Akt fosforilasyonu yoluyla PI3K/Akt/mTOR yolağının aktive olması daha önce ifade edilen bir direnç mekanizmasıdır [152]. RAS mutasyonu taşıyan akciğer kanseri hücre hatlarında PI3K/akt/mTOR yolağının kritik rol oynadığı literatürde yer almaktadır [153]. Yapılan bir çalışmada baş boyun skuamöz hücreli karsinom abemasiklib uygulaması ile mTOR, p-mTOR ve Akt protein seviyeleri değişmezken p-Akt protein ifadesinde azalma görülmektedir [130]. Bu sonuç daha önce ifade edilmiş diğer sonuçlarla ilişki olduğu ifadesini bize sunmaktadır. Yapılan diğer bir çalışmada da DMS-53 hücrelerine abemasiklib uygulaması ile p70S6 kinaz protein ifadesinin doza bağlı olarak azaldığı ifade edilmiştir [154]. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada da p70S6 kinaz proteininin literatür ile eşdeğer bir şekilde akciğer kanseri hücre hatlarında protein ifadesinin azaldığı görülmektedir. Benzer sonuçlar sergilemesi akciğer kanserinde abemasiklibin efektif rol oynadığı ancak PI3K/Akt/mTOR yolağı üzerindeki rolünün tam aydınlatılması gerektiği bilgisini sunmaktadır.

Endoplazmik retikulum hücrel homeostazı korumada görev alarak hücrel süreçte oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Hücrel düzeyde önemli rol oynayan proteinlerin katlanması ve işlev görmesi için aktif hale geçme süreçlerini irdelenmektedir [159]. Yanlış katlanmış ya da katlanmamış protein oluşumu ile ER stresi meydana gelir. Endoplazmik retikulum stresi sonrasında IRE1 α , CHOP, BiP, PERK proteinlerinin aktive olmasıyla gerçekleşerek apoptotik süreç yönünde hücrel ölüm yollarının ilerlemesini sağlamaktadır [160]. Meme kanserinde yapılan araştırmalara bağlı olarak endoplazmik retikulum stresi ile apoptotik sürecin desteklendiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [161]. İnsan prostat kanserinde endoplazmik retikulum stresine bağlı olarak ER stresindeki proteinlerin ifade seviyeleri artmış ve apoptotik sürecin indüklendiği gösterilmiştir [162]. Akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada farklı ilaç türlerinin de ER stresine

neden olduğu ilgili protein seviyelerinde artış görüldüğü ifade edilmiştir [163]. Glisiretinik asit hücre döngüsünün G1 aşamasında blokajını sağlayan terapötik ajan, akciğer kanseri hücre hattı olan A549 üzerine uygulandığında endoplazmik retikulum stresine yol açtığı gösterilmiştir [164]. Abemasiklibin akciğer kanseri hücre hatlarında endoplazmik retikulum stresine neden olduğu daha önce hiçbir çalışmada gösterilmemiştir. Gerçekleştirmiş olduğumuz immünoablota analizi ile endoplazmik retikulum stresine yol açan kritik proteinlerin seviyeleri değerlendirilmiştir. Akciğer kanseri hücre hatlarında ER stres proteinlerinin seviyelerinde artış görülmektedir. Endoplazmik retikulum stresi hücresel düzeyde apoptotik sürecin ilerlemesine neden olarak hücresel ölümün gerçekleşmesine neden olmuştur. Otofajik yolak ise bu süreçte dengeleyici bir rol oynayarak ilerlemiştir.

Sonuç olarak abemasiklib CDK 4/6 inhibitörü olarak hücre döngüsünde G1 aşamasında blokaja neden olarak hücresel proliferasyona ket vurmaktadır. Bu ilerleyen süreçte endoplazmik retikulum stresi üzerinden ilerleterek apoptotik yolakların indüklenmesine ve sürecin bu yönde ilerlemesine neden olmaktadır.

6 KAYNAKÇA

1. Dünya Sağlık Örgütü, 2017
2. Metastatic Disease, Kenneth Y. Usuki, ... Paul Okunieff, in Clinical Radiation Oncology (Fourth Edition), 2016
3. Wu J¹, Hao Z¹, Ma C¹, Li P¹, Dang L¹, Sun S¹, Comparative proteogenomics profiling of non-small and small lung carcinoma cell lines using mass spectrometry, PeerJ. 2020 Apr 23;8:e8779. doi: 10.7717/peerj.8779. eCollection 2020.
4. Anthony M. Musolf, Claire L. Simpson, [...], and Joan E. Bailey-Wilson (2017). Familial Lung Cancer: A Brief History from the Earliest Work to the Most Recent Studies. Genes, 8(1), 36. doi: 10.3390/genes8010036
5. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) globacan 2012 (Gültekin ve Boztaş 2014)
6. Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2016
7. Ariela L.Marshall¹ and David C.Christiani², Genetic susceptibility to lung cancer-light at the end of the tunnel, Carcinogenesis vol.34 no.3 pp.487–502, 2013 doi:10.1093/carcin/bgt016
8. Kevin ten Haaf¹ *, Jihyoun Jeon² , Martin C. Tammema³gi³ , Summer S. Han^{4,5}, Chung Yin Kong⁶ , Sylvia K. Plevritis⁴ , Eric J. Feuer⁷ , Harry J. de Koning¹ , Ewout W. Steyerberg¹ , Rafael Meza, Risk prediction models for selection of lung cancer screening candidates: A retrospective validation study, . PLoS Med 14(4): e1002277. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002277>
9. Robert Carreras-Torres¹ , Mattias Johansson¹ , Philip C. Haycock² , Kaitlin H. Wade² , Caroline L. Relton² , Richard M. Martin^{2,3} , George Davey Smith² , Demetrius Albanes⁴ , Melinda C. Aldrich⁵ , Angeline Andrew⁶ , Susanne M. Arnold⁷ , Heike Bickebo⁸ller⁸ , Stig E. Bojesen⁹ , Hans Brunnstro¹⁰m¹⁰ , Jonas Manjer¹⁰ , Irene Bru¹¹ske¹¹ , Neil E. Caporaso¹² , Chu Chen¹³ , David C. Christiani¹⁴ , W. Jay Christian¹⁵ , Jennifer A. Doherty¹⁶ , Eric J. Duell¹⁷ , John K. Field¹⁸ , Michael P. A. Davies¹⁸ , Michael W. Marcus¹⁸ , Gary E. Goodman¹⁹ , Kjell Grankvist²⁰ , Aage Haugen²¹ , Yun-Chul Hong²² , Lambertus A. Kiemeney²³ , Erik H. F. M. van der Heijden²³ , Peter Kraft²⁴ , Mikael B. Johansson²⁰ , Stephen Lam²⁵ , Maria Teresa Landi¹² , Philip Lazarus²⁶ , Loïc Le Marchand²⁷ , Geoffrey Liu²⁸ , Olle Melander^{29,30} , Sungshim L. Park³¹ , Gad Rennert³² , Angela Risch³³ , Eric B. Haura³⁴ , Ghislaine Scelo¹ , David

Zaridze³⁵, Anush Mukeriya³⁵, Milan Savić³⁶, Jolanta Lissowska³⁷, Beata Swiatkowska³⁸, Vladimir Janout³⁹, Ivana Holcatova⁴⁰, Dana Mates⁴¹, Matthew B. Schabath⁴², Hongbing Shen⁴³, Adonina Tardon⁴⁴, M Dawn Teare⁴⁵, Penella Woll⁴⁵, Ming-Sound Tsao⁴⁶, Xifeng Wu⁴⁷, Jian-Min Yuan⁴⁸, Rayjean J. Hung⁴⁹, Christopher I. Amos⁵⁰, James McKay¹, Paul Brennan¹, Obesity, metabolic factors and risk of different histological types of lung cancer: A Mendelian randomization study, *y. PLoS ONE* 12(6): e0177875, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177875>

10. Anthony J. Alberg , PhD , MPH ; Malcolm V. Brock , MD ; Jean G. Ford , MD , MPH , FCCP ; Jonathan M. Samet , MD , FCCP ; and Simon D. Spivack , MD , MPH, Epidemiology of Lung Cancer Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines, CHEST 2013; 143(5)(Suppl):e1S–e29S

11. Emine Bozkurtlar, Handan Kaya, Molecular Pathology of Lung Cancer, DOI:10.4274/nts.2018.004. Nucl Med Semin 2018;4:26-31

12. takd.org.tr/ AkcigerYolHaritasiTRbasimVERSIYONU

13. Hassan Lemjabbar-Alaoui^a, Omer Hassan^a, Yi-Wei Yang^a and Petra Buchanan^a, Lung cancer: biology and treatment options, *Biochim Biophys Acta*. 2015 December ; 1856(2): 189–210. doi: 10.1016/j.bbcan. 2015.08.002.

14. Stephen H. Bradley . Martyn P. T. Kennedy . Richard D. Neal, Recognising Lung Cancer in Primary Care, *Adv Ther* (2019) 36:19–30 <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0843-5>

15. Ehab Billatos, Jessica L. Vick, Marc E. Lenburg* , Avrum E. Spira*, The Airway Transcriptome as a Biomarker for Early Lung Cancer Detection, *Clin Cancer Res*. 2018 July 01; 24(13): 2984–2992. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-3187.

16. Samuel L. Rice, MD and Kent P. Friedman, MD*, Clinical PET-MR Imaging in Breast Cancer and Lung Cancer, *PET Clin*. 2016 October ; 11(4): 387–402. doi:10.1016/j.cpet.2016.05.008.

17. 1,2,3SHIVANI KUMAR, MPH, B App Sc (MRS), 1,2,3,4GARY LINEY, PhD, 2,3ROBBA RAI, MHLthSc (MRI), 1,2,3,4,5LOIS HOLLOWAY, PhD, 1,6,7DANIEL MOSES, MEngSc, FRANZCR and 1,2,7SHALINI K VINOD, MD, FRANZCR, Magnetic resonance imaging in lung: a review of its potential for radiotherapy, *Br J Radiol* 2016; 89: 20150431.

18. Frank C. Detterbeck, MD, FCCP; Daniel J. Boffa, MD; Anthony W. Kim, MD, FCCP; and Lynn T. Tanoue, MD, FCCP, The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification, CHEST 2017; 151(1):193-203
19. Sean Blandin Knight,^{1,†} Phil A. Crosbie,^{1,2,†} Haval Balata,¹ Jakub Chudziak,³ Tracy Hussell,⁴ and Caroline Dive^{2,3}, Progress and prospects of early detection in lung cancer, Open Biol. 2017 Sep; 7(9): 170070.
20. Rebecca M Schwartz,¹ Ksenia Gorbenko,³ Samantha M Kerath,⁴ Raja Flores,⁵ Sheila Ross,⁶ Tonya N Taylor,⁷ Emanuela Taioli,^{*2} Claudia Henschke,⁸ and for the I-ELCAP Investigators, Thoracic surgeon and patient focus groups on decision-making in early-stage lung cancer surgery, Future Oncol. 2018 Jan; 14(2): 151–163.
21. Sarah Baker,¹ Max Dahele,² Frank J. Lagerwaard,² and Suresh Senan², A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer, Radiat Oncol. 2016; 11(1): 115.
22. M. D. Hellmann, B. T. Li, J. E. Chaft, and M. G. Kris*, Chemotherapy remains an essential element of personalized care for persons with lung cancers, Ann Oncol. 2016 Oct; 27(10): 1829–1835.
23. Marzena MuraID^{1,2*}, Céline Feillet³, Roberto Bertolusso⁴, Franck Delaunay³, Marek Kimmel^{1,4,5*}, Mathematical modelling reveals unexpected inheritance and variability patterns of cell cycle parameters in mammalian cells, PLoS Comput Biol 15(6): e1007054. [https:// doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007054](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007054)
24. Matthew P. Swaffer,^{1,4,5,*} Andrew W. Jones,^{1,2} Helen R. Flynn,² Ambrosius P. Snijders,² and Paul Nurse^{1,3}, CDK Substrate Phosphorylation and Ordering the Cell Cycle, *Correspondence: matthew.swaffer@crick.ac.uk <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.034>
25. Hui Xiao Chao^{1,2}, Randy I Fakhreddin¹, Hristo K Shimerov¹, Katarzyna M Kedziora¹, Rashmi J Kumar^{1,3}, Joanna Perez⁴, Juanita C Limas⁵, Gavin D Grant^{4,6}, Jeanette Gowen Cook^{4,6}, Gaorav P Gupta^{6,7} & Jeremy E Purvis^{1,2,3,6,*}, Evidence that the human cell cycle is a series of uncoupled, memoryless phases, DOI 10.15252/msb.20188604 | Received 9 August 2018 | Revised 7 February 2019 | Accepted 8 February 2019
26. Jacob Peter Matson,¹ Amy M. House,¹ Gavin D. Grant,^{1,3} Huaitong Wu,¹ Joanna Perez,² and Jeanette Gowen Cook^{1,3}, Intrinsic checkpoint deficiency

during cell cycle re-entry from quiescence, *J Cell Biol.* 2019 Jul 1; 218(7): 2169–2184.

27. Suzan Ruijtenberg and Sander van den Heuvel, Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression, 2016, VOL. 15, NO. 2, 196–212 <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1120925>

28. Ying Fan^{1,2}, Sumana Sanyal ^{1,3 *} and Roberto Bruzzone^{1,4 *}, Breaking Bad: How Viruses Subvert the Cell Cycle, doi: 10.3389/fcimb.2018.00396

29. Thomas Zerjatke, Igor A. Gak, [...], and Jörg Mansfeld, Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One Reporter for Cell Tracking and Classification, *Cell Rep.* 2017 May 30; 19(9): 1953–1966.

30. Abbastabar, M., et al., Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)*, 2018. 69: p. 63-72.

31. Chaska C. Walton, Wei Zhang, Iris Patiño-Parrado, Estíbaliz Barrio-Alonso, Juan-José Garrido, and José M. Frade, Primary neurons can enter M-phase, *Sci Rep.* 2019; 9: 4594.

32. Edward T. Kipreos^{*,1} and Sander van den Heuvel¹, Developmental Control of the Cell Cycle: Insights from *Caenorhabditis elegans*, ORCID IDs: 0000-0001-9650-3558 (E.T.K.); 0000-0001-9015-7463 (S.v.d.H.)

33. Tony Ly¹, Yasmeen Ahmad¹, Adam Shlien², Dominique Soroka³, Allie Mills³, Michael J Emanuele³, Michael R Stratton², Angus I Lamond¹, A proteomic chronology of gene expression through the cell cycle in human myeloid leukemia cells, Ly et al. *eLife* 2014;3:e01630. DOI: 10.7554/eLife.01630

34. Myth T. Mok ^a , Jingying Zhou ^a , Wenshu Tang ^a , Xuezhen Zeng ^a , Antony W. Oliver ^c , Simon E. Ward ^d , Alfred S. Cheng ^{a,b}, CCRK is a novel signalling hub exploitable in cancer immunotherapy, journal homepage:www.elsevier.com/locate/pharmthera

35. Jonas Cicenas ^{1,2,3,*}, Karthik Kalyan ^{2,4} , Aleksandras Sorokinas ² , Asta Jatulyte ² , Deividas Valiunas ⁵ , Algirdas Kaupinis ³ and Mindaugas Valius ³, Highlights of the Latest Advances in Research on CDK Inhibitors, *Cancers* 2014, 6, 2224-2242; doi:10.3390/cancers6042224

36. Mary E. Klein¹, Marta Kovatcheva^{1,4}, Lara E. Davis², William D. Tap³, and Andrew Koff¹, CDK4/6 inhibitors: The mechanism of action may not be as simple

as once thought, *Cancer Cell*. 2018 July 09; 34(1): 9–20. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.023.

37. Yilan Yang^{1,2†}, Jurui Luo^{1,2†}, Xingxing Chen^{1,2}, Zhaozhi Yang^{1,2}, Xin Mei^{1,2}, Jinli Ma^{1,2}, Zhen Zhang^{1,2}, Xiaomao Guo^{1,2*} and Xiaoli Yu^{1,2*}, CDK4/6 inhibitors: a novel strategy for tumor radiosensitization, Yang et al. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (2020) 39:188

38. Rossana Roncato ^{1,* ,†}, Jacopo Angelini ^{2,†}, Arianna Pani ^{2,3,†}, Erika Cecchin ¹, Andrea Sartore-Bianchi ^{2,4}, Salvatore Siena ^{2,4}, Elena De Mattia ¹, Francesco Scaglione ^{2,3,‡} and Giuseppe Toffoli ¹, CDK4/6 Inhibitors in Breast Cancer Treatment: Potential Interactions with Drug, Gene, and Pathophysiological Conditions, *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6350; doi:10.3390/ijms21176350

39. Shom Goel^{1,2}, Molly J. DeCristo¹, Sandra S. McAllister^{3,4,5,6}, Jean J. Zhao^{1,7}, CDK4/6 inhibition in cancer: beyond cell cycle arrest, *Trends Cell Biol.* 2018 November ; 28(11): 911–925. doi:10.1016/j.tcb.2018.07.002.

40. Qi Du¹, Xiang Guo², Miao Wang¹, Yongfu Li¹, Xiaoyi Sun³ and Qin Li¹, The application and prospect of CDK4/6 inhibitors in malignant solid tumors, Du et al. *Journal of Hematology & Oncology* (2020) 13:41 <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00880-8>

41. Silvia Paola Corona,¹ Daniele Generali², Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2– advanced breast cancer, February 2018 Volume 2018:12 Pages 321-33

42. Marc Hafner,^{1,3,4} Caitlin E. Mills,^{1,4} Kartik Subramanian,¹ Chen Chen,¹ Mirra Chung,¹ Sarah A. Boswell,¹ Robert A. Everley,¹ Changchang Liu,¹ Charlotte S. Walmsley,² Dejan Juric,^{1,2,5, *} and Peter K. Sorger^{1,5,6, *,} Multiomics Profiling Establishes the Polypharmacology of FDA-Approved CDK4/6 Inhibitors and the Potential for Differential Clinical Activity, *Cell Chemical Biology* 26, 1067–1080, August 15, 2019

43. David A.Schaer¹³ Richard P.Beckmann²³ Jack A.Dempsey² LysianeHuber² AmelieForest¹ NelushaAmaladas¹ YanxiaLi¹ Ying CindyWang¹ Erik R.Rasmussen¹ DarinChin¹ AndrewCapen² CarmineCarpenito¹ Kirk A.Staschke² Linda A.Chung² Lacey M.Litchfield² Farhana F.Merzoug² XueqianGong² Philip W.Iversen² ... MichaelKalos¹⁴⁵, The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade, Volume 22, Issue 11, 13 March 2018, Pages 2978-2994

44. Ping Chen¹ , Nathan V. Lee² , Wenyue Hu³ , Meirong Xu² , Rose Ann Ferre¹ , Hieu Lam² , Simon Bergqvist² , James Solowiej² , Wade Diehl¹ , You-Ai He¹ , Xiu Yu¹ , Asako Nagata¹ , Todd VanArsdale² , and Brion W. Murray², Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance, Published Online First August 5, 2016; DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0300
45. Valentina Rossi,^{1,†} Paola Berchiolla,^{2,†} Diana Giannarelli,^{3,†} Cecilia Nisticò,⁴ Gianluigi Ferretti,⁴ Simona Gasparro,⁴ Michelangelo Russillo,⁴ Giovanna Catania,⁴ Leonardo Vigna,¹ Rossella Letizia Mancusi,⁵ Emilio Bria,^{6,7} Filippo Montemurro,⁸ Francesco Cognetti,⁹ and Alessandra Fabi⁴, Should All Patients With HR-Positive HER2-Negative Metastatic Breast Cancer Receive CDK 4/6 Inhibitor As First-Line Based Therapy? A Network Meta-Analysis of Data from the PALOMA 2, MONALEESA 2, MONALEESA 7, MONARCH 3, FALCON, SWOG and FACT Trials, *Cancers (Basel)*. 2019 Nov; 11(11): 1661.
46. Francesco Schettini,^{1,*†} Irene De Santo,^{1,†} Carmen G. Rea,¹ Pietro De Placido,¹ Luigi Formisano,¹ Mario Giuliano,^{1,2} Grazia Arpino,¹ Michelino De Laurentiis,³ Fabio Puglisi,^{4,5} Sabino De Placido,^{1,‡} and Lucia Del Mastro^{6,7}, CDK 4/6 Inhibitors as Single Agent in Advanced Solid Tumors, *Front Oncol*. 2018; 8: 608.
47. Navid Sobhani,^{1,*} Alberto D'Angelo,^{2,*} Matteo Pittacolo,³ Giandomenico Roviello,^{1,*} Anna Miccoli,¹ Silvia Paola Corona,¹ Ottavia Bernocchi,¹ Daniele Generali,¹ and Tobias Otto⁴, Updates on the CDK4/6 Inhibitory Strategy and Combinations in Breast Cancer, *Cells*. 2019 Apr; 8(4): 321.
48. Laura Spring,¹ Aditya Bardia,¹ and Shanu Modi^{2,3}, Targeting the cyclin D–cyclin-dependent kinase (CDK)4/6–retinoblastoma pathway with selective CDK 4/6 inhibitors in hormone receptor-positive breast cancer: rationale, current status, and future directions, *Discov Med*. 2016 Jan; 21(113): 65–74.
49. Silvia Paola Corona¹ and Daniele Generali², Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2– advanced breast cancer, *Drug Des Devel Ther*. 2018; 12: 321–330.
50. Ji Cheng,^{1,2} Tao Zhang,² Hongbin Ji,³ Kaixiong Tao,^{1,*} Jianping Guo,^{2,*} and Wenyi Wei^{2,*}, Functional characterization of AMP-activated protein kinase signaling in tumorigenesis, *Biochim Biophys Acta*. 2016 Dec; 1866(2): 232–251.
51. Ayesha S. Khan¹ and Daniel E. Frigo^{1,2}, Regulation, Role and Therapeutic Targeting of AMPK in Prostate Cancer, *Nat Rev Urol*. 2017 Mar; 14(3): 164–180.

52. Joungmok Kim¹ Goowon Yang,² Yeji Kim² Jin Kim,² and Joohun Ha^{3,*}, AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities, *Exp Mol Med*. 2016 Apr; 48(4): e224.
53. Richard T. Arkwright,¹ Rahul Deshmukh,¹ Nikhil Adapa,¹ Ryan Stevens,¹ Emily Zonder,¹ Zhongyu Zhang,^{1,2} Pershang Farshi,¹ Reda Saber Ibrahim Ahmed,^{1,3} Hossny Awad El-Banna,⁴ Tak-Hang Chan,⁵ and Q. Ping Dou^{1,*}, Lessons from Nature: Sources and Strategies for Developing AMPK Activators for Cancer Chemotherapeutics, *Anticancer Agents Med Chem*. 2015; 15(5): 657–671.
54. Sang-Min Jeon, Regulation and function of AMPK in physiology and diseases, *Exp Mol Med*. 2016 Jul; 48(7): e245.
55. D. Grahame Hardie, Keeping the home fires burning† : AMP-activated protein kinase, *JR Soc Arayüzü* . 2018 Ocak; 15 (138): 20170774.
56. D Grahame Hardie¹ * and Dario R Alessi², LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link – ten years after, *BMC Biol*. 2013; 11: 36.
57. Sébastien Herzig and Reuben J. Shaw, AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Feb; 19(2): 121–135.
58. D. Grahame Hardie, AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease, *J Intern Med*. 2014 Dec; 276(6): 543–559.
59. Meera Saxena,^{*,§} Sai A. Balaji,[§] Neha Deshpande,[§] Santhalakshmi Ranganathan, Divya Mohan Pillai, Sravanth Kumar Hindupur,[‡] and Annapoorni Rangarajan, AMP-activated protein kinase promotes epithelial-mesenchymal transition in cancer cells through Twist1 upregulation, *J Cell Sci*. 2018 Jul 15; 131(14): jcs208314.
60. Floris H. Groenendijk¹ , Wouter W. Mellema² , Eline van der Burg³ , Eva Schut³ , Michael Hauptmann⁴ , Hugo M. Horlings¹ , Stefan M. Willems^{1,5}, Michel M. van den Heuvel⁶ , Jos Jonkers³ , Egbert F. Smit² and Rene Bernards ¹, Sorafenib synergizes with metformin in NSCLC through AMPK pathway activation, *Int J Cancer*. 2015 Mar 15; 136(6): 1434–1444.
61. Weidong Li^{1,3,*}, Shakir M. Saud^{2,3,*}, Matthew R. Young³, Guohong Chen⁴, Baojin Hua¹, Targeting AMPK for cancer prevention and Treatment, *Oncotarget*. 2015 Apr 10; 6(10): 7365–7378.

62. Ningni Jiang,^{#1,2,3} Qijie Dai,^{#1,2,3} Xiaorui Su,^{#1,2,3} Jianjiang Fu,^{1,2,3} Xuancheng Feng,^{1,2,3} and Juan Peng^{1,2,3,4}, Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior, *Mol Biol Rep.* 2020; 47(6): 4587–4629.
63. David A. Fruman,^{1,*} Honyin Chiu,¹ Benjamin D. Hopkins,² Shubha Bagrodia,³ Lewis C. Cantley,² and Robert T. Abraham³, The PI3K pathway in human disease, *Cell.* 2017 Aug 10; 170(4): 605–635.
64. Xiang Shi,¹ Jingjing Wang,¹ Yu Lei,¹ Caofan Cong,¹ Dailin Tan,² and Xianrong Zhou¹, Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer, *Mol Med Rep.* 2019 Jun; 19(6): 4529–4535.
65. Jing Yang Ji Nie Xuelei Ma Yuquan Wei, Yong Peng, and Xiawei Wei, Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials, *Mol Cancer.* 2019; 18: 26.
66. Boris Y. Shorning, Manisha S. Dass, Matthew J. Smalley, and Helen B. Pearson*, The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling, *Int J Mol Sci.* 2020 Jun; 21(12): 4507.
67. Salihanur Darici,^{1,2,*} Hazem Alkhalidi,¹ Gillian Horne,¹ Heather G. Jørgensen,¹ Sandra Marmiroli,² and Xu Huang^{1,*}, Targeting PI3K/Akt/mTOR in AML: Rationale and Clinical Evidence, *J Clin Med.* 2020 Sep; 9(9): 2934.
68. Lei Li,¹ Dan Liu,¹ Zhi-Xin Qiu,¹ Shuang Zhao,¹ Li Zhang,² and Wei-Min Li^{1,*}, The Prognostic Role of mTOR and P-mTOR for Survival in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis, *PLoS One.* 2015; 10(2): e0116771.
69. Fei Xu,^{1,2} Lixin Na,^{2,3} Yanfei Li,³ and Linjun Chen³, Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours, *Cell Biosci.* 2020; 10: 54.
70. Patrizia Limonta, Roberta M. Moretti, Monica Marzagalli, Fabrizio Fontana, Michela Raimondi, and Marina Montagnani Marelli*, Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Anticancer Activity of Natural Compounds, *Int J Mol Sci.* 2019 Feb; 20(4): 961.
71. Aitor Almanza,¹ Antonio Carlesso,² Chetan Chintia,¹ Stuart Creedican,³ Dimitrios Doultinos,⁴ .⁵ Brian Leuzzi,¹ Andreia Luís,⁶ Nicole McCarthy,⁷ Luigi Montibeller,⁸ Sanket More,⁹ Alexandra Papaioannou,⁴ .⁵ Franziska Püschel,¹⁰ Maria Livia Sassano,⁹ Josip Skoko,¹¹ Patrizia Agostinis,⁹ Jackie de Belleruche,⁸ Leif A. Eriksson,² Simone Fulda,⁷ Adrienne M.

Gorman,¹ Sandra Healy,¹ Andrey Kozlov,⁶ Cristina Muñoz-Pinedo,¹⁰ Markus Rehm,¹¹ Eric Chevet^{4,5} and Afshin Samali¹, Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications, FEBS J. 2019 Jan; 286(2): 241–278.

72. Tamás Gáll,^{1,2} György Balla,^{1,2} and József Balla^{2,3}, Heme, Heme Oxygenase, and Endoplasmic Reticulum Stress—A New Insight into the Pathophysiology of Vascular Diseases, Int J Mol Sci. 2019 Aug; 20(15): 3675.

73. Hatem Maamoun,¹ Shahenda S. Abdelsalam,² Asad Zeidan,³ Hesham M. Korashy,² and Abdelali Agouni^{2,*}, Endoplasmic Reticulum Stress: A Critical Molecular Driver of Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disturbances Associated with Diabetes, Int J Mol Sci. 2019 Apr; 20(7): 1658.

74. Wai Chin Chong, Madhur D. Shastri,^{*} and Rajaraman Eri^{*}, Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Nexus Implicated in Bowel Disease Pathophysiology, Int J Mol Sci. 2017 Apr; 18(4): 771.

75. Jaekwang Kim,¹ ,[†] Miyong Yun,¹ ,[†] Eun-Ok Kim,¹ Deok-Beom Jung,¹ Gunho Won,¹ Bonglee Kim,¹ Ji Hoon Jung,¹ and Sung-Hoon Kim¹, Decursin enhances TRAIL-induced apoptosis through oxidative stress mediated-endoplasmic reticulum stress signalling in non-small cell lung cancers, Br J Pharmacol. 2016 Mar; 173(6): 1033–1044.

76. Jonathan A. Kropski^{1,2} and Timothy S. Blackwell^{1,2,3}, Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of fibrotic disease, J Clin Invest. 2018 Jan 2; 128(1): 64–73.

77. Natalia Siwecka,^{1,†} Wioletta Rozpędek,^{1,†} Dariusz Pytel,^{2,†} Adam Wawrzynkiewicz,¹ Adam Dzik,³ Łukasz Dzik,³ J. Alan Diehl,² and Ireneusz Majsterek¹, Dual role of Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Unfolded Protein Response Signaling Pathway in Carcinogenesis, Int J Mol Sci. 2019 Sep; 20(18): 4354.

78. Mei-qing Liu,^{1,#} Zhe Chen,^{1,#} and Lin-xi Chen^{1,*}, Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases, Acta Pharmacol Sin. 2016 Apr; 37(4): 425–443.

79. Tao Lin, Jae Eun Lee, Jung Won Kang, Hyeon Yeong Shin, Ju Bin Lee, and Dong Il Jin, Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Unfolded Protein Response (UPR) in Mammalian Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development, Int J Mol Sci. 2019 Jan; 20(2): 409.

80. Shengjie Yang,¹ Min Wu,¹ Xiaoya Li,² ,³ Ran Zhao,¹ ,² Yixi Zhao,¹ ,² Longtao Liu, ³ and Songzi Wang³, Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Atherosclerosis and Its Potential as a Therapeutic Target, *Oxid Med Cell Longev*. 2020; 2020: 9270107.
81. Aitor Almanza,¹ Antonio Carlesso,² Chetan Chintia,¹ Stuart Creedican,³ Dimitrios Doultinos,⁴ ,⁵ Brian Leuzzi,¹ Andreia Luís,⁶ Nicole McCarthy,⁷ Luigi Montibeller,⁸ Sanket More,⁹ Alexandra Papaioannou,⁴ ,⁵ Franziska Püschel,¹⁰ Maria Livia Sassano,⁹ Josip Skoko,¹¹ Patrizia Agostinis,⁹ Jackie de Belleruche,⁸ Leif A. Eriksson,² Simone Fulda,⁷ Adrienne M. Gorman,¹ Sandra Healy,¹ Andrey Kozlov,⁶ Cristina Muñoz-Pinedo,¹⁰ Markus Rehm,¹¹ Eric Chevet⁴ ,⁵ and Afshin Samali¹, Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications, *FEBS J*. 2019 Jan; 286(2): 241–278.
82. Miriam Cnop,^{1,2,*} Sanna Toivonen,¹ Mariana Igoillo-Esteve,¹ and Paraskevi Salpea¹, Endoplasmic reticulum stress and eIF2 α phosphorylation: The Achilles heel of pancreatic β cells, *Mol Metab*. 2017 Sep; 6(9): 1024–1039.
83. Beth Levine^{1,2,3} and Guido Kroemer^{4,5,6,7,8,9,10}, Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective, *Cell*. 2019 Jan 10; 176(1-2): 11–42.
84. João M. A. Delou, Alana S. O. Souza, Leonel C. M. Souza, and Helena L. Borges*, Highlights in Resistance Mechanism Pathways for Combination Therapy, *Cells*. 2019 Sep; 8(9): 1013.
85. Daniel J Klionsky,^{1745,1749} Kotb Abdelmohsen,⁸⁴⁰ Akihisa Abe,¹²³⁷ and ark. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition), *Autophagy*. 2016 Jan; 12(1): 1–222.
86. Ya-Qin Tan,^a Jing Zhang,^{a,b} and Gang Zhou^{a,b}, Autophagy and its implication in human oral diseases, *Autophagy*. 2017; 13(2): 225–236.
87. Kai Zheng,¹ Zhendan He,¹ Kaio Kitazato,² and Yifei Wang³, Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy, *Theranostics*. 2019; 9(1): 104–125.
88. Li, W.W., J. Li, and J.K. Bao, Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, 2012. 69(7): p. 1125-36.
89. Lorenzo Galluzzi¹ ,² Eric H Baehrecke,³ Andrea Ballabio,⁴ ,⁵ ,⁶ ,⁷ Patricia Boya,⁸ José Manuel Bravo-San Pedro,² ,⁹ ,¹⁰ ,¹¹ ,¹² Francesco Cecconi,¹³ ,¹⁴ ,¹⁵ Augustine M Choi,¹⁶ Charleen T Chu,¹⁷ Patrice Codogno,² ,¹⁸ ,¹⁹ ,²⁰ Maria Isabel

Colombo,²¹,²² Ana Maria Cuervo,²³ Jayanta Debnath,²⁴ Vojo Deretic,²⁵ Ivan Dikic,²⁶,²⁷,²⁸ Eeva-Liisa Eskelinen,²⁹ Gian Maria Fimia,³⁰,³¹ Simone Fulda,³²,³³,³⁴ David A Gewirtz,³⁵,³⁶ Douglas R Green,³⁷ Malene Hansen,³⁸ J Wade Harper,³⁹ Marja Jäättelä,⁴⁰ Terje Johansen,⁴¹ Gabor Juhasz,⁴²,⁴³ Alec C Kimmelman,⁴⁴ Claudine Kraft,⁴⁵ Nicholas T Ktistakis,⁴⁶ Sharad Kumar,⁴⁷ Beth Levine,⁴⁸,⁴⁹ Carlos Lopez-Otin,⁵⁰,⁵¹ Frank Madeo,⁵²,⁵³ Sascha Martens,⁴⁵ Jennifer Martinez,⁵⁴ Alicia Melendez,⁵⁵,⁵⁶ Noboru Mizushima,⁵⁷ Christian Münz,⁵⁸ Leon O Murphy,⁵⁹ Josef M Penninger,⁶⁰ Mauro Piacentini,¹³,³⁰ Fulvio Reggiori,⁶¹ David C Rubinsztein,⁶² Kevin M Ryan,⁶³ Laura Santambrogio,⁶⁴ Luca Scorrano,⁶⁵,⁶⁶ Anna Katharina Simon,⁶⁷,⁶⁸ Hans-Uwe Simon,⁶⁹ Anne Simonsen,⁷⁰ Nektarios Tavernarakis,⁷¹,⁷² Sharon A Tooze,⁷³ Tamotsu Yoshimori,⁷⁴,⁷⁵ Junying Yuan,⁷⁶,⁷⁷ Zhenyu Yue,⁷⁸ Qing Zhong,⁴⁸ and Guido Kroemer²,⁹,¹⁰,¹¹,¹²,⁷⁹,⁸⁰, Molecular definitions of autophagy and related processes, *EMBO J.* 2017 Jul 3; 36(13): 1811–1836.

90. Juliet Goldsmith,^{*} Beth Levine,[†] and Jayanta Debnath^{*,1}, Autophagy and Cancer Metabolism, *Methods Enzymol.* 2014; 542: 25–57.

91. Romana T. Netea-Maier,^{a,b} Theo S. Plantinga,^a Frank L. van de Veerdonk,^{a,c} Johannes W. Smit,^{a,b} and Mihai G. Netea^{a,c}, Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease, *Autophagy.* 2016 Feb; 12(2): 245–260.

92. Lisa B. Frankel, Michal Lubas, and Anders H. Lund, Emerging connections between RNA and autophagy, *Autophagy.* 2017; 13(1): 3–23.

93. Mojgan Djavaheri-Mergny,^{1,2,3,4,5,6,†} Sylvie Giuriato,^{6,7,8,9,10,11,†} Mario P. Tschan,^{6,12} and Magali Humbert¹², Therapeutic Modulation of Autophagy in Leukaemia and Lymphoma, *Cells.* 2019 Feb; 8(2): 103.

94. Guangbo Liu,^{1,*} Fen Pei,¹ Fengqing Yang,² Lingxiao Li,³ Amit Dipak Amin,³ Songnian Liu,⁴ J. Ross Buchan,^{1,*} and William C. Cho⁵, Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer, *Int J Mol Sci.* 2017 Feb; 18(2): 367.

95. Xinlei Yu,¹ Yun Chau Long,^{1,*} and Han-Ming Shen², Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy, *Autophagy.* 2015 Oct; 11(10): 1711–1728.

96. Lorenzo Galluzzi,^{1,2,*} José Manuel Bravo-San Pedro,^{2,3,4,5,6,*} Beth Levine,^{7,8} Douglas R. Green,⁹ and Guido Kroemer^{2,3,4,5,6,10,11}, Pharmacological

modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles, *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Jul; 16(7): 487–511.

97. Pooneh Mokarram,^a Mohammed Albokashy,^b Maryam Zarghooni,^{c,d} Mohammad Amin Moosavi,^e Zahra Sepehri,^c Qi Min Chen,^b Andrzej Hudecki,^f Aliyeh Sargazi,^c Javad Alizadeh,^b Adel Rezaei Moghadam,^b Mohammad Hashemi,^g Hesam Movassagh,^h Thomas Klonisch,^b Ali Akbar Owji,ⁱ Marek J. Łos,^{j,#} and Saeid Ghavami^{b,k}, New frontiers in the treatment of colorectal cancer: Autophagy and the unfolded protein response as promising targets, *Autophagy*. 2017; 13(5): 781–819.

98. Wenbin Zeng,¹ Xiaobo Wang,¹ Pengfei Xu,¹ Gang Liu,² Henry S. Eden,³ and Xiaoyuan Chen³, Molecular Imaging of Apoptosis: From Micro to Macro, *Theranostics*. 2015; 5(6): 559–582.

99. Ainhoa Pérez-Garijo,¹ Yaron Fuchs,¹ and Hermann Steller¹, Apoptotic cells can induce non-autonomous apoptosis through the TNF pathway, *eLife*. 2013; 2: e01004.

100. Parvaneh Mehrbod,^a Sudharsana R. Ande,^b Javad Alizadeh,^{c,d,e} Shahrzad Rahimizadeh,^f Aryana Shariati,^c Hadis Malek,^g Mohammad Hashemi,^h Kathleen K. M. Glover,ⁱ Affan A. Sher,ⁱ Kevin M. Coombs,^{d,i,j} and Saeid Ghavami^{c,d,e,k}, The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections, *Virulence*. 2019; 10(1): 376–413.

101. Ainhoa Pérez-Garijo and Hermann Steller, Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease, *Development*. 2015 Oct 1; 142(19): 3253–3262.

102. Abdullah İNCİ Alparslan YILDIRIM Ahmet YAVUZ Önder DÜZLÜ, Bazı Protozoon Enfeksiyonlarda Apoptozis, *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 6(2) 121-133, 2009.

103. Peng Xia, Yuening Liu, and Zhaokang Cheng, Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis, *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 9583268.

104. Norishi Ueda, Ceramide-Induced Apoptosis in Renal Tubular Cells: A Role of Mitochondria and Sphingosine-1-Phosphate, *Int J Mol Sci*. 2015 Mar; 16(3): 5076–5124.

105. Xuebo Xu,^{1,*} Yueyang Lai,^{1,*} and Zi-Chun Hua^{1,2,3}, Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials, *Biosci Rep*. 2019 Jan 31; 39(1): BSR20180992.

106. Rumani Singh,^{1,2} Anthony Letai,^{2,3,4} and Kristopher Sarosiek^{1,2,4}, Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Mar; 20(3): 175–193.
107. SEEMA-MARIA NATHWANI,¹ LISA M. GREENE,¹ STEFANIA BUTINI,² GIUSEPPE CAMPIANI,² D. CLIVE WILLIAMS,¹ AFSHIN SAMALI,³ EVA SZEGEZDI,³ and DANIELA M. ZISTERER¹, The pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-15, enhances TRAIL-induced apoptosis by upregulation of DR5 and downregulation of core cell survival proteins in acute lymphoblastic leukaemia cells, *Int J Oncol.* 2016 Jul; 49(1): 74–88.
108. Xingchen Zhou,[†] Wenbo Jiang,[†] Zhongshun Liu, Shuai Liu, and Xiaozhen Liang*, *Virus Infection and Death Receptor-Mediated Apoptosis, Viruses.* 2017 Nov; 9(11): 316.
109. Rama Rathore,¹ Jennifer E. McCallum,² Elizabeth Varghese,² Ana-Maria Florea,³ and Dietrich Büsselberg², Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs), *Apoptosis.* 2017; 22(7): 898–919.
110. Maria Eugenia Guicciardi,¹ Harmeet Malhi,¹ Justin L. Mott,² and Gregory J. Gores*,¹, Apoptosis and Necrosis in the Liver, *Compr Physiol.* 2013 Apr; 3(2): 10.1002/cphy.c120020.
111. Marcin Poreba,¹ Aleksandra Szalek,¹ Paulina Kasperkiewicz,¹ Wioletta Rut,¹ Guy S. Salvesen,² and Marcin Drag¹, Small Molecule Active Site Directed Tools for Studying Human Caspases, *Chem Rev.* 2015 Nov 25; 115(22): 12546–12629.
112. Nina Van Opdenbosch¹ and Mohamed Lamkanfi^{1,2}, Caspases in cell death, inflammation and disease, *Immunity.* 2019 Jun 18; 50(6): 1352–1364.
113. Si Ming Man and Thirumala-Devi Kanneganti, Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity, *Nat Rev Immunol.* 2016 Jan; 16(1): 7–21.
114. Ruya Zhao,¹ Rayan Kaakati,¹ Andrew K. Lee,^{1,2} Xinjian Liu,³ Fang Li,³ and Chuan-Yuan Li^{1,2,3}, Novel roles of apoptotic caspases in tumor repopulation, epigenetic reprogramming, carcinogenesis, and beyond, *Cancer Metastasis Rev.* 2018 Sep; 37(2-3): 227–236.
115. Yaron Fuchs^{1,2,3,*} and Hermann Steller¹, Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Jun; 16(6): 329–344.

116. S Shalini,¹ L Dorstyn,¹ S Dawar,¹ and S Kumar¹, Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ.* 2015 Apr; 22(4): 526–539.
117. Suresh Banjara,^{1,†} Chathura D. Suraweera,^{1,†} Mark G. Hinds,^{2,*} and Marc Kvaisakul¹, The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms, *Biomolecules.* 2020 Jan; 10(1): 128.
118. Ramzi M. Mohammad,^{a,b,*} Irfana Muqbil,^a Leroy Lowe,^c Clement Yedjou,^d Hsue-Yin Hsu,^e Liang-Tzung Lin,^f Markus David Siegelin,^g Carmela Fimognari,^h Nagi B. Kumar,ⁱ Q. Ping Dou,^{a,j} Huanjie Yang,^k Abbas K. Samadi,^l Gian Luigi Russo,^m Carmela Spagnuolo,^m Swapan K. Ray,ⁿ Mrinmay Chakrabarti,ⁿ James D. Morre,^o Helen M. Coley,^p Kanya Honoki,^q Hiromasa Fujii,^q Alexandros G. Georgakilas,^r Amedeo Amedei,^s Elena Niccolai,^s Amr Amin,^{t,u} S. Salman Ashraf,^v William G. Helferich,^w Xujuan Yang,^w Chandra S. Boosani,^x Gunjan Guha,^y Dipita Bhakta,^y Maria Rosa Ciriolo,^z Katia Aquilano,^z Sophie Chen,^{aa} Sulma I. Mohammed,^{ab} W. Nicol Keith,^{ac} Alan Bilsland,^{ac} Dorota Halicka,^{ad} Somaira Newsheen,^{ae} and Asfar S. Azmi^a, Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer, *Semin Cancer Biol.* 2015 Dec; 35(0): S78–S103.
119. Glenna Wink Foight^a and Amy E. Keating^{a,b}, Locating herpesvirus Bcl-2 homologs in the specificity landscape of anti-apoptotic Bcl-2 proteins, *J Mol Biol.* 2015 Jul 31; 427(15): 2468–2490.
120. Cristina Correia,^{1,2,*} Sun-Hee Lee,^{1,2,*} X. Wei Meng,^{1,2,*} Nicole D. Vincelette,² Katherine L.B. Knorr,² Husheng Ding,¹ Grzegorz S. Nowakowski,³ Haiming Dai,^{1,2,**} and Scott H. Kaufmann^{1,2,3}, Emerging Understanding of Bcl-2 Biology: Implications for Neoplastic Progression and Treatment, *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jul; 1853(7): 1658–1671.
121. D. Grahame Hardie¹, Fiona A. Ross¹, and Simon A. Hawley¹, AMP-Activated Protein Kinase: A Target for Drugs both Ancient and Modern, *Chemistry & Biology* 19, October 26, 2012
122. D Grahame Hardie¹, and Dario R Alessi², LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link – ten years after, Hardie and Alessi *BMC Biology* 2013, 11:36
123. O'Leary B¹, Finn RS², Turner NC^{1,3}, Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors, *Nat Rev Clin Oncol.* 2016 Jul;13(7):417-30. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.26. Epub 2016 Mar 31.

124. Mirza, M.B., et al., Induction of apoptosis and cell cycle arrest by ethyl acetate fraction of *Phoenix dactylifera* L. (Ajwa dates) in prostate cancer cells. *J Ethnopharmacol*, 2018. 218: p. 35-44.
125. Ni, Y.L., et al., Teroxirone motivates apoptotic death in tumorspheres of human lung cancer cells. *Chem Biol Interact*, 2018. 291: p. 137-143.
126. Neil Portman, Sarah Alexandrou, Emma Carson, Shudong Wang, Elgene Lim, C Elizabeth Caldon, Overcoming CDK4/6 inhibitor resistance in ER-positive breast cancer, 2019 Jan;26(1):R15-R30. doi: 10.1530/ERC-18-0317.
127. Elaheh Seyed Abutorabi, Shiva Irani, Marjan Yaghmaie, and Seyed Hamid Ghaffari Author information Article notes Copyright and License information Disclaimer, Abemaciclib (CDK4/6 Inhibitor) Blockade Induces Cytotoxicity in Human Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells, *Rep Biochem Mol Biol*. 2020 Jan; 8(4): 438–445.
128. Teena Dhir, Christopher W. Schultz, Aditi Jain, Samantha Z. Brown, Alex Haber, Austin Goetz, Chunhua Xi, Gloria H. Su, Liang Xu, James Posey, III, Wei Jiang, Charles J. Yeo, Talia Golan, Michael J. Pishvaian, and Jonathan R. Brody, Abemaciclib is effective against pancreatic cancer cells and synergizes with HuR and YAP1 inhibition, *Mol Cancer Res*. 2019 Oct; 17(10): 2029–2041.
129. Michele Dowless, Caitlin D. Lowery, Terry Shackelford, Matthew Renschler, Jennifer Stephens, Robert Flack, Wayne Blosser, Simone Gupta, Julie Stewart, Yue Webster, Jack Dempsey, Alle B. VanWye, Philip Ebert, Philip Iversen, Jonathan B. Olsen, Xueqian Gong, Sean Buchanan, Peter Houghton, and Louis Stancato, Abemaciclib is Active in Preclinical Models of Ewing's Sarcoma via Multi-pronged Regulation of Cell Cycle, DNA Methylation, and Interferon Pathway Signaling, *Clin Cancer Res*. 2018 Dec 1; 24(23): 6028–6039.
130. Bo Mi Ku, Seong Yoon Yi, Jiae Koh, Yeon-Hee Bae, Jong-Mu Sun, Se-hoon Lee, Jin Seok Ahn, Keunchil Park, and Myung-Ju Ahn, The CDK4/6 inhibitor LY2835219 has potent activity in combination with mTOR inhibitor in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncotarget*. 2016 Mar 22; 7(12): 14803–14813.
131. Christina E. M. Krämer, Wolfgang Wiechert, and Dietrich Kohlheyer, Time-resolved, single-cell analysis of induced and programmed cell death via non-invasive propidium iodide and counterstain perfusion, *Sci Rep*. 2016; 6: 32104.

132. Philipp Stiefel, Sabrina Schmidt-Emrich, Katharina Maniura-Weber, and Qun Ren, Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide, *BMC Microbiol.* 2015; 15: 36.
133. Christina E. M. Krämer,¹ Wolfgang Wiechert,¹ and Dietrich Kohlheyer, Time-resolved, single-cell analysis of induced and programmed cell death via non-invasive propidium iodide and counterstain perfusion, *Sci Rep.* 2016; 6: 32104.
134. Sarwat Naz, Anastasia Sowers, Rajani Choudhuri, Maria Wissler, Janet Gamson, Askale Mathias, John A. Cook, and James B. Mitchell, Abemaciclib, a Selective CDK4/6 Inhibitor Enhances the Radiosensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer in vitro and in vivo, *Clin Cancer Res.* 2018 Aug 15; 24(16): 3994–4005.
135. Jing Chen, Anna V. Chernatynskaya, Jian-Wei Li, Matthew R. Kimbrell, Richard J. Cassidy, Daniel J. Perry, Andrew B. Muir, Mark A. Atkinson, Todd M. Brusko, and Clayton E. Mathews, T cells display mitochondria hyperpolarization in human type 1 diabetes, *Sci Rep.* 2017; 7: 10835.
136. Allan Sauvat, Yidan Wang, Florian Segura, Sabrina Spaggiari, Kevin Müller, Heng Zhou, Lrenzo Galluzzi, Oliver Kepp, and Guido Kroemer, Quantification of cellular viability by automated microscopy and flow cytometry, *Oncotarget.* 2015 Apr 20; 6(11): 9467–9475.
137. Gloria Bonuccelli, Maria Peiris-Pages, Bela Ozsvari, Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti, Targeting cancer stem cell propagation with palbociclib, a CDK4/6 inhibitor: Telomerase drives tumor cell heterogeneity, *Oncotarget.* 2017 Feb 7; 8(6): 9868–9884.
138. Silvia La Monica, Claudia Fumarola, Daniele Cretella, Mara Bonelli, Roberta Minari, Andrea Cavazzoni, Graziana Digiacomo, Maricla Galetti, Francesco Volta, Maicol Mancini, Pier Giorgio Petronini, Marcello Tiseo, and Roberta Alfieri, Efficacy of the CDK4/6 Dual Inhibitor Abemaciclib in EGFR-Mutated NSCLC Cell Lines with Different Resistance Mechanisms to Osimertinib, *Cancers (Basel).* 2021 Jan; 13(1): 6.
139. Christin Riess, Dirk Koczan, Björn Schneider, Charlotte Linke, Katharina del Moral, Carl Friedrich Classen, and Claudia Maletzki, Cyclin-dependent kinase inhibitors exert distinct effects on patient-derived 2D and 3D glioblastoma cell culture models, *Cell Death Discov.* 2021; 7: 54.
140. Javier A. García-Vilas¹, Ian Morilla¹, Anibal Bueno¹, Beatriz Martínez-Poveda¹, Miguel Ángel Medina^{1,2} and Juan A.G. Ranea, In silico prediction of

targets for anti-angiogenesis and their in vitro evaluation confirm the involvement of SOD3 in angiogenesis, *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, (No. 25), pp: 17349-17367
Oncotarget, Advance Publications 2018.

141. Hyun Jung Lee, Kui-Jin Kim, Ji Hea Sung, Milang Nam, Koung Jin Suh, Ji-Won Kim, Se Hyun Kim, Jin Won Kim, Yu Jung Kim, Keun-Wook Lee, Jong Seok Lee, and Jee Hyun Kim, PI3K p110 α Blockade Enhances Anti-Tumor Efficacy of Abemaciclib in Human Colorectal Cancer Cells, *Cancers (Basel)*. 2020 Sep; 12(9): 2500.

142. Michele Dowless, Caitlin D. Lowery, Terry Shackelford, Matthew Renschler, Jennifer Stephens, Robert Flack, Wayne Blosser, Simone Gupta, Julie Stewart, Yue Webster, Jack Dempsey, Alle B. VanWye, Philip Ebert, Philip Iversen, Jonathan B. Olsen, Xueqian Gong, Sean Buchanan, Peter Houghton, and Louis Stancato, Abemaciclib is Active in Preclinical Models of Ewing's Sarcoma via Multi-pronged Regulation of Cell Cycle, DNA Methylation, and Interferon Pathway Signaling, *Clin Cancer Res*. 2018 Dec 1; 24(23): 6028–6039.

143. Sarwat Naz, Anastasia Sowers, Rajani Choudhuri, Maria Wissler, Janet Gamson, Askale Mathias, John A. Cook, and James B. Mitchell, Abemaciclib, a Selective CDK4/6 Inhibitor Enhances the Radiosensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer in vitro and in vivo, *Clin Cancer Res*. 2018 Aug 15; 24(16): 3994–4005.

144. Masahiro Ohara,^{1,2,*} Kengo Saito,^{1,3} Ken Kageyama,^{1,4} Mizue Terai,¹ Hanyin Cheng,^{5,6} Andrew E. Aplin,⁵ and Takami Sato, Dual Targeting of CDK4/6 and cMET in Metastatic Uveal Melanoma, *Cancers (Basel)*. 2021 Mar; 13(5): 1104.

145. Susana Llanos, Diego Megias,^{#1} Carmen Blanco-Aparicio,^{#1} Elena Hernández-Encinas,¹ Miguel Rovira,² Federico Pietrocola,² and Manuel Serrano, Lysosomal trapping of palbociclib and its functional implications, *Oncogene*. 2019; 38(20): 3886–3902.

146. Erik S. Knudsen,^{1,2} Jack Hutcheson,⁴ Paris Vail,^{1,2} and Agnieszka K. Witkiewicz, Biological specificity of CDK4/6 inhibitors: dose response relationship, in vivo signaling, and composite response signature, *Oncotarget*. 2017 Jul 4; 8(27): 43678–43691.

147. Hirotugu Hino,¹ ,² Noriyoshi Iriyama,³ Hiroko Kokuba,⁴ Hiromi Kazama,¹ Shota Moriya,¹ Naoharu Takano,¹ Masaki Hiramoto,¹ Shin Aizawa,² and Keisuke Miyazawa, Abemaciclib induces atypical cell death in cancer

cells characterized by formation of cytoplasmic vacuoles derived from lysosomes, *Cancer Sci.* 2020 Jun; 111(6): 2132–2145.

148. Yingxiao Cao,¹ Xin Li,² Shiqi Kong,¹ Shuling Shang,³ and Yanhui Qi, CDK4/6 inhibition suppresses tumour growth and enhances the effect of temozolomide in glioma cells, *J Cell Mol Med.* 2020 May; 24(9): 5135–5145.

149. Zhi Huang,^{1,#} Wei Zhou,^{1,#} Yongtao Li,¹ Mei Cao,¹ Tianqi Wang,¹ Yakun Ma,¹ Qingxiang Guo,¹ Xin Wang,¹ Chao Zhang,¹ Chenglan Zhang,¹ Wenzhi Shen,⁶ Yanhua Liu,² Yanan Chen,² Jianyu Zheng,⁵ Shengyong Yang,⁴ Yan Fan,^{1,2,3,✉} and Rong Xiang, Novel hybrid molecule overcomes the limited response of solid tumours to HDAC inhibitors via suppressing JAK1-STAT3-BCL2 signalling, *Theranostics.* 2018; 8(18): 4995–5011.

150. Hanxiao Xu, Shengnan Yu, Qian Liu, Xun Yuan, Sridhar Mani, Richard G. Pestell, and Kongming Wu, Recent advances of highly selective CDK4/6 inhibitors in breast cancer, *J Hematol Oncol.* 2017; 10: 97.

151. Laura M. Spring, Mark L. Zangardi, Beverly Moy, and Aditya Bardia, Clinical Management of Potential Toxicities and Drug Interactions Related to Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors in Breast Cancer: Practical Considerations and Recommendations, *Oncologist.* 2017 Sep; 22(9): 1039–1048.

152. Hyun Jung Lee, Kui-Jin Kim, Ji Hea Sung, Milang Nam, Koung Jin Suh, Ji-Won Kim, Se Hyun Kim, Jin Won Kim, Yu Jung Kim, Keun-Wook Lee, Jong Seok Lee, and Jee Hyun Kim, PI3K p110 α Blockade Enhances Anti-Tumor Efficacy of Abemaciclib in Human Colorectal Cancer Cells, *Cancers (Basel).* 2020 Sep; 12(9): 2500.

153. Marta Román, Iosune Baraibar, Inés López, Ernest Nadal, Christian Rolfo, Silvestre Vicent, and Ignacio Gil-Bazo, KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target, *Mol Cancer.* 2018; 17: 33.

154. Lacey M. Litchfield, Karsten Boehnke, Manisha Brahmachary, Cecilia Mur, Chen Bi, Jennifer R. Stephens, J. Michael Sauder, Sonia M. Gutiérrez, Ann M. McNulty, Xiang S. Ye, Wenjuan Wu, María José Lallena, Xueqian Gong, Farhana F. Merzoug, Valerie M. Jansen, and Sean G. Buchanan, Combined inhibition of PIM and CDK4/6 suppresses both mTOR signaling and Rb phosphorylation and

potentiates PI3K inhibition in cancer cells, *Oncotarget*. 2020 Apr 28; 11(17): 1478–1492.

155. Jimin Yuan, Xiaoduo Dong, Jiajun Yap, and Jiancheng Hu, The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy, *J Hematol Oncol*. 2020; 13: 113.

156. Isabel C. Lopez-Mejia,^{1,2} Sylviane Lagarrigue,² Albert Giralt,¹ Laia Martinez-Carreres,¹ Nade `ge Zanou,^{2,3} Pierre-Damien Denechaud,^{1,2} Judit Castillo-Armengol,¹ Carine Chavey,⁴ Meritxell Orpinell,² Brigitte Delacuisine,^{1,2} Anita Nasrallah,¹ Caterina Collodet,^{5,6} Lianjun Zhang,⁷ Benoît Viollet,^{8,9,10} D. Grahame Hardie,¹¹ and Lluís Fajas^{1,2,12}, CDK4 Phosphorylates AMPKα2 to Inhibit Its Activity and Repress Fatty Acid Oxidation.

157. Feng-Shu Hsieh ^{1,2}, Yao-Li Chen ^{3,4}, Man-Hsin Hung ^{5,6}, Pei-Yi Chu ^{7,8}, Ming-Hsien Tsai ^{1,2}, Li-Ju Chen ^{1,2}, Yung-Jen Hsiao ^{1,2}, Chih-Ting Shih ^{1,2}, Mao-Ju Chang ^{1,2}, Tzu-I Chao ⁹, Chung-Wai Shiau¹⁰ and Kuen-Feng Chen ^{1,2}, Palbociclib induces activation of AMPK and inhibits hepatocellular carcinoma in a CDK4/6-independent manner.

158. Ning Zhao, Tyrslai M. Williams, Zehua Zhou, Frank R. Fronczek, Martha Sibrian-Vazquez, Seetharama D. Jois, and M. Graça H. Vicente, Synthesis of BODIPY-Peptide Conjugates for Fluorescence Labeling of EGFR over-expressing Cells, *Bioconjug Chem*. 2017 May 17; 28(5): 1566–1579.

159. Roberto Bravo, Valentina Parra, Damián Gatica, Andrea E. Rodriguez, Natalia Torrealba, Felipe Paredes, Zhao V. Wang, Antonio Zorzano, Joseph A. Hill, Enrique Jaimovich, Andrew F.G. Quest, and Sergio Lavandero, Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration, *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013; 301: 215–290.

160. Mei-qing Liu, Zhe Chen, and Lin-xi Chen, Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases, *Acta Pharmacol Sin*. 2016 Apr; 37(4): 425–443.

161. Leila MEHDIZADEHTAPEH and Pınar OBAKAN YERLİKAYA, Endoplasmic reticulum stress and oncomir-associated chemotherapeutic drug resistance mechanisms in breast cancer tumors, *Turk J Biol*. 2021; 45(1): 1–16.

162. Sheng-Chun Chiu, Shee-Ping Chen, Sung-Ying Huang, Mei-Jen Wang, Shinn-Zong Lin, Horng-Jyh Harn, and Cheng-Yoong Pang, Induction of

Apoptosis Coupled to Endoplasmic Reticulum Stress in Human Prostate Cancer Cells by *n*-butylidenephthalide, PLoS One. 2012; 7(3): e33742.

163. Heike Niessner, Tobias Sinnberg, Corinna Kosnopfel, Keiran S. M. Smalley, Daniela Beck, Christian Praetorius, Marion Mai, Stefan Beissert, Dagmar Kulms, Martin Schaller, Claus Garbe, Keith T. Flaherty, Dana Westphal, Ines Wanke, and Friedegund Meier, BRAF inhibitors amplify the pro-apoptotic activity of MEK inhibitors by inducing ER stress in NRAS-mutant melanoma, Clin Cancer Res. 2017 Oct 15; 23(20): 6203–6214.

164. JIE ZHU, MEIJUAN CHEN, NING CHEN, AIZHEN MA, CHUNYAN ZHU, RUOLIN ZHAO, MIAO JIANG, JING ZHOU, LIHONG YE, HAIAN FU, and XU ZHANG, Glycyrrhetic acid induces G1-phase cell cycle arrest in human non-small cell lung cancer cells through endoplasmic reticulum stress pathway, Int J Oncol. 2015 Mar; 46(3): 981–988.

7 EKLER

Ek A: Cihazlar

Tablo 1. Laboratuvarda kullanılan cihazlar

Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
Buzdolabı	4263TMB	Arçelik
Derin dondurucu	2041D	Arçelik
Dondurucu (-80 °C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific
Hassas tartı	LE6202S	Sartorius
Manyetik karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile su cihazı	TANKPE030	Millipore Direct q-5UV
Mikropipet (0,5-10µl)	EH52836	Thermo Scientific
Mikropipet (20-200µl)	EH46925	Thermo Scientific

Mikropipet (200-1000µl)	T27274	Thermo Scientific
Santrifüj cihazı	5417R	Eppendorf
Santrifüj cihazı	5810R	Eppendorf
Sıvı azot tankı	Arpege 40	Air Liquide
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Soğutmalı etüv	ES120	Nüve
Laminar flow	LN090	Nüve
Laminar flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Otoklav cihazı	Oto32	Nüve
pH metre	N315	SEM BIO Technologie
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
İnkübatör	51026280	Thermo Scientific

Floresan mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
İnverted mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
Optik mikroskop	701	Ivymen
Stereo mikroskop	V12	Zeiss
Kuru ısıtıcı blok	FN120	Nüve
Akış sitometri cihazı	AC6531180147	BD Biosciences

Elektroforez sistemi	1658004	BioRad
Rotasyon cihazı	SRT9D	Stuart Equipment
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Kar-buz makinası	AF80	ScotMan
PVDF membran	88518	Thermo
Mikroplaka okuyucu	680	BioRad
Güç kaynağı	PowerPac/B	BioRad

Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Facs flow cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6
Transfer cihazı	10016505C	BioRad

Ek B: Hücre Kültürü Donanımları

Tablo 2. Hücre kültüründe kullanılan malzemeler

Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
6 kuyucuklu petri	92006	TPP

12 kuyucuklu petri	92012	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
25cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
75cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP

Enjektör seti	21G	ASTRAJECT
Filtreler	99722	TPP
Hemastometre	Z359629	Sigma Aldrich
Etüv	Heracell 1150	Thermo
Kriyovial tüp	V7634	Thermo Scientific
Tipsin-EDTA	25200-056	Gibco

Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
RPMI Medium	11875093	Gibco
Mikropipet uçları (10µl)	5030010	CAPP
Mikropipet uçları (100µl)	5130070	CAPP
Mikropipet uçları (1000µl)	4130135	CAPP
A549 hücre hattı		ATCC
Beas-2B hücre hattı		ATCC

--	--	--

Ek C: Kimyasal Maddeler

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Ürün Kodu	Firma Adı
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
Metanol	24229	SIGMA-ALDICH

2-merkaptoetanol	S4805940 517	MERCK
Akrilamid/Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
PI boya	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH

Fetal Bovine Serum	P290310	Pan Biotech
Laemmli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asit	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA
Sığır Serum Albumin	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH

(BSA)		
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Thermo Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asit	27225	SIGMA-ALDRICH
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
NaCl	A2941	Applichem

Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Applichem
APS		
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H ₂ O ₂	K39218400838	MERCK

Rnase Free Water	42480093	QIAGEN
Super Block T20 Blocking Buffer	37536	Thermo
Ponceau kırmızı belirteci	A1405	Applichem
HCl	K43804717 239	MERCK
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Paraffin 42-40	8002-74-2	MERCK
Ampisilin		

Ek D: Kullanılan Çözeltiler

Tablo 4. 10X Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS), pH:7,4

NaCl	80,0 gr
KCl	2,0 gr
Na ₂ HPO ₄	14,4 gr
KH ₂ PO ₄	2,4 gr
dH ₂ O	1000 ml
Toplam	1 L

Hassas tartı ile tartılan tüm kimyasallar 1L'lik balon joje içerisine alınarak dH₂O ile çözülür ve 1L dH₂O ile tamamlanarak pH metre ile pH ayarı yapılır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X'e çevrilerek kullanılır.

Tablo 5. Hücre Dondurma Medyası

Fetal sığır serumu (FBS)	9 ml
Dimetil sülfoksit (DMSO, (CH ₃) ₂ SO)	1 ml
Toplam	10 ml

Hücre kültürüne uygun şekilde DMSO kullanılarak hazırlanan medya 0,22 mm'lik filtre kullanılarak süzülür ve -20°C'de muhafaza edilir. Dondurulan hücreler sıvı azot içerisinde uzun süreli olarak saklanır.

Tablo 6. 1,5 Molar Tris-Baz Çözeltisi, pH:8,8

Tris-baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	90,8 gr
dH ₂ O	500 ml
Toplam	500 ml

Hassas tartı ile tartılan Tris-baz 500 ml'lik erlen içerisine alınarak 500ml dH₂O da çözülerek pH ayarı yapılır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Tablo 7. 0,5 Molar Tris-Baz Çözeltisi, pH:6,8

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$)	30,25 gr
dH ₂ O	500 ml
Toplam	500 ml

Hassas tartı ile tartılan Tris-baz 500 ml'lik erlen içersine alınarak 500ml dH₂O da çözülerek pH ayarı yapılır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Tablo 8. Hücre Lizis Tamponu (CLB)

M-PER™ Mammalian Protein Extraction Regent	10,0 ml
Roche® PhosSTOP fosfataz inhibitör kokteyli	1 tablet
Roche® proteaz inhibitör kokteyli	1 tablet
Toplam	10 ml

Hazırlanan çözelti +4°C de muhafaza edilir.

Tablo 9. 5X Laemmli Tamponu

1,5 M Tris-Cl çözeltisi (pH 6,8)	2,0 ml
%1 (w/v) bromofenol mavisi	0,5 ml
Gliserol	5,0 ml
β -merkaptetanol	2,5 ml
SDS, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	2,0 gr
Toplam	10 ml

Hazırlanan Laemmli tamponu -20°C'de muhafaza edilir.

Tablo 10. %10(w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi

SDS, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	10,0 gr
dH ₂ O	100 ml

Toplam	100 ml
--------	--------

Hazırlanan SDS çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Tablo 11. %30 (v/v) Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi

Akrilamid (C_3H_5NO)	29,2 gr
Bis-Akrilamid ($C_7H_{10}N_2O_2$)	0,8 gr
dH ₂ O	100 ml
Toplam	100 ml

Hazırlanan akrilamid/bisakrilamid çözeltisi +4°C de muhafaza edilir.

Tablo 12. %10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS)

Amonyum persülfat ($(NH_4)_2S_2O_8$)	1,0 gr
dH ₂ O	10 ml

Toplam	10 ml
--------	-------

Hazırlanam APS çözeltisi -20°Cde muhafaza edilir.

Tablo 13. %12 (v/v) Poliakrilamid Jel

	Alt jel	Üst jel
dH ₂ O	3,4 ml	3,075 ml
Tris-baz çözeltisi	2,5 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,125 ml (0,5 M, pH 6,8)
%10 (w/v) SDS	0,1 ml	0,05 ml
%30 (v/v) Akrilamid/Bisakrilamid	4,0 ml	0,67 ml
%10 (w/v) APS	0,05 ml	0,025 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml

Tablo 14. 10X Yürütme Tamponu, pH:8,3

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$)	30,3 gr
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	144,0 gr
SDS, $NaC_{12}H_{25}SO_4$	10,0 gr
dH ₂ O	1000 ml
Toplam	1 L

Tris-baz ve glisin hassas tartı ile tartılarak balon joje içerisinde dH₂O ile çözülür ve pH ayarı yapılır. Daha sonra SDS ilave edilir ve 1 L'ye tamamlanır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır.

Tablo 15. 10X Transfer Tamponu, pH:8,3

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$)	30,3 gr
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	144,0 gr
dH ₂ O	1000 ml

Toplam	1 L
--------	-----

Tris-baz ve glisin hassas tartı ile tartılarak balon joje içerisinde dH₂O ile çözülür ve pH ayarı yapılır. 1 L'ye tamamlanır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır. %20 metanol içerir.

Tablo 16. 10X Tris Tampon Çözeltisi (TBS), pH: 7,6

Tris-baz (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	12,11 gr
NaCl	86,6 gr
dH ₂ O	1000 ml
Toplam	1 L

Tris-baz ve glisin hassas tartı ile tartılarak balon joje içerisinde dH₂O ile çözülür ve pH ayarı yapılır. 1 L'ye tamamlanır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir. 1X olarak kullanılır. TBS-Tween çözeltisi için 1X TBS içerisine 1:1000 (v/v) oranında Tween ilave edilir.

Tablo 17. %5 (w/v) Süt Çözeltisi

Yağsız süt tozu	2,5 gr
1X TBS-Tween çözeltisi	50 ml
Toplam	50 ml

Hazırlanan süt çözeltisi -20°C de muhafaza edilir.

Tablo 18. Bradford Çözeltisi

Coomassie mavisi ($C_{47}H_{50}N_3O_7S_2$)	25,0 gr
%95 (v/v) C_2H_5OH	12,5 gr
%85 (v/v) CH_3COOH	25,0 ml
dH ₂ O	212,5 ml
Toplam	250 ml

Hazırlanan süt çözeltisi +4°C de muhafaza edilir.

Tablo 19. 1M Tris-Baz Çözeltisi, pH: 8,5

Tris-baz ($C_4H_{11}NO_3$)	60,5 gr
dH ₂ O	500 ml
Toplam	500 ml

Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Tablo 20. Kumarik Asit Çözeltisi

p-Coumaric asit ($C_9H_8O_3$)	0,15 gr
DMSO, $(CH_3)_2SO$	10 ml
Toplam	10 ml

Hazırlanan çözelti +4°C de muhafaza edilir.

Tablo 21. Luminol Çözeltisi

Luminol ($C_8H_7N_3O_2$)	0,44 gr
DMSO, $(CH_3)_2SO$	10 ml
Toplam	10 ml

Hazırlanan çözelti $-20^{\circ}C$ de muhafaza edilir.

Tablo 22. Kemiluminesans Çözeltisi

Kemiluminesans A Çözeltisi	Miktar	Kemiluminesans B Çözeltisi	Miktar
dH ₂ O	9,0 ml	dH ₂ O	9,0 ml
1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml	1 M Tris-baz çözeltisi, pH 8,5	1,0 ml
Kumarik asit çözeltisi	45,0 μ l	H ₂ O ₂	6,0 μ l
Luminol çözeltisi	100,0 μ l		

Hazırlanan A ve B çözeltisi karanlık ortamda karıştırılarak kullanılır.

Tablo 23. PBS/BSA Çözeltisi

BSA	0,5 gr
1X PBS çözeltisi	50 ml
Toplam	50 ml

Hazırlanan çözelti +4°C de muhafaza edilir.

Tablo 24. Blok Çözeltisi

BSA	0,5 gr
%10 (w/v) SDS çözeltisi	2,5 ml
1X PBS çözeltisi	50 ml
Toplam	50 ml

Hazırlanan çözelti +4°C de muhafaza edilir.

EK E: Antikorlar

Tablo 25. Çalışmada kullanılan antikorlar

Adı	Katalog No	Firma Adı
Bim	2933	Cell Signaling Technology
Bax	610982	BD Biosciences
Bid		Cell Signaling Technology
p-RB		Cell Signaling Technology
AMPK		Cell Signaling Technology
p-AMPK (Thr172)	2535	Cell Signaling Technology
kesilmiş PARP	5625	Cell Signaling Technology
GAPDH		Cell Signaling Technology

Akt	4691	Cell Signaling Technology
p-akt (Ser473)	4060	Cell Signaling Technology
acc		Cell Signaling Technology
p-acc		Cell Signaling Technology
FASN		Cell Signaling Technology
mTOR	2983	Cell Signaling Technology
p-mTOR		Cell Signaling Technology
AMPK α 2	5832	Cell Signaling Technology
CDK4	12790	Cell Signaling Technology
CDK6	13331	Cell Signaling Technology
siklin D1		Cell Signaling Technology
PI3K		Cell Signaling Technology

p70S6 kinaz	611261	BD Biosciences
ATG5	12994	Cell Signaling Technology
ATG12	4180	Cell Signaling Technology
Bcl-2	15071	Cell Signaling Technology
Beclin1	3495	Cell Signaling Technology
CHOP	2895	Cell Signaling Technology
BIP		Cell Signaling Technology
ATF4		Cell Signaling Technology
ATF6		Cell Signaling Technology
PERK		Cell Signaling Technology
IRE1 α		Cell Signaling Technology
BAK		Cell Signaling Technology

PARP		Cell Signaling Technology
KASPAZ 3	9661	Cell Signaling Technology
KASPAZ 7		Cell Signaling Technology
KASPAZ 9	9505	Cell Signaling Technology
GAPDH	8884	Cell Signaling Technology
AKTIN	12620	Cell Signaling Technology