

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

**EVEROLİMUS'UN OVER BERRAK HÜCRELİ KANSER HATTINDA
PTEN/ mTOR/ VEGF SİNYAL YOLAĞINDAKİ ETKİLERİNİN
APOPTOTİK DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Uzm. Dr. Kamil Hakan Müftüoğlu

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Adnan Menevşe

ANKARA
Mayıs 2013

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

**EVEROLİMUS'UN OVER BERRAK HÜCRELİ KANSER HATTINDA
PTEN/ mTOR/ VEGF SİNYAL YOLAĞINDAKİ ETKİLERİNİN
APOPTOTİK DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Uzm. Dr. Kamil Hakan Müftüoğlu

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Adnan Menevşe

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 01/2010-86 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Mayıs 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

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

Tez Savunma Tarihi: 17 Mayıs 2013

Prof. Dr. Adnan Menevşe
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Abdullah Ekmekçi
Gazi Üniversitesi

Prof.Dr.Feride İffet Şahin
Başkent Üniversitesi

Doç.Dr.Erkan Yurtçu
Başkent Üniversitesi

Doç.Dr.Ece Konaç
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER	VII
TABLolar	IX
SEMBOLLER-KISALTMALAR	XI
ÖNSÖZ	XIII

1.	GİRİŞ	1
2.	GENEL BİLGİLER	3
2.1.	Over Berrak Hücreli Karsinomu(OBHK)	3
2.2.	Anjiogenezis ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	6
2.3.	Apoptozis	9
2.4.	PTEN (Fosfotaz ve Tensin Homologu)	12
2.5.	mTOR Yapısı ve Aktivasyonu	15
2.5.1.	mTOR'un Üst Uyarı Basamakları	17
2.5.1.1.	PI3K/AKT Uyarı Yolağı	17
2.5.1.2.	Ras/Raf/MEK/ERK Uyarı Yolağı	18
2.5.1.3.	AMPK ve Diğer Moleküller	19
2.5.1.4.	Diğer Etkenler	19
2.5.2.	mTOR'un Alt Uyarı Basamakları	20
2.5.2.1.	4E-BP1	20
2.5.2.2.	P70S6K1	21
2.5.3.	mTOR ile İlişkili Diğer Moleküller	21
2.6.	mTOR İnhibitörleri ve Everolimus	23
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1.	Kullanılan Araç ve Gereçler	26
3.1.1.	Hücre Kültürü	26
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar	26
3.1.3.	Kullanılan Sarflar	27
3.1.4.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	27

3.1.5.	Kullanılan Kitler	28
3.2.	Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	28
3.2.1.	DMEM % 10'luk Besiyerinin Hazırlanışı	28
3.2.2.	DMEM % 1'lik Besiyerinin Hazırlanışı	28
3.2.3.	XTT Karışımının Hazırlanması	28
3.2.4.	0.2M Na ₂ HPO ₄ Çözeltisinin Hazırlanışı	29
3.2.5.	0.1M Sitrik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı	29
3.2.6.	Fosfat-Sitrat Çözeltisinin (pH: 7.8) Hazırlanışı	29
3.2.7.	Nonidet %0.25 P-40 (NP-40) Çözeltisinin Hazırlanışı	29
3.2.8.	1mg/ml Proteinaz K Çözeltisinin Hazırlanışı	29
3.2.9.	1mg/ml Ribonükleaz A (RNaz A) Çözeltisinin Hazırlanışı	29
3.2.10.	10X Tris Borat EDTA (TBE) Stok Çözeltisinin Hazırlanışı	29
3.2.11.	0.5 M EDTA Çözeltisinin Hazırlanışı	30
3.2.12.	1X Tris Borat EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanışı	30
3.2.13.	Oranj G Jel Yükleme Tamponu	30
3.2.14.	Stok Etidyum Bromür Boyasının Hazırlanışı	30
3.2.15.	PBS çözeltisinin Hazırlanması	30
3.3.	Yöntemler	30
3.3.1.	Hücre Kültürü	31
3.3.2.	XTT Sitotoksite Deneyi	31
3.3.3.	Floresan Mikroskopunda Canlı/Apoptotik/ Nekrotik Hücrelerin Değerlendirilmesi	32
3.3.4.	Hücre Kültüründen Total RNA Saflaştırılması	32
3.3.5.	cDNA Sentezi	34
3.3.5.1	cDNA RT-PCR Programı	34
3.3.5.2.	Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü	35
3.3.5.3.	mTOR Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	35
3.3.5.4.	PTEN Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	37
3.3.5.5.	VEGF-A Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi	38
3.3.5.6.	Light Cyclers (LC) Deney Programı	38
3.3.6.	İstatistiksel Analiz Yöntemleri	39
4.	BULGULAR	40
4.1.	ES-2/CRL-1978 Hücrelerinin Everolimus, Taxol, ve Everolimus/Taxol kombinasyonlarına Duyarlılığının XTT	41

	Sitotoksisite Yöntemi ile İncelenmesi	
4.2.	ES-2/CRL-1978 Hücrelerinin Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EtBr) ile Apoptozis-Nekroz Değerlendirilmesi	52
4.3.	Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	56
5.	TARTIŞMA	59
6.	SONUÇ	71
7.	ÖZET	73
8.	SUMMARY	75
9.	KAYNAKLAR	77
10.	TEŞEKKÜR	101
11.	ÖZGEÇMİŞ	102

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER

Şekil 1	Anjiogenezis	6
Şekil 2	Apoptozis	10
Şekil 3	PI3K-Akt Yolağı ve PTEN Denetlenimi	13
Şekil 4	mTOR Komplekslerinin Yapısı	15
Şekil 5	mTOR'un Yapısı	16
Şekil 6	mTOR Denetleme Basamakları	17
Şekil 7	Ras/mTOR Yolağı	18
Şekil 8	mTORC1'in Aminoasitler İle Aktivasyonu	20
Şekil 9	Rapamisin'in Yapısı	23
Şekil 10	Everolimus'un Yapısı	25
Şekil 11	mTOR mRNA'sının Belirlenmesinde Kullanılan Primerler ve UPL Proben cDNA Dizisi Üzerindeki Yerleşimi	36
Şekil 12	PTEN mRNA'sının Belirlenmesinde Kullanılan Primerler ve UPL Proben cDNA Dizisi Üzerindeki Yerleşimi	37
Şekil 13	VEGFA mRNA'sının Belirlenmesinde Kullanılan Primerler ve UPL Proben cDNA Dizisi Üzerindeki Yerleşimi	38
Şekil 14	XTT testi, ES-2/CRL-1978 Hücrelerinin (10.000 Hücre/Kuyu)24 Saat Evorelimus Uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan	42
Şekil 15	XTT testi, ES-2/CRL-1978 Hücrelerinin (10.000 Hücre/Kuyu) 48 Saat Evorelimus Uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	43
Şekil 16	XTT testi, ES-2/CRL-1978 Hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 72 saat Evorelimus Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi	43
Şekil 17	XTT testi, ES-2/CRL-1978 Hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi	45
Şekil 18	XTT testi, ES-2/CRL-1978 Hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi	46
Şekil 19	XTT testi, ES-2/CRL-1978 Hücrelerinin (10000 hücre/kuyu) 72 saat Taxol Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi	47
Şekil 20	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu)24 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 1 nM Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi	49
Şekil 21	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 1 nM Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	49

Şekil 22	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 10 nM Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi	50
Şekil 23	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 10 nM Kombine Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkisi	51
Şekil 24	ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Taxol 5 ve 25 nM Konsantrasyonda 48 Saat Uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz Üzerine Olan Etkisi	53
Şekil 25	ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 Saat Uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz Üzerine Olan Etkisi	53
Şekil 26	ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu)Taxol 5 nM+ Everolimus 1 ve 10 nM Konsantrasyonda 48 Saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz Üzerine Olan Etkisi	55
Şekil 27	ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu)Taxol 25 nM+Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 Saat Uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz Üzerine Olan Etkisi	55
Şekil 28	Taxol5nM+Everolimus 1nM-10nM Uygulanmasında PTEN, mTOR, VEGF-mRNA İfade lenmesi	57
Şekil 29	Taxol25nM+Everolimus 1nM-10nM Uygulanmasında PTEN, mTOR, VEGF-mRNA İfade lenmesi	58

TABLÖLER

Tablo 1	cDNA RT-PCR tepkime karışımı	34
Tablo 2	Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program	35
Tablo 3	mTOR Real-Time PCR tepkime karışımı	36
Tablo 4	PTEN Real-Time PCR tepkime karışımı	37
Tablo 5	VEGF-A Real-Time PCR tepkime karışımı	38
Tablo 6	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu)24 saat Evorelimus uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	41
Tablo 7	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Evorelimus uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	42
Tablo 8	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 72 saat Evorelimus uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	42
Tablo 9	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu)24 saat Taxol uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	44
Tablo 10	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	45
Tablo 11	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 72 saat Taxol uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	46
Tablo 12	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 1 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	48
Tablo 13	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 1 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	48
Tablo 14	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 10 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	50
Tablo 15	XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 10 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi	51
Tablo 16	ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Taxol 5 ve 25 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz üzerine olan etkisi	52
Tablo 17	ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz üzerine olan etkisi	52
Tablo 18	ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu)Taxol 5 nM+ Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz üzerine olan etkisi	54

Tablo 19	ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu)Taxol 25 nM+Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/ Nekroz üzerine olan etkisi	54
Tablo 20	Taxol5nM+Everolimus 1nM-10nM uygulanmasında PTEN, mTOR, VEGF-mRNA ifadelenmesi	56
Tablo 21	Taxol25nM+Everolimus 1nM-10nM uygulanmasında PTEN, mTOR, VEGF-mRNA ifadelenmesi	57

SEMBOLLER, KISALTMALAR

ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
Akt	:Protein Kinaz B
AMPK	:AMP-aktif protein kinaz
Anti-VEGF	:Anti- Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
ADP	:Adenozindifosfat
ATP	:Adenozin trifosfat
α	:Alfa
β	:Beta
μ L	:Mikrolitre
μ M	:Mikromolar
bFGF	:temel Fibroblast Büyüme Faktörü
BrdU	:5-bromo-2'-deoksiuridin
CDK	:Siklin Bağımlı Kinaz
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
4EBP1	:Ökaryotik Başlatma Faktörü 4E Bağlayıcı Protein 1
EDTA	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGR-1	:Erken Büyüme Regülasyonlu Transkripsiyon Faktör1
EMA	:Avrupa Tıp Ajansı
EMI-1	:Erken Mitotik İnhibitör-1
EOK	:Epitelyal Ovarian Karsinoma
FKBP-12	:FK506 bağlayıcı protein
FDA	:Amerika Gıda İlaç İdaresi
FOXO	:Çatal Kafalı kutu proteini
g	:Gram
GDP	:Güanozin difosfat
GTP	:Güanozin trifosfat
HIF-1	:Hipoksiyle Uyarılan Faktör
HIF-1 α	:Hipoksiyle Uyarılan Faktör 1 alfa
HMF-1 β	:Hepatosit Nükleer Faktör 1 beta
HUVEC	:İnsan Göbek Ven Endotel Hücresi
IRS-1	:İnsülin Reseptör Substratı-1
IC50	:Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan ilaç konsantrasyonu
kDa	:Kilodalton
LOH	:Heterozigosite kaybı
M	:Molar

MAPK	:Mitojen ile aktive edilmiş protein
MLST8	:Memeli öldürücü Sec13protein8
MMP	:Matriks metalloproteinaz
mg	:Miligram
MKK4	:Mitojen Aktive Protein Kinaz-4
ml	:Mililitre
mm ³	:milimetreküp
mRNA	:Elçi RNA
mTOR	:Rapamisinin Memeli Hücrelerindeki Hedefi
NADPH	:Nikotinamid adenin dinükleotit
NCI	:Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü
nM	:Nanomolar
NO	:Nitrit Oksit
OBHK	:Ovarian Berrak Hücreli Karsinoma
P70S6K1	:Ribozomal S6 kinaz1
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDK	:PIP3 bağımlı Kinaz
PKB	:Protein Kinaz B
PKC	:Protein Kinaz C
PKG	:Protein Kinaz G
PLGF	:Plasental Büyüme Faktörü
PIP3	:Fosfoinozitol 3 fosfat
PI3K	:Fosfoinozitol 3 Kinaz
PPAR- γ	:Peroksizom Çoğaltıcı Aktive Reseptör- γ
PTX	:Paclitaxel
Rb	:Retinoblastoma
RCC	:Böbrek Hücreli Karsinoma
Rpm	:Dakika başına dönme sayısı
RTK	:Reseptör Tirozin Kinaz
sn	:Saniye
Taq	:Thermus aquaticus
TGF	:Transforme Edici Büyüme Faktörü
TSC	:Tüberoskleroz geni
TIMP	:Metalloproteinaz Doku İnhibitörü
VEGF	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
°C	:Santigrad derece

ÖNSÖZ

Over Kanseri Hücre Hattında mTOR inhibitörü everolimusun tek başına ve taxol ile beraber kullanarak hücre ölümü ile apoptozise etkileri yanında PTEN, mTOR ile VEGF genlerinin ifadenmesi üzerine olan etkilerinin araştırılması konulu bu tez, Gazi Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'nca 01/2010-86 kod no'lu proje ile desteklenmiştir. Çalışmamız, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

1-GİRİŞ

Over kanserleri, jinekolojik kanserlere bağlı ölümler içinde en sık izlenen 2. kanser grubudur.¹ Hastaların %75'ine tanı konulduğunda hastalıkları ileri evrede olup bu hastaların ortalama sağ kalım süresi de 3 yıl gibi kısa olmaktadır. Endüstriyel toplumlarda uygulanan tüm tedavilere rağmen 5 yıllık sağ kalım oranı %30'un altında kalmaktadır.^{2,3}

Kemoterapi başlanmış over kanserlerinde ve bunların bir grubu olan berrak hücreli kanserlerinde de sağ kalımı etkileyen önemli faktörlerden bir tanesi temel kemoterapatik ajan olan taxol'lara karşı rezistans gelişmesidir. Diğer önemli bir faktör de bu ilaçların yan etkileri nedeni ile düşük faydalanım olmaktadır.⁴

Kanserler ile ilgili artan moleküler bilgiler ve araştırmalar sonucunda etkin ve aynı zamanda da daha az toksik özelliklere sahip yeni ilaçlar arayışlarına devam edilmektedir. Yeni tedavi araştırmaları özellikle hücre içinde uyarı ileti basamaklarına yoğunlaşmış olup, yeni ismi ile "Moleküler Hedefli Tedaviler" başlığını oluşturmaktadır ve jinekolojik kanserler ile ilgili olarak da her yıl çok sayıda sayıda moleküler hedefli tedavi araştırması yapılmaktadır.^{5,6}

Çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler, hücrelerde PI3K ve Akt yolunu aktive ederek yaşamsal sinyalleri başlatırlar. PI3K, inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid mediatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur. PTEN ise PIP3 oluşumunu inhibe ederek, (3'pozisyonunu defosforile ederek) negatif düzenleyici-tümör supressör olarak rol oynamaktadır.^{7,8,9} Bu sinyaller bir serin-threonin kinaz olan mTOR (mammalian target of rapamycin-mTOR) merkezli bir yolağı uyarırlar. mTOR'un en önemli uyarıcısı PI3K'dir. mTOR,

hem hücre büyümesinde hem de hücre siklusun da merkezi rol oynamaktadır.¹⁰

PI3K/Akt/mTOR yolağında merkezi rol alan mTOR'un inhibitörü olan rapamisin ve bunun türevi everolimus (RAD001) antianjiogenik ve antitümör etkileri açısından son zamanlarda çok araştırılan maddelerden birisidir.¹¹

Bu tez çalışmasında over berrak hücreli kanser hattında mTOR inhibitörü olan everolimus'un tek başına ve taxol ile beraber kullanarak hücre ölümü ve apoptozise olan etkileri yanında PTEN, mTOR ile VEGF genlerinin ifadelenmesi üzerine olan etkilerinin gösterilmesi amaçlandı.

2-GENEL BİLGİLER

2.1- Over Berrak Hücreli Karsinomu (OBHK)

Over tümörleri en sık görülen 6. tümör grubu olup, ABD’de tümörlere bağlı kadın ölümlerinin de %2’sinden sorumludur.¹¹⁹ OBHK, tüm over epitelial kanserlerinin yaklaşık olarak % 4-14’nü oluşturmaktadır.¹²¹

Overin epitelyal kanserleri köken aldığı over hücre tipine bağlı olarak farklı davranışta ve yapıda birçok tümör tipinden oluşmaktadır.¹² Overin epitelyal kanserleri seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli, malign brenner, anaplastik ve mikst epitelyal olmak üzere yedi ana grupta incelenirler. Bu epitelyal tümörler biyolojik davranışlarına göre benign, borderline ve malign olmak üzere 3 ana grupta incelenirler.¹⁴⁹

Over berrak hücreli karsinomu (OBHK) (Clear Cell Ovarian Carcinoma), ilk defa 1939 yılında Schiller tarafından over de tümör hücrelerinin böbrek hücreli karsinoma (Renal Cell Carcinoma: RCC) hücrelerine benzemesi nedeni ile Mesonephroma Ovarii olarak tanımlanmıştır.¹³ Berrak görünüm özelliği çok miktarda intrastoplazmik glikojen içeriği bulunması nedeni ile oluşmaktadır.

OBHK, daha sık rastlanan kanser grubu olan over seröz adenokarsinomundan farklı davranış sergilemektedir. Daha erken evrede büyük pelvik doku ile ortaya çıkmaktadır. OBHK’de sağ kalım süresi’de belirgin olarak diğer over kanserlerinden de daha düşük olup 5 yıllık sağ kalım oranı seröz karsinoma’da %80 iken, OBHK’de %60 olarak izlenmektedir.¹⁴

OBHK’nın moleküler biyolojisi üzerine yapılan araştırmalarda bunların gelişmesinde ve ilerlemesinde çok basamaklı uyarı yollarının ve

farklı gen ekspresyonlarının olduğu gösterilmektedir.¹⁵ OBHK'nun moleküler patolojisi heterojen yapıda olup çoğu OBHK, diploid veya tetraploiddir.¹²² En sık değişiklikler: hücre uyarımı, transkripsiyon proteinleri (hepatosit nükleer faktör(HNF)-1 β ve onun alt hedefleri, hücre siklus regülasyonu yolağı ve Erken Mitotik İnhibitör-1(EMI-1), mTOR yolağı, ilaç rezistans gen ürünleri (detoksifikasyon enzimleri), invazivlik (matriks metalloproteinaz; MMP) ve doku metalloproteinaz inhibitörü(TIMP), adezyon ve matriks proteinlerinde izlenmektedir.^{17,18}

OBHK, overin diğer önemli bir tümör grubu olan endometrioid karsinoma gibi endometriozis sıklıkla eşlik etmektedir (%30 vakada). OBHK'ler, endometrioid karsinomdan farklı olarak da nükleer östrojen ve progesteron reseptörü bulundurmamaktadır.¹⁶ OBHK'ler yüksek oranda rekürrens, erken metastaz ve kemoterapiye direnç içermekte olup kemoteraplere karşı cevabı da düşüktür. Bu özellikler OBHK'lerinin farklı kemorezistans mekanizmaları içermiş olabileceğini düşündürmektedir.¹⁵

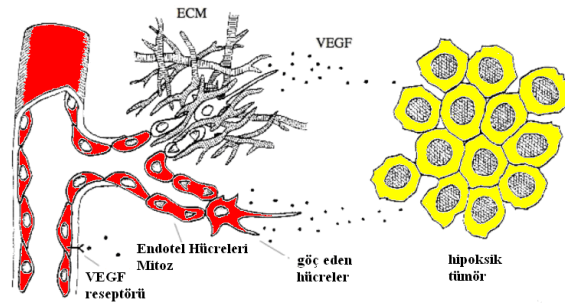
OBHK'ler, vajinal berrak hücreli karsinomu ve böbrek hücreli karsinomuna da histolojik görünüm ve gen ekspresyonları açısından benzerlikler bulundurmaktadır.^{5,14,122} Yoshida'nın hipotezine göre endometriotik kistlerde tekrarlayan kist içi kanamalar sonucu demirden zengin ortam oluşmakta, bu da demir-uyarılı persistant oksidatif stres ile başlayan karsinogenez ile OBHK gelişimine yol açabilmektedir.^{15,19} Diğer taraftan OBHK'nun hızlı çoğalan tümörler olmamasına rağmen radioterapiye karşı kısmen daha yüksek duyarlılıkta olmasının sebebinin radioterapiye hassasiyet sağlayan yüksek intratümöral neovaskülarizasyonun yüksekliğinin etkisi olabileceği öne sürülmektedirler.^{122,151} Berrak hücreli karsinomlarda düşük mitotik indeks izlenmekte olması hücre bölünmesi için etkili olan terapatik ajanlara karşı izlenen düşük duyarlılığını da kısmen açıklamaktadır.¹²²

Epitelyal over kanserlerinde esas tedavi cerrahi ve kemoterapi'den oluşmaktadır. Kemoterapatik ilaçlarda kullanım sırasına göre ikiye ayrılırlar. Öncelikli uygulanan tedavi taxol ya da docetaksel+sisplatin ya da karboplatin'dir. İkincil olarak kullanılan ilaçlar ise; Proplatin, Etoposide, Topotecan, Doksorubisin, Vinorelbine, Ifosfamide, Vepeside ve Tamoksifen'dir. Radyoterapi ile ilgili küçük çaplı bazı çalışmalar olsa da günümüzde rutin değildir. Ayrıca son yıllarda gündeme gelen intra-peritoneal kemoterapi, neo-adjuvan kemoterapi, biyolojik ve hedef tedaviler mevcuttur.^{149,150}

Taksol, yeni doğal antikanser bileşikler bulmak üzere NCI tarafından değişik birçok bitkinin tarandığı bir program kapsamında, ABD'de yetişen *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan 1971 yılında izole edilmiştir.¹⁵³ Bu yıldan sonra üzerinde yapılan yoğun çalışmalar sonucunda taksol, 1983 yılında faz I, 1985 yılında faz II çalışmalarına alınmıştır. Taksol, FDA tarafından 1992 yılı içinde ovaryum ve 1994 yılında meme kanserli hastalara verilmek üzere ruhsatlandırılmıştır. Taxol ve türevleri antitümör etkilerini, hücrede mikrotübüllerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonunu önleyerek sabit mikrotubul toplulukları oluşturmak suretiyle göstermektedir.¹⁵²

2.2-Anjiogenezis ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Anjiogenezis; yeni kapiller damar gelişimi olup embriyonik gelişme, yara iyileşmesi ve organ hipertrofisi gibi fizyolojik olaylarda görülmesi yanında patolojik durumlarda da izlenmektedir.¹⁴⁵ Anjiogenezis tümörün beslenmesi ve oksijen alabilmesi için temel gereksinimlerinden biridir. Anjiogenezisin temelleri Folkman tarafından 1970 yılında tanımlanmıştır. Tümör belli bir büyüklüğe ulaştığında ortaya çıkan hipoksi ve besin ihtiyacı 'anjiogenik anahtar'ı aktive ederek anjiogenezis'i başlatmaktadır (Şekil 2). Anjiogenik moleküller çok sayıda olup temel rol VEGF ailesi tarafından yürütülmektedir.^{20,21}



Şekil 1 : Anjiogenezis¹⁴⁶

Kanser hücreleri kontrol mekanizmalarını kaybetmiş olarak hızla çoğalma özelliğindeki hücreler olup içerdikleri mutasyonlar onların vücut korunmasına ve ilaçlara karşı direnç geliştirmesine yardımcı olmaktadır. Genel olarak kabul edildiği üzere, türleri ve kökenleri göz önünde tutulmaksızın solid tümörler 1mm³ boyuta ulaştığında var olan yapı ile oksijen ve temel besin madde ihtiyacını devam ettirmesi mümkün olmadığından yeni damarlara ihtiyacı ortaya çıkmaktadır.^{21,22} Tümör hücreleri damarlanma geliştirme kabiliyetini çeşitli sitokinler ve genetik faktörler ile kontrol etmektedirler.^{12,23}

PI3K/Akt/mTOR uyarı yolağı tümör hücrelerinde hipoksinin temel regülatörü olup endotel ve stromal hücrelerden de HIF-1 α ve HIF-1 α -cevaplı genlerde (VEGF gibi) artış oluşturmaktadır.^{31,32} VEGFR-2'nin tam olarak uyarılımı ancak endotel hücrelerinde ki PI3K/Akt/mTOR uyarı yolağı ile sağlanmaktadır.³³ Özellikle HIF-1 α , oksijen dengesini, glikolizis, eritropoiesis ve anjiogenezi etkileyerek cevap vermektedir.^{24,25,26}

VEGF ailesi ve onun reseptörleri tümör anjiogenezinde rol alan en önemli üyelerden biridir. VEGF, VEGF-A'den E'ye kadar 5 tane ve PLGF (placental growth faktör)-1 ve 2 olmak üzere toplam 7 tane üyeden oluşmaktadır. Reseptörleri de VEGFR 1,2 ve 3 olup VEGFR-1 ve VEGFR-2 anjiogenezi stimüle ederken VEGFR-3 lenfangiogenezi stimüle eder.⁴⁵

VEGFR-2 stimülüsü ile tirozin kinaz kaskat sistemi uyarılarak damar permabilitesini arttıran uyarılar (eNOS, NO üretimi), proliferasyon ve sağ kalım (bFGF: basic Fibroblast Growth Factor), migrasyon (ICAMs/VCAMs/ MMPs) faktörlerinde artış ile matür kan damarına differensiasyon sağlanmaktadır. Diğer taraftan da artmış kan akımı da, VEGF1 ve 2 reseptörlerinden bol miktarda mRNA üretimi de yaparak VEGF işlevini negatif yönde kontrol etmektedir.³⁴ Tümör hücreleri yeni damar oluşumunu sağlamak için VEGF gibi çeşitli büyüme faktörlerini ortama salınımını yaparken aynı zamanda da Protein Kinaz G (bir serine/threonine-spesifik protein kinaz'dır) gibi anti-VEGF özellikli maddelerin salınımını da bloke etmektedirler.²⁷

Metabolizması yüksek veya büyük boyutlu olan tümörlerin daha fazla damar varlığına gereksinimi vardır. Birçok epitelial over kanserinde VEGFR-2 aktivasyonu ve VEGF-A/VEGFR-2 uyarı yolunun tümör otokrin fonksiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir.²⁸ OBHK hücre hatlarında yapılan bir çalışmada HIF1 α ve VEGF'in 2.4-2.71 kez artmış

olduğu saptanmıştır.¹⁴ Bazı ovarian tümörler Akt/mTOR uyarı yolağı üzerinden olmadan da VEGF-A'yı uyarabilmektedir.^{45,78}

Kumar'ın preoperatif serum VEGF üzerinde yaptığı çalışma sında VEGF'in kolo-rektal kanser ilerleyişinin iyi bir göstergesi olabileceği öne sürülmüştür.²⁹ Gastrik kanserlerde yüksek VEGF izlenmesi, yüksek bir hepatik metastaz olasılığı ile beraber izlenmektedir. Gastrointestinal kanserden kaynaklanan hepatik metastazı tedavi etmek amacı ile anti-VEGF antik rları uygulanması ile başarılı sonuçlar elde edilebilmiştir.³⁰

FDA ve EMA, mTOR inhibitörlerinin böbrek hücreli karsinoma için kullanılması, VEGF-hedefli tedavi ajanı olarak kullanılan multikinaz inhibitörleri olan sorafenib ve sunitinib etkili olmadığında kullanılması için onay vermiştir.³⁵

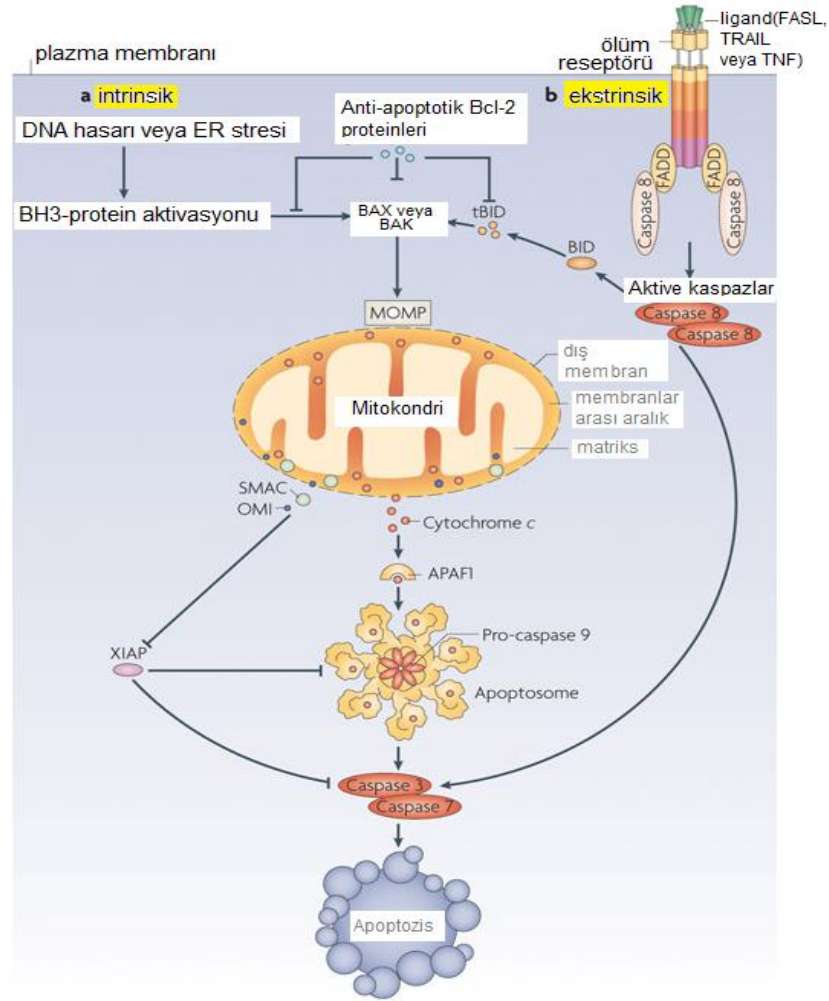
2.3-Apoptozis

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr tarafından kullanılmıştır. Yunanca dökülen yaprak anlamında olan apoptozis programlı hücre ölümü 'nü tanımlamaktadır.^{36,37}

Nekroz ise apoptozis'den tamamen farklı olup genetik kontrolü yoktur, durumsal nedenler ile oluşur ve genelde de birden çok hücreyi tutma eğilimindedir. Hücrenin zar fonksiyonlarını bozarak, hücrenin genişleyip patlaması ile sonlanan nekroza inflamatuvar bir cevapta eşlik ederken apoptozise inflamatur bir cevap eklenmez ve daima hücreleri tek tek tutmaya da meyillidir.^{38,39}

Embriyolojik dönemde parmakların arasındaki perdenin şekillendirilmesi, bağırsak epitel hücrelerinin dökülmesi veya kadınlarda menstrual siklus değişiminde endometrial hücre yıkımı apoptozisin fizyolojik örnekleridir. Normal şartlarda hücrelerin DNA hasarında da, p53 üzerinden uyarılan apoptozis ile bu hücreler ortadan kaldırılır. Aynı şekilde immün hücre seleksiyonu da apoptozisi kullanılır.¹³⁸ Çok yüksek miktardaki apoptozis atrofi ile sonuçlanırken yetersiz apoptosis'de kontrolsüz hücre çoğalması ve kanser ile beraber izlenmektedir.¹²⁷

Hücrede apoptozis iki temel mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi ölüm aktivatörlerinin hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak tetiklediği 'ölüm reseptörü yolu'dur^{140,156}(Şekil 3).



Şekil 2 : Apoptozis¹⁵⁶

Diğer yolda hücre içinde oluşturulan sinyaller ile apoptozisin geliştiği 'mitokondri yolu'dur^{140,156}(Şekil 3). Mitokondri yolunu uyaran sinyaller: radyasyon, hücre içi reaktif radikaller, ATP/ADP ve NADPH azalması, hipoksi, Ca^{++} iyon artışı, büyüme faktör eksikliği, antikanser ilaçlar ve DNA hasarını yapan faktörler gibi çok sayıdadır.^{40,41}

Apoptozisi ilerletenler (Ölüm Aktivatörleri): Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, BclXs, Noxa, Puma2'dır. Apotozisi engelleyenler ise (*Yaşam Aktivatörleri*) Bcl-2, BclXL ve Mcl-1'dir.⁴²

Kaspaz ailesi (caspaz 1-14) apoptozisin stoplazmik zincirini oluşturmaktadır. Sistein proteazlar olarak da bilinirler ve proteolitik şelale denilen art arda aktiflenerek fonksiyon görürler. Kaspazların substratları hücre siklus kontrol proteinleri, hücre iskelet proteinleri, sitokin öncüleri, sinyal iletim proteinleri, DNA-RNA metabolizmasına katılan proteinler, transkripsiyon faktörleridir.⁴³

2.4-PTEN (Fosfataz ve Tensin Homologu)

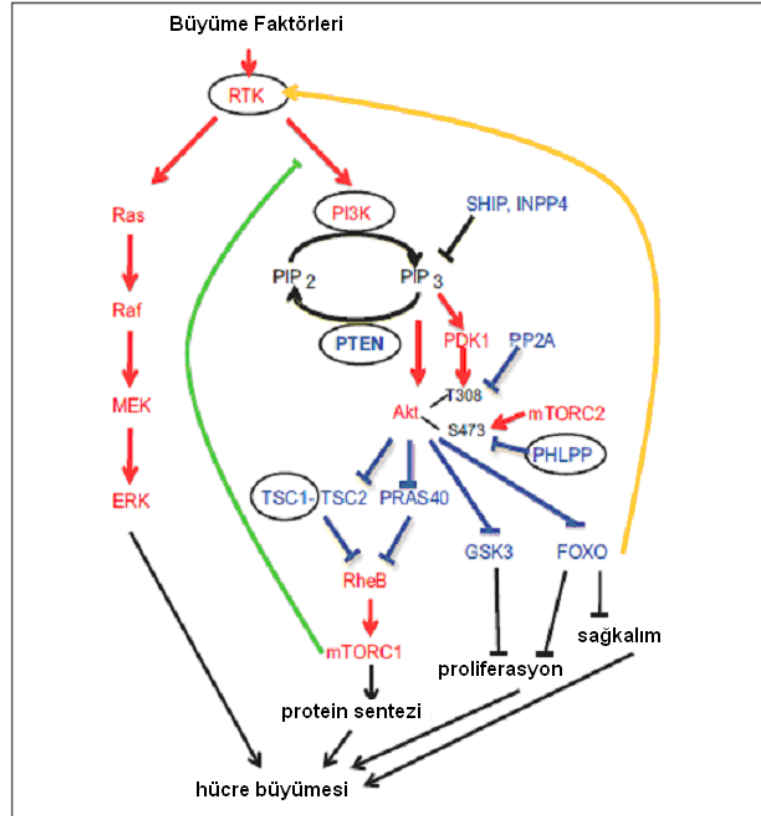
PTEN, 1997 yılında tanımlanmış olup 10q23'e yerleşmiş bir gen ile kodlanmakta olan bir fosfotazdır.¹³⁹ PTEN PI3P'ü PI2P'a defosforile eder. Bu işlem PI3K'nın tersi yönde fonksiyon olup çok önemli bir ikincil haberci olarak rol alan önemli bir yapıdır.⁴⁴ PTEN hücrede normal şartlarda da hücre büyüme ve sağ kalımı için gerekli olan Akt cevabının inhibisyonun regülasyonunu da sağlar.^{45-49,124}

Birçok çalışılan kanser hücre hattında PTEN'in fonksiyon kaybına sekonder olarak PI3K/Akt/mTOR yolağının aktive olduğu gösterilmiştir. PTEN, p53'den sonra mutasyonu en sık izlenen tümör supressörü olarak kabul edilir.⁵¹ PTEN'in melanoma, glial tümörler, prostat, meme, tiroid, akciğer, endometrial ve hepatosellüler karsinomlar gibi bazı kanserlerde mutasyon sıklığı çok yüksek olup yaklaşık %50 oranında izlenebilmektedir.⁵⁰

Tümörlerde PTEN özellikle LOH ile inaktivedir. Ayrıca PTEN metilasyon, mikroRNA ve nükleer membranındaki delokalizasyonu ile de inaktive olabilmektedir.^{51,94,154}

EGR-1(Early Growth Regulated Transcription Factor-1), PPAR-γ(Peroxisome Proliferator-activated receptor-γ), p53, SPYR-2(Human sprouty homolog-2) ve Resistin, PTEN transkripsiyonunu pozitif yönde regüle etmektedir. PTEN transkripsiyonunu negatif yönde regüle edenler ise; mitogen activated protein kinase kinase-4 (MKK4), transforming growth factor (TGF), proto-onkojenik transkripsiyon faktör'lerdir.^{48,51,126}

PTEN'in fonksiyonunun önemli bir göstergesi de PTEN'in hücre içi lokalizasyonudur. İmmünohistokimyasal olarak gösterilen Nükleer/ Stoplazmik PTEN miktarında artış tümör hücreler ile kıyaslanınca normal hücrelerde daha belirgindir ve tümöral hücrelerin differansiasyonu ile de değişiklik göstermektedir.⁵³ Nükleer PTEN miktarın da immünohistokimyasal olarak saptanan artış PTEN ilişkili tümör supressör etki, azalmış nükleer PTEN miktarının da artmış tümör progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁵⁴

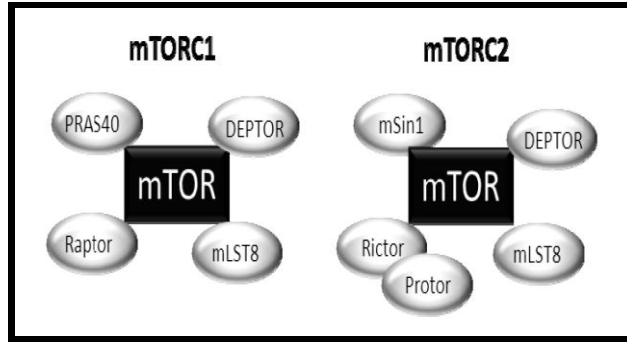


Şekil 3 : PI3K-Akt yolağı ve PTEN denetlenimi⁵¹

PTEN regölasyonunda iki tane temel feed-back mekanizması izlenmektedir; Bunlardan bir tanesi mTORC1 aktivasyonu sonucu IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1)'de transkripsiyonel represyon ve inhibitör fosforilasyon oluşturarak sonrasındaki PI3K-Akt uyarılımını azaltmaktadır (şekil 3, yeşil renkte izlenen hat). Bu feed-back mekanizmasını Rapamisin mTORC1 inhibisyonu ile bloke etmektedir.⁵¹ Diğer inhibisyon mekanizması ise; FOXO uyarılı negatif feed-back (şekil3, turuncu renk) olup bu da RTK (reseptör tirozin kinaz) inhibisyonu yapmaktadır^{51,45}

2.5-mTOR Yapısı ve Aktivasyonu

mTOR; (**m**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin) 289kDa ağırlığında bir serin/threonin kinaz olup PI3K-ilişkili kinaz (PIKK) ailesinin bir üyesidir.⁵⁵ mTOR yolağı hücrede büyüme ve gelişme için temel olup hücre proliferasyonu, angiogenezis, DNA hasar kontrol basamakları, telomer uzunluğunun yönetimi, translasyon, transkripsiyon, mRNA döngüsü, protein stabilitesi, aktin iskelet organizasyonu, angiogenez ve otofaji gibi çok sayıda önemli fonksiyonları düzenlemektedir.^{55,56}

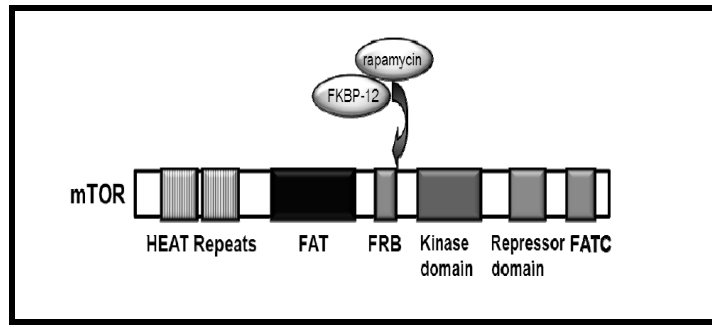


Şekil 4 : mTOR komplekslerinin yapısı⁵⁷

Memelilerde TOR, mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki farklı TOR kompleksinden oluşmaktadır. **mTORC1**; *mTOR katalitik subuniti* ve *raptor (regulatory associated protein of mTOR)* ve *mLST8* (aynı zamanda *GβL* olarak bilinir) olarak bilinen ilişkili proteinlerden oluşmaktadır. **mTORC2**; *mTOR*, *mLST8/GβL*, *rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR)* ve *mSin1*(mitogen-activated-protein kinase ilişkili protein-1 olarak da bilinen)'den oluşan subunitlerden oluşmaktadır^{45,55} (Şekil 4).

mTORC1 kompleksinin normal ve tümöral hücrelerde önemli bir kompleks olduğu gösterilmiş olmasına rağmen mTORC2'nin rolü tam olarak bilinmemektedir.⁵⁸

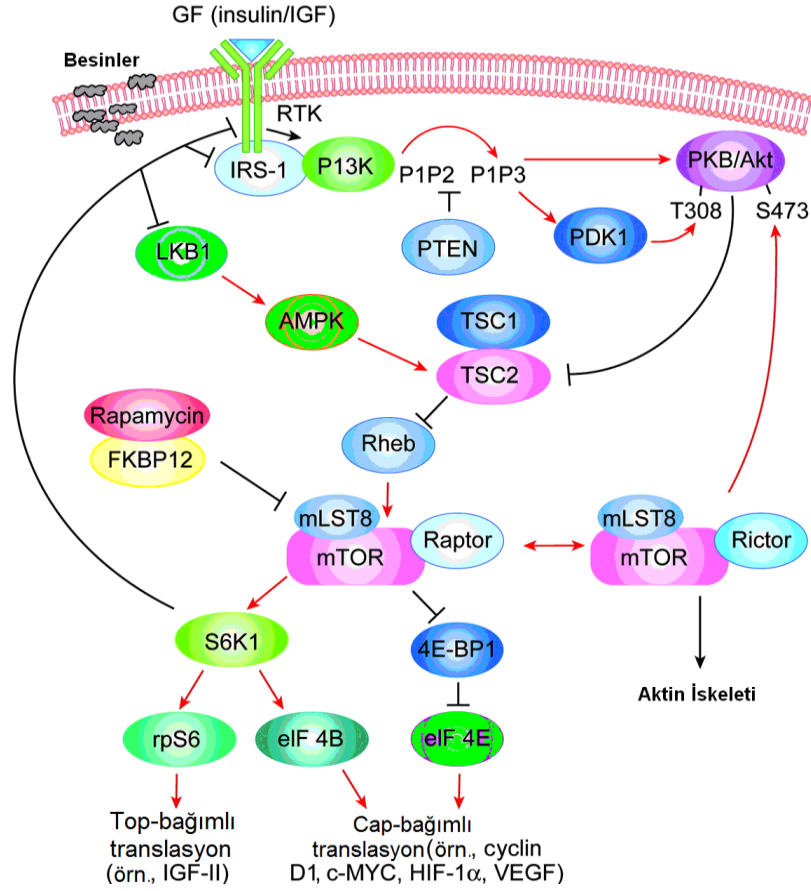
Rapamisin, FKBP-12 ile etkileşerek oluşturduğu inhibitör kompleks'i mTORC1'i inhibe ederken mTORC2'ni etkilememektedir(Şekil 5). Bu yüzden mTORC1 kompleksi rapamisin-duyarlı iken mTORC2 duyarlı değildir. Aynı şekilde besinsel maddelerinin uyarılarının hissedilmesine karşı mTORC1 duyarlı iken, mTORC2 duyarlı değildir.^{35,45}



Şekil 5 : mTOR'un yapısı-FRB domaini Rapamycin-FKB-12 inhibitör kompleksine kuvvetli afinite gösteren alan içerir.⁵⁷

mTOR'un fonksiyonun regülasyonunda mTOR öncesinde veya sonrasında yer alan çok sayıda denetleyici basamak mevcuttur. Ana hatları ile denetleme yapısı: Reseptör Tirozin Kinaz'ın mitojen uyarımı sonrası PI3K ve Akt aktive olmaktadır. Akt T308'de, PDK1 ile ve mTORC2 (rictor) ile de S478'de fosforile edilmekte ve böylece tam aktivasyonu ile TSC2' yi fosforile etmekte, bu da Rheb GTPaz ve mTORC1(raptor) aktivasyonuna yol açmaktadır. Enerji-hassas yolak (örneğin aminoasitler ve ATP üzerinden) LKB1 üzerinden mTOR'a bağlanır. LKB1, AMPK'yi aktive ederek TSC1 ve 2'yi aktive eder ve mTORC1'ü inhibe eder.

mTORC1 aktivasyonu S6K1 ve 4E-BP1'ü fosforiller ve 4E-BP1'ün, eIF-4E'den ayrılmasını sağlar. Bu durum geriye dönük olarak 5'-cap-bağımlı mRNA(5'-CAP) ve 5'-terminal oligoprimidine (5'-TOP) mRNA translasyonunu uyarmaktadır ^{147,155}(Şekil 6).



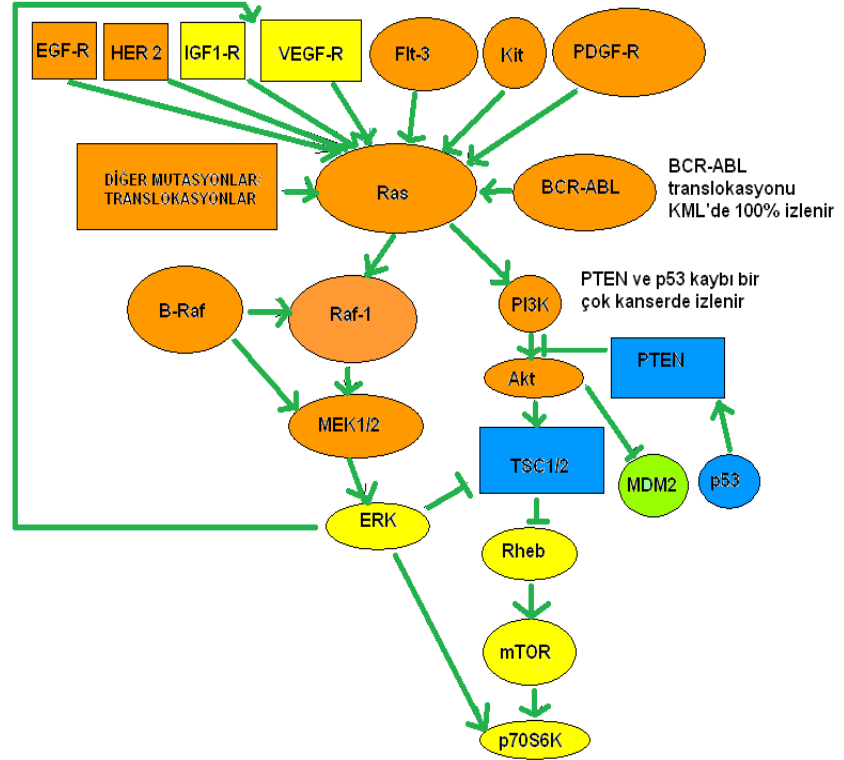
Şekil 6 : mTOR denetleme basamakları¹⁴⁸

2.5.1. mTOR'un Üst Uyarı Basamakları :

2.5.1.1. PI3K/AKT Uyarı Yolağı:

Reseptör Tirozin Kinazlar(RTK), PI3K'nı Protein Kinaz-C (PKC), SHP1, Rho ve Src gibi proteinler üzerinden aktive ederler. PI3K Aktivasyonu ile PI(4)P ve PI(4,5)P₂'yi, sırasıyla PI(3,4)P₂ ve PI(3,4,5)P₃'e fosforiller.²⁰ PTEN ise fosfotaz PI(3,4,5)P₃'nü tekrar geriye PI(4,5)P₂'ne defosforile ederek reseptör tirozin kinaz ve PI3K aracılı PDK ve Akt'ye uyarı iletimini antogonize eder. Bu yüzden PI3K aktivasyonu ve PTEN mutasyonu kanserlerde sık izlenen bir bulgudur⁵⁹ (Şekil 6).

Akt'nin tam aktivasyonu daha sonra, TSC1 ve TSC2'ni inhibe ederek mTOR ve alt hedefleri aktive eder.⁶⁷ p53, PI3K/Akt/mTOR yolağında, PTEN aktivitesini pozitif olarak artırır.¹⁴³



Şekil 7 : Ras/mTOR yolağı¹⁴¹

2.5.1.2. Ras/Raf/MEK/ERK Uyarı Yolağı:

Ras proteinleri (*H-Ras*, *K-Ras* ve *N-Ras*), GDP/GTP ayarlı bir anahtar gibi fonksiyon gören önemli bir onkoproteinlerdir. Ras/MAPK yolağı TSC(Tuberous Sclerosis)'i hedeflemektedir. Normal bir hücredeki, Ras GDP bağlıdır ve inaktiftir. Büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler tarafından aktive olup Raf kinazları aktive eder.⁶¹

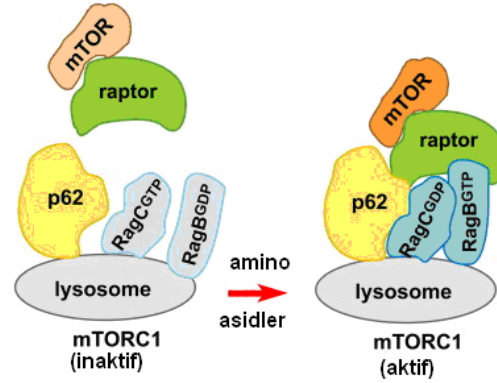
Memeli hücrelerinde Raf serine/threonin kinazlarının da A-Raf, B-Raf ve C-Raf(RAF1) olmak üzere üç farklı izoformu vardır. A-Raf ve B-Raf bazı dokular ile sınırlı ekspresyon sergilerken C-Raf tüm hücre ve dokulardan ekspresse edilmektedir. Aktivasyondan sonra Raf hücrede proliferasyona yol açar¹⁴¹(şekil 7). TSC1 (aynı zamanda *hamartin* olarak da bilinir) ve TSC2 (aynı zamanda *tuberin* olarak da bilinir) aktivasyonu mTORC1'nin negatif regülasyonu ile sonuçlanmaktadır.⁶² Tümörlerde çok sayıda Ras ve Raf mutasyonu veya aberasyonu izlenmektedir.⁶³

2.5.1.3. AMPK ve Diğer Moleküller:

mTOR aktivasyonunda ayrıca besinler de önemli rol almaktadır. Amino asid açlığı hızla mTOR'un alt basamaklarında rol alan, S6K1 ve 4E-BP1 defosforilasyonu yapmakta iken ortama yeniden amino asitlerin eklenmesi de S6K1 ve 4E-BP1 fosforilasyonunu sağlamaktadır (Şekil 8). Besinler TOR uyarı yolağını ATP enerji yolağı, AMP-Aktive Protein Kinaz(AMPK) aktivitesi ATP/AMP dengesi ile regüle etmektedir. Aktive AMPK, TSC2 üzerinden mTOR inaktivasyonu gerçekleştirir.⁵⁵

2.5.1.4. Diğer Etkenler:

Birçok çevresel stres de mTOR uyarı yolağını regüle etmektedir. Örneğin hipoksi ve DNA hasarı mTOR aktivitesini azalma yönünde regüle etmektedir.⁶⁴ Hipoksi sonrası salınan HIF1, REDD1 ve REDD2'nin her ikisinin de artışına yol açarak ters yönde TSC1 ve TSC2 üzerinden mTORC1'un uyarı ve protein sentezinin inhibisyonunu gerçekleştirmektedir.^{55,65}



Şekil 8 : mTORC1'in aminoasitler ile aktivasyonu⁷¹

2.5.2. mTOR Alt Uyarı Basamakları

mTORC1 yolağı, kendi alt düzenleyicileri olan 4E-BP1 ve p70S6K1 ile hücre büyümesini regüle etmektedir.⁵⁵ Everolimus S6K1 ve 4E-BP1 aktivasyonunu da önleyerek hücrenin büyümesi, proliferasyonu ve G1-S geçişi inhibe edilir ve apoptozisi uyarılmaktadır.^{76,77}

2.5.2.1. 4E-BP1:

4E-BP1 (*Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein1*), eIF4F (*Eukaryotik translation initiation factor*)'in mRNA cap bağlayıcı subuniti ile ilişkili protein translasyonunun başlamasını inhibe eder. mTOR direk olarak 4E-BP1 aktivitesini fosforilleyerek inhibe eder. Rapamisin ile mTOR aktivasyonunun inhibisyonu, protein translasyonunu önleyen 4E-BP1'nun defosforilasyonuna yol açar.⁶⁶ mTOR inhibisyonu ribozom biyosentezinde downregülasyona yol açarak ve otofaji gibi katabolik olayların üst düzenlenimini sağlar ki bu durum açlık durumuna temel adaptasyon ve hayatta kalmak için gereklidir.^{55,67}

2.5.2.1. P70S6K1:

mTOR'un inhibe ettiği diğer önemli bir molekülde, Serin/threonin kinaz olan p70S6K1(70-kDa ribozomal protein S6 kinaz 1: S6K1)'dır. p70S6K1'nin hedefleri; ribozomal proteinleri, uzama faktörlerini ve Insulin Growth Faktor 2 (IGF1)'ni içermektedir.⁵⁵

p70S6K, hücrede protein sentezinin potent regülatörü olup hücre büyümesinde kritik rol oynamaktadır. p70S6K1, HIF-1 ve VEGF ekspresyonu yanında bunların, üst yolaklarında yer alan PI3K/AKT ve ERK üzerinden de etkileyerek hücre proliferasyonuna, tümör büyümesine ve angiogeneze etkilerini dengeleyen önemli bir moleküldür.^{59,68}

Klinik kanser araştırmalarında birçok onkojenik yolak etkilerini mTOR üzerinden göstermektedir ve mTOR uyarı yolağının altında çalışan hedeflerden bazılarının da da prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır. P70S6K1'nin aktivasyonu veya overekspresyonu çeşitli tümör hatlarında ve aynı zamanda da bazı meme kanserlerinde de gösterilmiş olup etki özellikle tümör angiogenezi ve invazyon yeteneği ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir.^{129,142}

2.5.3. mTOR ile İlişkili Diğer Moleküller:

mTOR inhibitörleri hücre siklus ilerleyişini ve hücre proliferasyonunu, CDK4 (Cyclin Dependent Kinase-4)-cyclin D1 kompleksi üzerinden de engellerler.⁷¹ mTOR inhibitörleri tarafından CDK4-cyclin D1 kompleksin'de azalma da aynı zamanda Rb fosforilasyonunu inhibe etmesi mTOR'un G1-S geçişinin regülasyonu'ndaki önemli rolünü göstermektedir. Bu yüzden mTOR'un rapamisin tarafından inhibisyonu hem sitostatik ve hem de hücre sağ kalım cevaplarını aktive etmektedir.

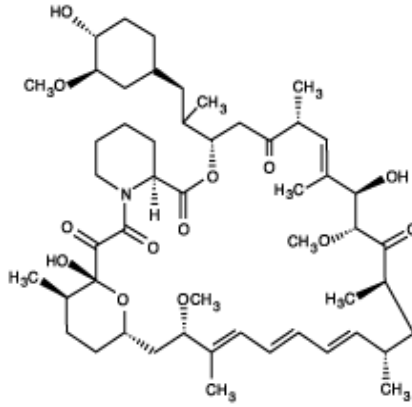
mTOR diğerk taraftan da polimeraz(pol) I ve III fonksiyonu üzerinden RNA transkripsiyonunda hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyeler üzerinden protein sentezini regüle ederler⁴⁵

p53 ile mTOR uyarı yolağının da çok sıkı ilişkisi vardır. p53 yolağı DNA hasarı veya hipoksi gibi hücresel stres uyarıları ile aktive olurlar ve hücrede hücre siklusunda durma veya apoptozis ile sonuçlanan yolu geliştirir. p53 aktivasyonuna bağılı olarak mTOR aktivitesi baskılanır.⁶⁰ Bu yüzden p53 inaktivasyonu da, TSC1-TSC2 inhibisyonu yaparak ile mTOR aktivasyonuna yol açmaktadır.¹⁴³

Matrix Metalloproteinazları (MMP-2 ve MMP-9) ile kollajen tipIV'nin degradasyonu ve bazal membranın yıkılmasının da mTOR bağımlı yolak ile regüle olduğı gösterilmiştir.⁶⁹ Phospholipaz-D (PLD), PI3K'den bağımsız olarak mTOR'u stimüle ettiğı ve hem invazyon hem de tümör hücrelerinin migrasyonunda etkileri gösterilmiştir.⁷⁰

2.6. mTOR İnhibitörleri ve Everolimus

Rapamisin, 1975 yılında Pasifik Okyanusundaki Rapa Nui adasında *Streptomyces hygroscopicus*'dan elde edilmiş, 914.2 kDa ağırlığında bir bakteriel makroliddir^{45,72}. Aslında immünosupressif özellikleri olan bir antifungaldir ve bu etkisi nedeni ile ilk başta böbrek transplantasyonlarında kullanılmış olup sonradan da antitümör etkisi saptanmıştır. Rapalog olarak bilinen çok sayıda yapısal deriveleri elde edilmiştir. Everolimus®/Novartis(RAD001), Temirolimus®/Wyeth ve AP-23573®/Ariad bilinen rapaloglar (Şekil 9-10) olup bunların çok sayıda faz I ve II klinik çalışmaları devam etmektedir.^{45,73,74}

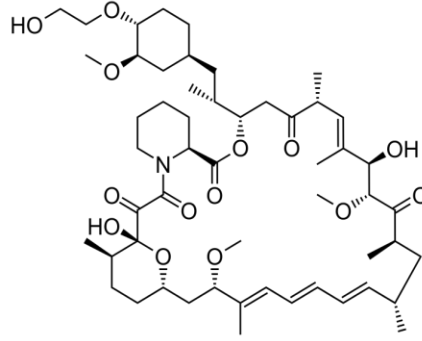


Şekil 9 : Rapamisinin yapısı¹⁵⁸

Everolimus® (RAD001), mTOR aktivasyonunu mTOR'un inhibitör kompleksi olan FKBP-12 (FK506 binding protein-12)'ye bağlanarak inhibe etmektedir. Sonuçta oluşan kompleks, mTOR aktivitesini bloke etmektedir.^{58,130}

Everolimus, mTOR tarafından uyarılan S6K1 ve 4E-BP1 aktivasyonu bloke edilerek; hücre büyümesini, proliferasyonunu ve G1-S geçişini inhibe ederken apoptozisi de uyarmaktadır.^{76,77} Everolimus direk

olarak da kanser hücrelerini büyüme ve çoğalmasını engellerken insan xenograft tümöründe de gösterildiği üzere endotel hücrelerinin proliferasyonunu önleyerek anjiogenezisi de inhibe etmektedir⁷⁵



Şekil 10 : Everolimusun yapısı¹⁵⁹

Rapaloglar *in vitro* olarak HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) inhibisyonu ve kültüre tümör hücrelerindeki VEGF ve HIF-1 ekspresyonunu azalttığı ve çeşitli deneysel tümör modellerinde de kan damar dansitesini düşürdüğü gösterilmiştir.¹³¹ Everolimus'un solid tümörler üzerindeki antitümör aktivitesi antivasküler ve antianjiogenik fonksiyonun da önemli katkısı olmaktadır.³²

Everolimus *in vitro* olarak birçok memeli tümör hattında büyümeyi inhibe ederken tek başına kullanımı ile hücre ölümü tam olarak izlenememektedir³⁵ Çok sayıda çalışmada mTOR inhibitörlerinin *in vivo* olarak kemoteropatik ajanlara karşı tümör duyarlılığını arttırdığı da gözlenmiştir.^{66,79,80} Ancak 48 farklı histotipi bulunduran hücre hattında yapılan bir çalışmada gösterildiği üzere everolimus'un etkisi sabit bir yapıda olmadan geniş bir IC₅₀ değeri verdiği izlenmektedir.³⁵

3-GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, ATCC'den sağlanan insan over berrak hücreli karsinoma hücre hattı olan ES-2/CRL-1978® 'de Everolimus'un tek başına ve taxol ile birlikte, doz ve süreye bağımlı olarak uygulanması sonrasında, meydana gelen apoptotik etkiler, genomik ve transkripsiyonel (mRNA) düzeylerde belirlendi.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1.Hücre Kültürü

Bu çalışmada, ATCC'den sağlanan insan over berrak hücreli karsinoma hücre hattı olan ES-2/CRL-1978® hücre hattı Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)'li besiyerinde kültüre edildi.

3.1.2.Kullanılan Cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf, Danimarka)
- Karbondioksitli etüv (Sanyo, Japonya)
- Invert mikroskop (Zeiss, Almanya)
- Işık mikroskobu (DCM 4000, Leicia, Almanya)
- LightCycler Real-Time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (SpectraMax M3, Molecular Devices, ABD)
- Mastercycler Ep Gradient otomatik ısı döngü cihazı (Eppendorf, ABD)
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Olympus BX-50, Japonya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific, ABD)

- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)
- Mikropipetler, 10µL, 100µL, 100µL (Bt10, Bt100, Bt1000 Biohit, CLP, ABD)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

3.1.3.Kullanılan Sarflar

- Hücre üreme flaskları, 25cm² ve 75cm² (Corning, ABD)
- Petriler, 35mm, 60mm ve 100mm (Corning, ABD)
- Hücre kryo (dondurma) ampülü (Greiner, Almanya)
- Kültür tüpleri (Corning, ABD)
- Mikrosantrifüj tüpleri (CLP, Almanya)

3.1.4.Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Everolimus(Sigma, ABD)
- Taxol (Eczacıbaşı, Türkiye)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Ambresco, ABD)
- McCoy's 5A besiyeri (HyClone, Thermo, ABD)
- Fetal sıçır serumu (FCS) (inaktif) (HyClone, Thermo, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (HyClone, Thermo, ABD)
- Glutamin (HyClone, Thermo, ABD)
- Tripsin-EDTA (HyClone, Thermo, ABD)
- Akridin Oranj (Sigma, ABD)
- Etidyum Bromür (Sigma, ABD)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Roche, Almanya)

- Primer (PTEN, mTOR, VEGFA)
- Etanol (Sigma, ABD)

3.1.5. Kullanılan Kitler

- Cell Proliferasyon Kiti II (XTT) (Roche, Almanya)
- TaqMan Master Karışımı (Roche, Almanya)
- Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya)
- High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya)

3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

3.2.1. % 10'luk McCoy's 5A Besiyerinin Hazırlanışı

450 ml McCoy's 5A besiyeri içerisine, 50 ml fetal sığır serumu (FCS), 200 mM L-glutaminden 10 ml ve son konsantrasyonu 100 IU/ml penisilin ile 100 µg/ml streptomisin olacak şekilde hazırlandı.

3.2.2. DMEM,% 1'lik Besiyerinin Hazırlanışı

DMEM (495ml)besiyeri içerisine, 5ml FCS, 200mM L-glutaminden 10ml, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin eklenerek %1' lik DMEM besiyeri hazırlandı.

3.2.3. XTT Karışımının Hazırlanması

Tek bir kuyucuk için 50İL XTT işaretleyici ajan ve 1İL elektron eşleşme ajanı kullanım öncesinde taze olarak hazırlandı.

3.2.4. 0.2M Na₂HPO₄ Çözeltisinin Hazırlanışı

1.42g Na₂HPO₄ tartılarak son hacim 50ml olacak şekilde distile su içinde çözüldü.

3.2.5. 0.1M Sitrik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı

0.96g sitrik asit tartılarak son hacim 50ml olacak şekilde distile su içinde çözüldü.

3.2.6. Fosfat-Sitrat Çözeltisinin (pH: 7.8) Hazırlanışı

0.2M Na₂HPO₄ çözeltisi ile 0.1M sitrik asit çözeltisi 48:2 oranında karıştırılarak hazırlandı. Bu amaçla, 48ml 0.2M Na₂HPO₄ çözeltisi içine 2ml 0.1M sitrik asit çözeltisi eklendi. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 7.8'e ayarlandı.

3.2.7. Nonidet %0.25 P-40 (NP-40) Çözeltisinin Hazırlanışı

25İL NP-40 alınarak son hacmi 10ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

3.2.8. 1mg/ml Proteinaz K Çözeltisinin Hazırlanışı

1mg Proteinaz K tartılıp 1ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.2.9. 1mg/ml Ribonükleaz A (RNaz A) Çözeltisinin hazırlanışı

1mg RNaz A enzimi tartılıp 1ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

3.2.10. 10X Tris Borat EDTA (TBE) Stok Çözeltisinin Hazırlanışı

Tris bazı	54g
Borik asit	27.5g
0.5M EDTA (pH: 8)	20ml

Kimyasallar bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 500ml olacak şekilde üzerine distile su eklendi.

3.2.11. 0.5 M EDTA Çözeltisinin Hazırlanışı

29.2g EDTA, 160ml distile su içerisinde çözündükten sonra son hacim distile su ile 200ml'ye tamamlandı ve pH'sı 8 olacak şekilde ayarlandı.

3.2.12. 1X Tris Borat EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanışı

50ml 10X TBE, distile su ile 500ml'ye tamamlanarak istenilen konsantrasyona seyreltili.

3.2.13. Oranj G Jel Yükleme Tamponu

55ml Gliserol, 100mg Oranj G ve 45ml 1X TBE tamponu karıştırılarak hazırlandı.

3.2.14. Stok Etidyum Bromür Boyasının Hazırlanışı

100mg etidyum bromür 10ml distile suda çözülerek hazırlandı.

3.2.15. PBS çözeltisinin hazırlanması

1.09g Na_2HPO_4 , 0.32g NaH_2PO_4 ve 9g NaCl tartılıp 800ml distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.4'e ayarlanıp son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre Kültürü

ES-2/CRL-1978 hücreleri, %10'luk McCoy's 5A besiyerinde %95 nem ve %5 CO_2 'li ortamda 37°C'de kültüre edilerek çoğaltıldı. Hücreler everolimus ile 1nM, 10nM, 100nM, 500nM ve 1000nM konsantrasyonlarda olacak şekilde ve taxol ile 5nM, 25nM, 50nM, 75nM, 100nM, 250nM, 500nM, 1000nM olacak şekilde 24, 48, 72 saat inkübe edildi. Daha sonra taxol 5 ve 25nM ile everolimus 1 ve 10nM olacak şekilde

bileşimler 48 saat inkübe edildi. DMSO çözücü kontrolü olarak kullanıldı ve aynı süre için inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yapılan analizler sonucunda everolimus ve taxol'un her bir dozdaki sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlendi. Her bir konsantrasyon için 3 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı.

3.3.2. XTT Sitotoksikite Deneyi

ES-2/CRL-1978 hücrelerinde everolimus, taxol ve everolimus + taxol bileşiminin sitotoksik etkisinin değerlendirilmesi için XTT kolorimetrik kiti kullanıldı. Aynı pasaj numarasına sahip ES-2/CRL-1978 hücreleri, hücre kültür kaplarının %70'ini kapladığında besiyerleri uzaklaştırıldı. Tripsin-EDTA karışımı kullanılarak hücrelerin tabandan ve birbirlerinden ayrılması sağlandı. Daha sonra hücreler thoma lamı ile sayıldı. Hücreler, %1 FCS içeren McCoy's 5A içerisinde (ekilen hücre sayısının sabit kalması için %1'lik FCS içeren McCoy's 5A kullanıldı) süspansiyon haline getirildikten sonra her kuyucuğa 100µL (10^4 hücre) gelecek şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi.

Hücreler 37°C ve %5 CO₂'li etüvde bir gece inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler yukarıda belirtilen dozlarda everolimus, taxol ve everolimus + taxol bileşiminin ile hazırlanmış %10'luk FCS içeren besiyerinde, 24, 48 ve 72 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Belirtilen sürelerin sonunda her bir kuyucuğa 50µL gelecek şekilde XTT karışımı eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 4 saat sonunda mikropılaka ELISA okuyucu ile 490nm dalga boyu aralığında belirlendi. Negatif kontroller sıfır absorbans değeri olarak kullanıldı.

3.3.3. Floresan Mikroskopunda Canlı /Apoptotik/ Nekrotik Hücrelerin Değerlendirilmesi

Hücre kültürlerinin sonlandırılmasını takiben hücreler 3µL akridin oranj (100µg/ml) ve 3µL etidyum bromür (100µg/ml) ile boyanarak floresans mikroskopunda apoptoz açısından değerlendirildi. Akridin oranj sadece canlı hücrelerin DNA'sına bağlandığından canlı hücreler yeşil renkte görülürken, etidyum bromür nekrotik hücrelerde kırmızı rengin oluşmasına neden oldu. Buna karşın her iki boya birlikte kullanıldığında, apoptotik hücreleri boyayarak sarı-turuncu renkte ve karakteristik apoptotik nükleus görünümünü yansıtarak apoptozun belirlenmesine olanak sağladı.

3.3.4. Hücre Kültüründen Total RNA Saflaştırılması

İnkübasyon süresi sonunda steril flasklarda ekili bulunan hücrelerden RNA izolasyonu, "High Pure RNA Isolation Kiti" kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile saflaştırma işlemi biyogüvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

- Hücrelerin üzerine 200µL PBS ve 400µL Lizis tamponu eklenip 15 saniye vortekslendi.
- Filtre, toplama tüpüne yerleştirilip tüm karışım filtre üstüne aktarıldı.
- 9000rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde toplanan sıvı atılıp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirildi.

- Her bir örnek için 90µL DNaz İnkübasyon tamponu steril tüpe alındı ve 10µL DNaz I eklendi. Pipetaj ile karıştırıldıktan sonra karışım filtrenin ortasına bırakıldı. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 500µL'lik 1. yıkama tamponu filtre üzerine eklendi ve 9000rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- 500µL'lik 2. yıkama tamponu filtre üzerine yerleştirildi ve 15 saniye 9000rpm'de santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
- 200µL'lik 3. yıkama tamponu filtre üzerine eklendi ve 3 dakika 13500rpm'de santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı. Filtre, steril 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- Filtre üzerine 20µL örnek seyrelti çözeltisi eklendi ve 9000rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılabilecek kadar -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.3.5. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak random hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: cDNA RT-PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4µL
dNTP	1mM	2µL
Random hekzamer primeri	60µM	2µL
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5µL
Transcriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	0.5µL
Total RNA	1µg	1µg olacak şekilde

cDNA için PCR karışımı ince çeperli 0.2ml'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

3.3.5.1. cDNA RT-PCR Programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Tablo 2'de belirtilen programa ayarlanarak cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi uygulandı.

Tablo 2 : Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25°C	10dk	1
Ters transkripsiyon	50°C	60dk	1
İnaktivasyon	85°C	5dk	1
Soğutma	4°C	-	1

Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri Real-Time PCR’da kullanılıncaya kadar -20°C’lik derin dondurucuda saklandı.

3.3.5.2. Genlerin İfade Edilmesinin Real-Time PCR ile Ölçümü

PTEN, mTOR ve VEGF-A genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) cihazı kullanılarak yapıldı. Amplifikasyonlar 20µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu, LightCycler TaqMan Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. PTEN, mTOR ve VEGF-A gen ifadelenmesini normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı. Göreceli gen ifade edilme sonuçları “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı.

3.3.5.3. mTOR Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

mTOR genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA’daki yerleşimleri Şekil 11’de gösterildi.

mTOR Forward 5'- TGCTGGAAGCCTTTGTCTATG-3'
mTOR Reverse 5'- CGCTTGTTGCCTTTGGTATT-3'
75 numaralı prob dizisi: 5'-GGAGGCTG-3'



Şekil 11 : mTOR mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000361445 giriş no'lu dizi) (Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır).

Şekil 12'de gösterilen primer ve problemler kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 3 : mTOR Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
mTOR Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
mTOR Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
mTOR TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
TaqMan karışımı (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

3.3.5.4. PTEN Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

PTEN Forward primer: 5'-
CGAACTGGTGTAAATGATATGTGC-3'
PTEN Reverse primer: 5'-CGCCTGTGACTGGGAATAGT -3'
60 numaralı prob dizisi: 5'- TGGGGAAG -3'

	5' -CGAACTGGTGTAAATGATATGTGC-3'	
384	GGGACGAACTGGTGTAAATGATATGTGCATATTTATTACATCGGGGCAAATTTTAAAGGC	
	5' - TGGGGAAG -3'	3' -TGATA
444	ACAAGAGGCCCTAGATTTCTATGAGGACCAGAGACAAAAAGGGAGTA	ACTAT
	AGGGTCAGTCTCCGC-5'	
504	TCCCAGTCAGAGGCGCTATGTGTATTATTATAGCTACCTGTTAAAGAATCATCTGGATTA	

Şekil 12 : PTEN mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000371953 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.

Tablo 4 : PTEN Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
PTEN Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
PTEN Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
PTEN TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
TaqMan karışımı (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

3.3.5.5. VEGF-A Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

VEGFA Forward primer: 5'-CCATATGATCGAGGACATCCA-3'

VEGFA Reverse primer: 5'-GACTCCCTCGAGTCTCCAGAT-3'

9 numaralı prob dizisi: 5'-CAGGCAGC-3'

	5' -AGTGTGTGC
767	CCTGTGTGCCCCCTGATGCGATGCGGGGGCTGCTGCAATGACGAGGGCCTGGAGTGTGTGC
	CCACTGAGGA-3' 5' -CATCACC-3' 3' -ATACGCCTAGTTTGGAGTCC-5'
827	CCACTGAGGAGTCCAAATCACCATGCAGATTATGCGGATCAAACCTCACCAAGGCCAGC

Şekil 13. VEGFA mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000372067 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.

Tablo 5 : VEGF-A Real-Time PCR tepkime karışımı

	Son Konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25mM)	4mM	1.2µL
VEGF Primer F (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
VEGF Primer R (10pmol/µL)	2.5pmol	0.25µL
VEGF TaqMan prob (100pmol/µL)	10pmol	0.1µL
TaqMan karışımı (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

3.3.5.6. Light Cycler (LC) Deney Programı

Real-Time PCR karışımları hazırlanıp 96 kuyulu tepkime ortamına yerleştirildikten sonra LC cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. PTEN, mTOR, VEGFA ve GAPDH genleri için aynı program kullanıldı.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)	
Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	95
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00dk
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10sn	20sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0

Program 3. Soğutma	
Program Verisi	Değer
Döngüler	1
Analiz Modu	-
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1
Hedef Sıcaklık (°C)	40
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0

Reaksiyon sonucu, PTEN, mTOR, VEGFA ve GAPDH genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. PTEN, mTOR, VEGFA ifade düzeyleri GAPDH ifade düzeyine göre normalize edildi.

3.3.6. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Doza ve zamana bağlı olarak değişen, PTEN, mTOR ve VEGFA mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2008 Beta V2.0.7)” istatistik programı ile karşılaştırıldı. XTT ve AO/EtBr analizi sonucunda elde edilen bulgular ise “tek yönlü Anova” testiyle karşılaştırıldı. Varyans homojenitesi Levene'nin Testi ile değerlendirildi. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4-BULGULAR

Gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, insan over berrak hücreli kanser hücre hattı olan ES-2/CRL-1978'de, everolimus'un tek başına ve taxol ile birlikte, doz ve süreye bağımlı olarak uygulanması sonrasında, meydana gelen apoptotik, genomik ve transkripsiyonel (mRNA) etkilerini araştırdık.

Everolimusun tek başına kullanılmasının hücre canlılığına etkisinin ancak çok yüksek dozlarda ve düşük oranda gerçekleştiği (Şekil 14-16, Tablo 5-8) taxol ile etkin değerlerin 25 nM ve daha yüksek yüksek ile elde edilebildiği saptandı (Şekil 17-19, Tablo 9-11). Düşük doz taxol ile beraber everolimus kombinasyonunun ise hücre canlılığını daha belirgin olarak azalttığı gösterildi (Şekil 20-23, Tablo12-15). Daha yüksek dozda taxol kullanılması ile elde edilen etkide ön plana nekrozun geçtiği bulundu (Şekil 27, Tablo 19).

Tek başına Taxol 25 nM ile elde edilen apoptozis oranlarına (Şekil 24, Tablo 16) yakın apoptozis değerlerinin taxolun 5nM gibi daha düşük değerlerinin everolimus kombinasyonları ile de elde edilebildiği saptandı (Şekil 26, Tablo 18).

Everolimusun taxola eklenmesinin, tedavide hücre canlılığını azaltması ve apoptozisi artırması yanında, VEGFA mRNA seviyesinde kontrole göre belirgin düşmeye sebep olduğu saptandı (Şekil 28-29, Tablo 20-21). Hücrede tümör supressör olarak rol alan PTEN mRNA'sının Taxol + Everolimus kombinasyon uygulanması ile azaldığı gösterilirken mTOR mRNA seviyelerinde anlamlı değişiklik saptanmadı (Şekil 28, Tablo20).

4.1. ES-2/CRL-1978 Hücrelerinin Everolimus, Taxol, ve Everolimus/Taxol Kombinasyonlarına Duyarlılığının XTT Sitotoksosite Yöntemi ile İncelenmesi:

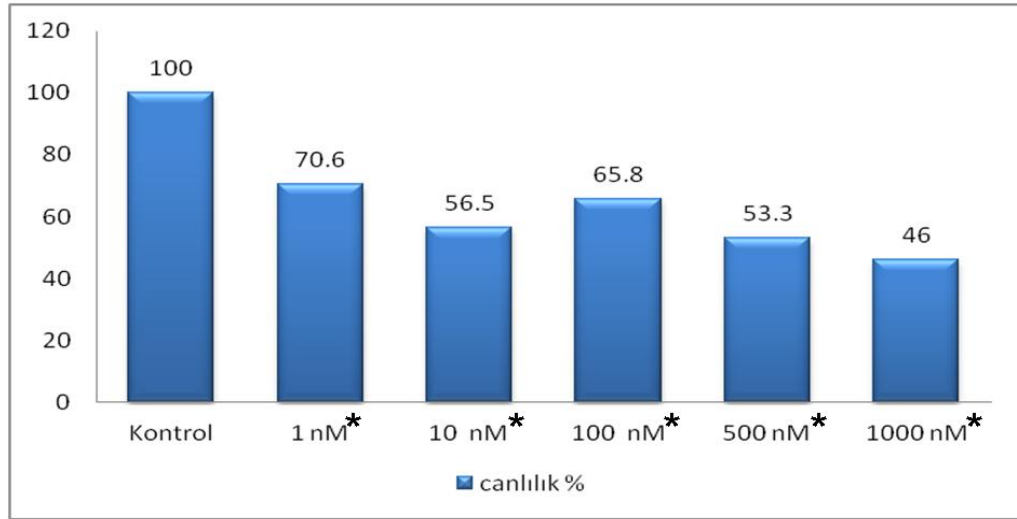
96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ES-2/CRL-1978 hücreleri ekilerek, 1-1000 nM aralığında farklı Everolimus konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat süreler ile inkübe edildi. Şekil 16'da 24 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin everolimus'a cevabı gözlenmektedir. Buna göre, en yüksek konsantrasyonda (1000 nM) hücre canlılığı %46 bulundu.

48 saat süreli inkübasyon sonucunda en yüksek konsantrasyonda hücre canlılık oranı %64.1 olarak bulundu (Şekil 15). 72 saat süreli inkübasyon sonucunda 1000 nM konsantrasyonda meydana gelen hücre canlılığı ise %65.5 olarak bulundu (Şekil 16).

Tablo 6 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Evorelimus uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

everolimus	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
kontrol	100	5.18	
1 nM	70.6	6.66	<0.001
10 nM	56.5	2.48	<0.001
100 nM	65.8	1.57	<0.001
500 nM	53.3	5.46	<0.001
1000 nM	46	3.96	<0.001

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri: 2.467 $p:0.093$



Şekil 14 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Evorelimus uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p < 0.001^*$)

Tablo 7: XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Evorelimus uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

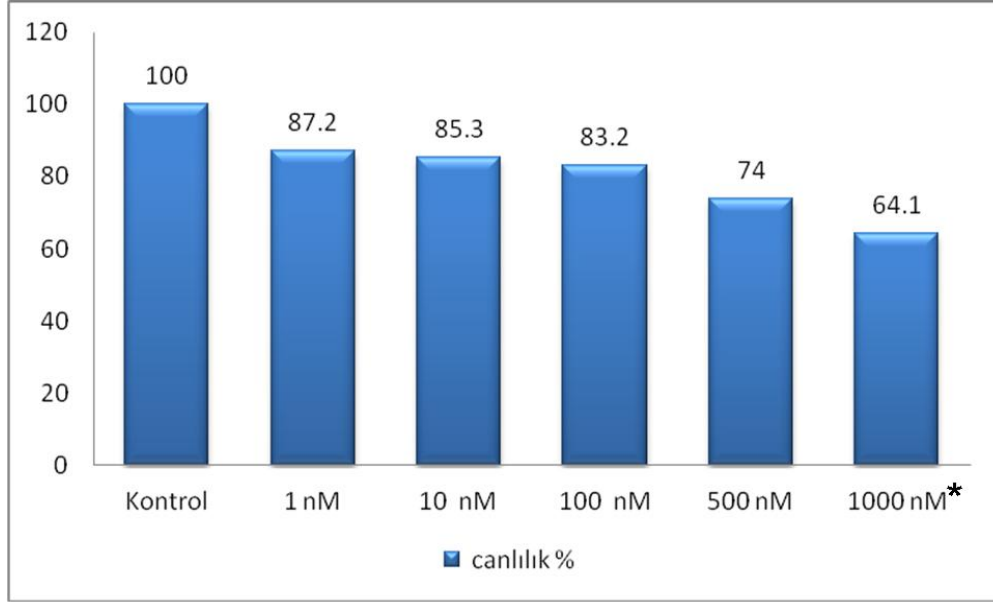
everolimus	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
kontrol	100	11.42	
1 nM	87.2	16.21	0.593
10 nM	85.3	7.67	0.457
100 nM	83.2	8.9	0.327
500 nM	74	2.89	0.053
1000 nM	64.1	3.32	0.006

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:1.108 $p:0.406$

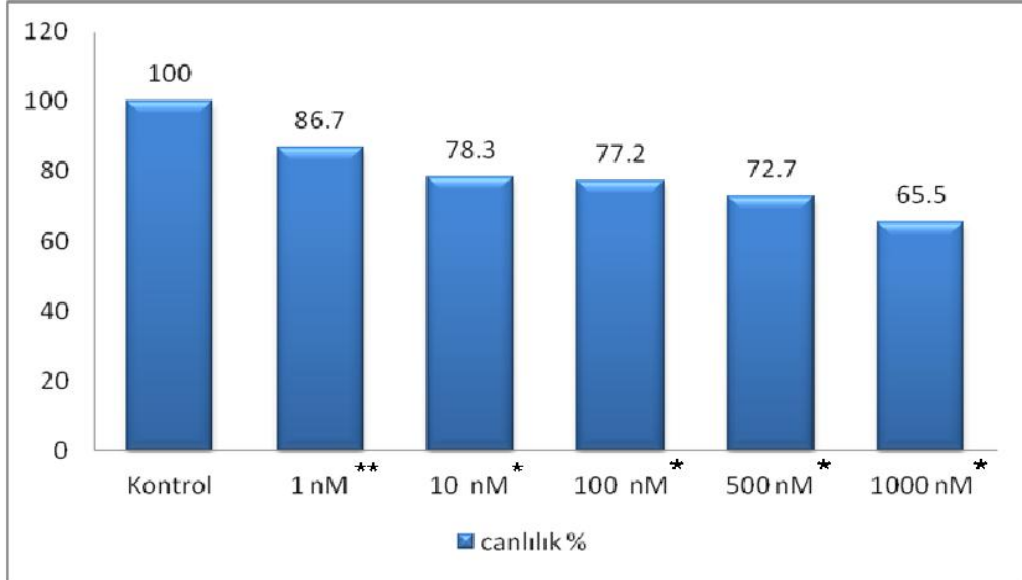
Tablo 8. XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 72 saat Evorelimus uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

everolimus	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
kontrol	100	0.89	
1 nM	86.7	2.94	<0.03
10 nM	78.3	1.95	<0.001
100 nM	77.2	6.47	<0.001
500 nM	72.7	7.15	<0.001
1000 nM	65.5	3.47	<0.001

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:1.262 $p:0.341$



Şekil 15 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Evorelimus uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p<0.05^*$)



Şekil 16 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 72 saat Evorelimus uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p<0.05^{**}$ $p<0.001^*$)

Çalışmamızda daha sonra 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ES-2/CRL-1978 hücreleri tekrar ekilerek, 1-1000 nM aralığında farklı taxol konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat süreler ile inkübe edildi.

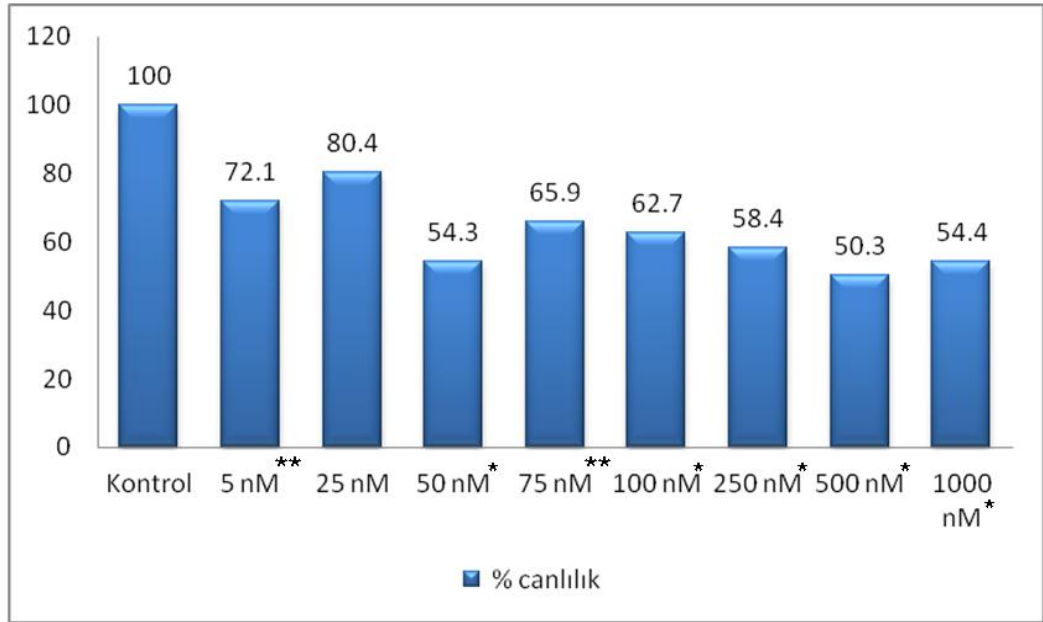
24 saatlik ölçümde hücre canlılık oranı taxol konsantrasyonu 250 nM'de %58.4 ve 500 nM'de %50.3 olarak ölçüldü (Şekil 17).

48 saatlik ölçümde ise 25 nM'de %55.9 ve 50 nM'de %36.2 olarak (Şekil 18) ve 72 saatlik ölçümlerde de 25 nM'de %47.9 ve 50 nM'de %34.9 olarak belirlendi (Şekil 19).

Tablo 9 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Taxol	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
kontrol	100	3.05	
5 nM	72.1	9.84	0.007
25 nM	80.4	3.25	0.100
50 nM	54.3	7.57	<0.001
75 nM	65.9	4.02	0.001
100 nM	62.7	7.48	<0.001
250 nM	58.4	12.29	<0.001
500 nM	50.3	10.62	<0.001
1000 nM	54.4	4.07	<0.001

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:0.827 p :0.59

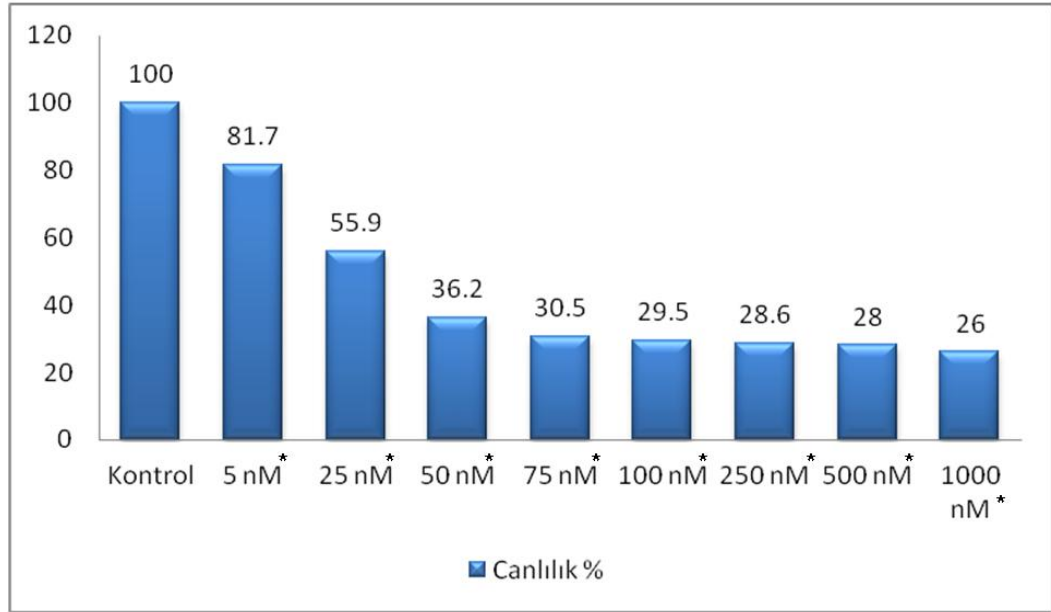


Şekil 17 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p<0.05^{**}$ $p<0.001^{*}$)

Tablo 10 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Taxol	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
kontrol	100	5.37	
5 nM	81.7	2.20	<0.001
25 nM	55.9	4.98	<0.001
50 nM	36.2	3.92	<0.001
75 nM	30.5	2.14	<0.001
100 nM	29.5	0.57	<0.001
250 nM	28.6	7.25	<0.001
500 nM	28	3.32	<0.001
1000 nM	26	1.29	<0.001

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:1.155 $p:0.377$

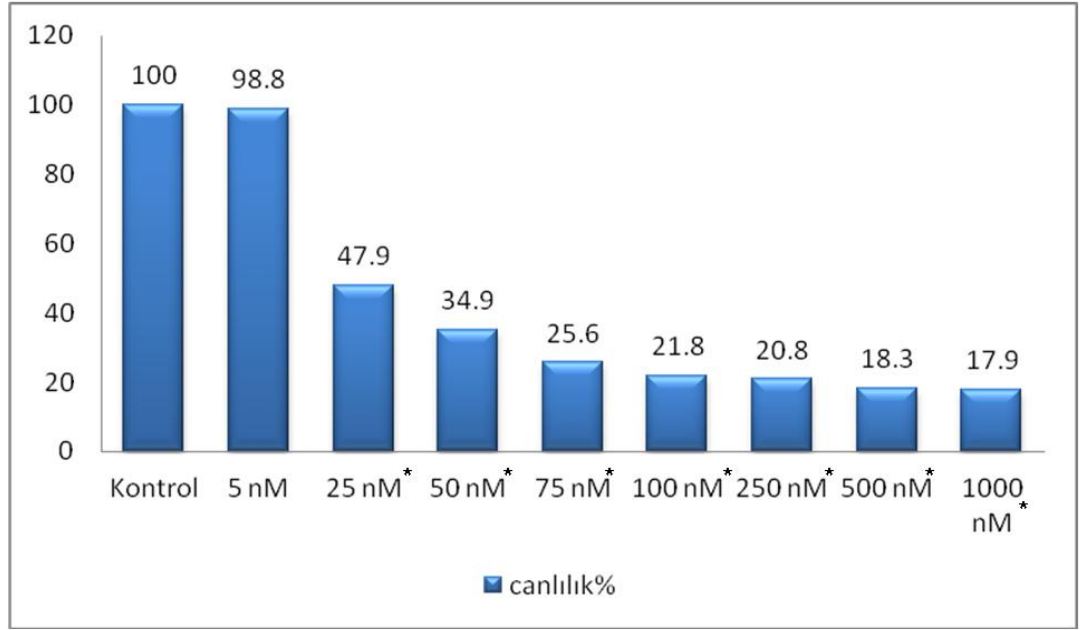


Şekil 18 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p < 0.001^*$)

Tablo 11 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 72 saat Taxol uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Taxol	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
kontrol	100	14.30	
5 nM	98.8	4.62	1
25 nM	47.9	1.99	<0.001
50 nM	34.9	5.26	<0.001
75 nM	25.6	2.25	<0.001
100 nM	21.8	0.65	<0.001
250 nM	20.8	0.41	<0.001
500 nM	18.3	0.08	<0.001
1000 nM	17.9	0.90	<0.001

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:2.742 $p:0.36$



Şekil 19 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 72 saat Taxol uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p<0.001^*$)

XTT değerlendirmesinin en son bölümünde de taxolun everolimus ile beraber olarak etkilerinin değerlendirilebilmesi için, 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ES-2/CRL-1978 hücreleri taxol'un 5 ile ve 50 nM arasında konsantrasyonları ile everolimusun sabit olarak kullanıldığı 1 ve 10 nM konsantrasyonlarda ile kombine edilerek 24 ve 48 saat süreli inkübasyonları yapıldı (Şekil 20-23).

Everolimus 1nM + taxol 10nM kombinasyonun 24 saat süreyle kullanılmasında % 48.1 gibi bir oran elde edildi (Şekil 20). Bu oran taxolun 24 saatte tek başına 500 nM doz da yaptığı oranına (% 50.3) yakın bir orandır (Şekil 17). 48 saatlik ölçümde de everolimus 1nM + taxol 5nM kombinasyonun kullanılması ile de elde edilen % 54.8 oran, taxol'un tek

başına 25 nM dozda kullanılmasına yakın oranda (% 55.9) hücre canlılığını azaltmayı başarmıştır (Şekil 23).

Everolimus 10nM + taxol 5nM kombinasyonun kullanıldığı 48 saatlik uygulanmasın da hücre canlılığındaki %45.8 gibi bir azalma değeri (Şekil 23) elde edilmiş olup bu oran tek başına olarak taxolun 25nM ve daha yüksek dozları ile ancak elde edilebilmiştir (Şekil 20). En düşük canlılık oranı 50 nM taxol+ 10 nM everolimus ile 48 saatlik inkübasyonda, % 29 olarak saptandı (Şekil 23).

Tablo12 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 1 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

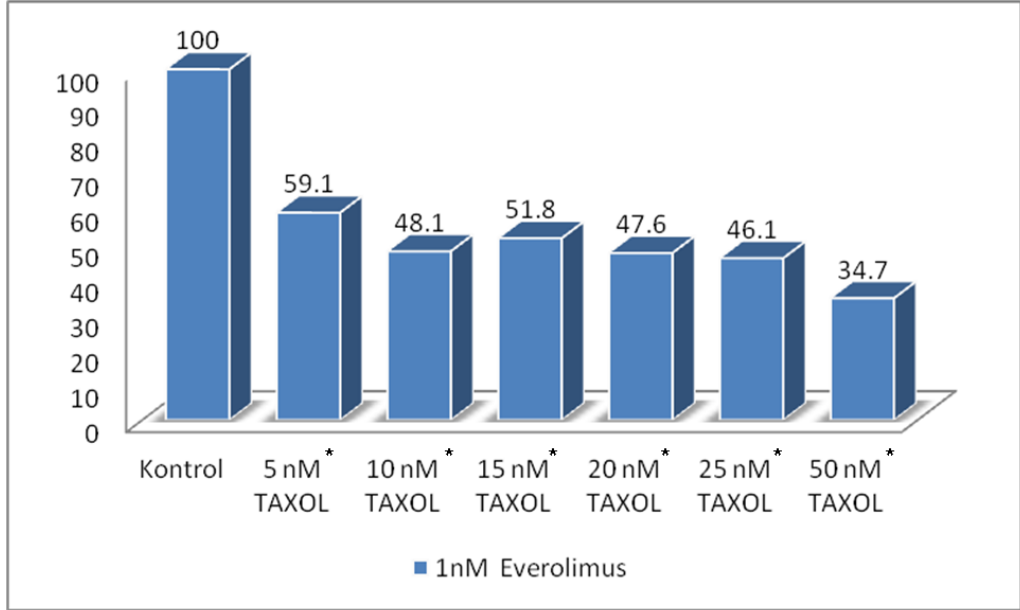
Taxol(+1 nM everolimus)	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
kontrol	100	1.74	
5 nM	59.1	4.76	<0.001
10 nM	48.1	2.92	<0.001
15 nM	51.8	2.01	<0.001
20 nM	47.6	4.93	<0.001
25 nM	46.1	2.34	<0.001
50 nM	34.7	2.21	<0.001

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:0.837 p:0.561

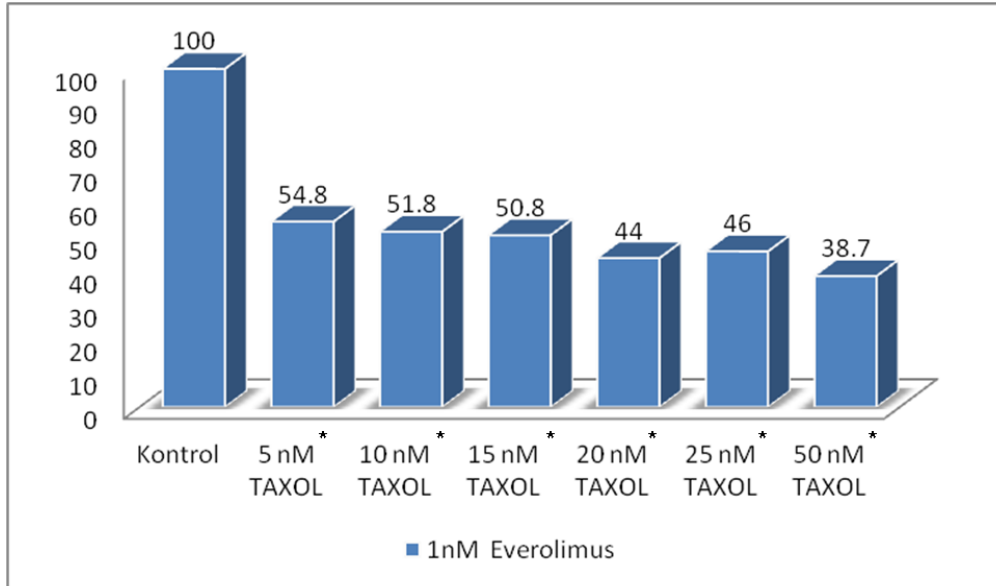
Tablo 13 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/ kuyu) 48 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 1 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

Taxol(+1 nM everolimus)	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
kontrol	100	5.21	
5 nM	54.8	0.13	<0.001
10 nM	51.8	6.10	<0.001
15 nM	50.8	5.30	<0.001
20 nM	44	3.41	<0.001
25 nM	46	4.06	<0.001
50 nM	38.7	2.53	<0.001

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:0.912 p:0.514



Şekil 20 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 1 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p<0.001^*$)

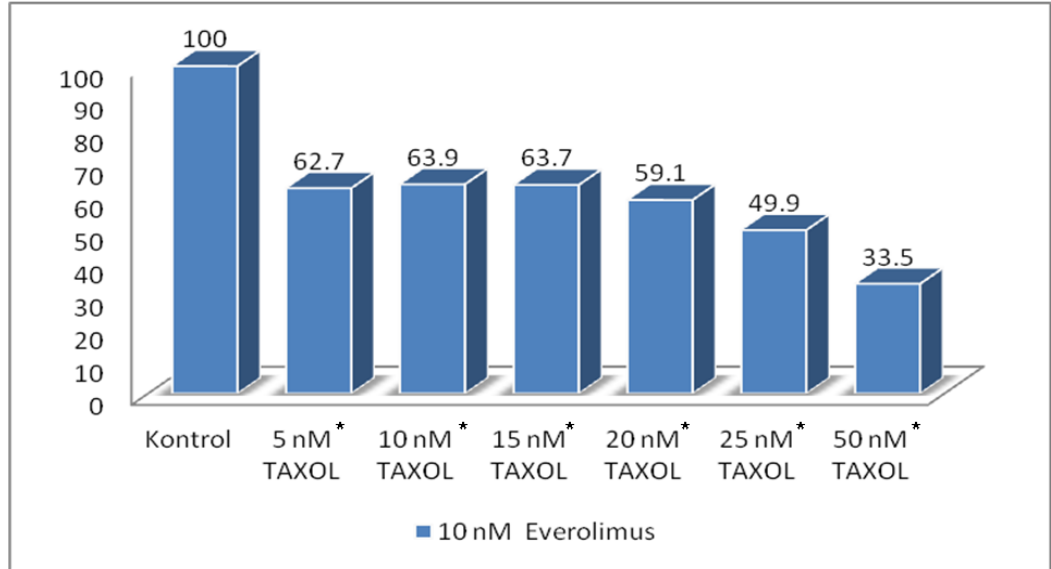


Şekil 21 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 1 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p<0.001^*$)

Tablo 14 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 10 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

taxol(+10 nM everolimus)	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
kontrol	100	1.74	
5nm	62.7	3.50	<0.001
10nm	63.9	1.54	<0.001
15nm	63.7	0.81	<0.001
20nm	59.1	2.24	<0.001
25nm	49.9	3.79	<0.001
50nm	33.5	1.46	<0.001

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:0.859 $p:0.547$

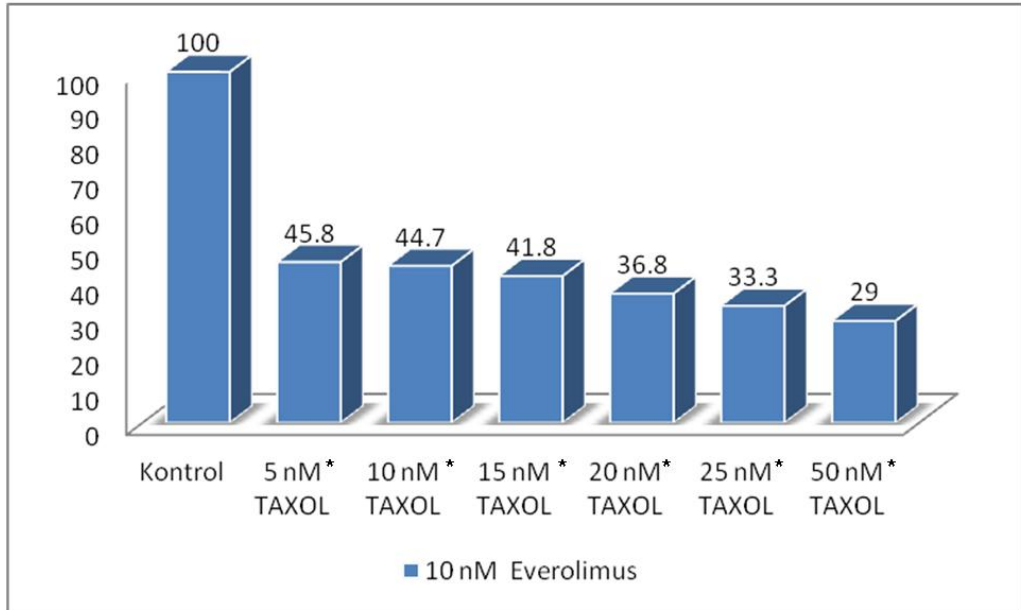


Şekil 22 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 10 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p<0.001^*$)

Tablo 15 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 10 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi

taxol(+10 nM everolimus)	hücre canlılığı	standart sapma	p değeri
Kontrol	100	5.21	
5nm	45.8	2.85	<0.001
10nm	44.7	2.37	<0.001
15nm	41.8	2.31	<0.001
20nm	36.8	0.89	<0.001
25nm	33.3	1.21	<0.001
50nm	29	0.85	<0.001

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:1.331 p:0.307



Şekil 23 : XTT testi, ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat Taxol (5-50 nM) + Everolimus 10 nM kombine uygulamasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi ($p<0.001^*$)

4.2. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EtBr) ile Canlılık/Apoptozis/ Nekroz Değerlendirilmesi:

Taxol ve everolimus'a maruz bırakılmış hücre kültürlerinin de sonlandırılmasını takiben hücreler AO / EtBr ile boyanarak floresan ataçmanlı mikroskopda apoptoz açısından değerlendirildi. Taxol'un tek başına 25 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasında % 26.6 oranında (Şekil 24) ve aynı şekilde everolimusun da 10 nM dozda tek başına 48 saat uygulamasında da % 21 gibi istatistiksel olarak anlamlı apoptozis değerleri elde edilmiştir (Şekil 25, Tablo 17).

Tablo 16 : ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Taxol 5 ve 25 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/ Nekroz üzerine olan etkisi

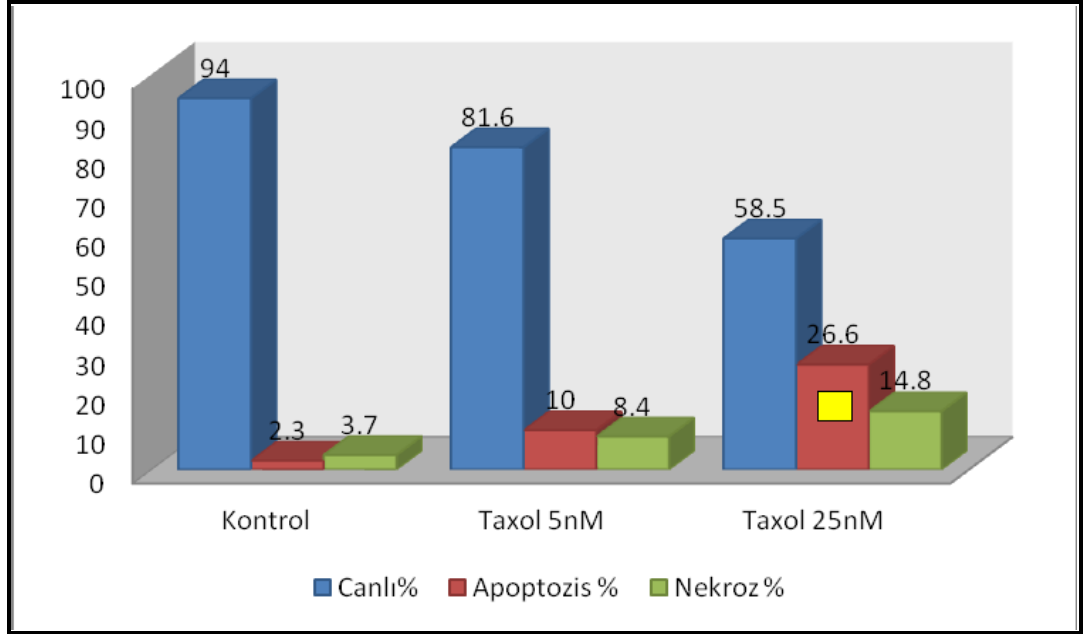
	canlı	canlı-standart sapma	apoptozis	apoptozis-standart sapma	nekroz	nekroz-standart sapma
kontrol	94	3.174905	2.3	1	3.7	2.55
t5nM	81.6	13.42	10	5.6	8.4	7.8
t25nM	58.5	12.20765	26.6	6.8	14.8	5.4

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:1.612 p:0.275

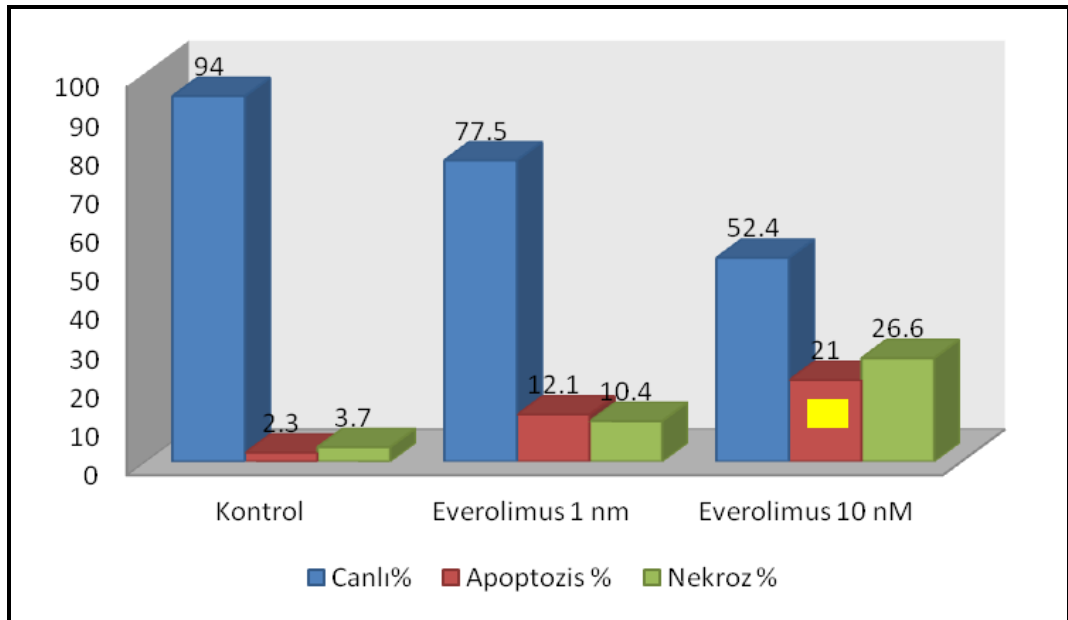
Tablo 17 : ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/ Apoptozis/ Nekroz üzerine olan etkisi

	canlı	canlı-standart sapma	apoptozis	apoptozis-standart sapma	nekroz	nekroz-standart sapma
kontrol	94	3.174905	2.3	1.0.	3.7	2.55
e1nM	77.5	3.558056	12.1	6.1	10.4	8.1
e10nM	52.4	11.77728	21	2.5	26.6	9.3

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:2.221 p:0.191



Şekil 24 : ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Taxol 5 ve 25 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/ Nekroz üzerine olan etkisi (sarı işaret: $p < 0.05$)



Şekil 25 : ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/ Apoptozis/Nekroz üzerine olan etkisi (sarı işaret: $p < 0.05$)

Taxol 5nM + everolimus 1nM ve taxol 5nM + everolimus 10nM kombinasyonları ile apoptozisde istatistiki olarak anlamlı derecede düşme belirlendi (Şekil 26, Tablo 18).

Taxolun 25nM + everolimus 1nM kombinasyonu ile de anlamlı apoptozis saptanmıştır. Taxol 25nM + everolimus 10nM kullanıldığında nekroz oranı %52 ile en yüksek değere ulaşmaktadır (Şekil 27, Tablo 19).

Tablo 18 : ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Taxol 5 nM+ Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz üzerine olan etkisi

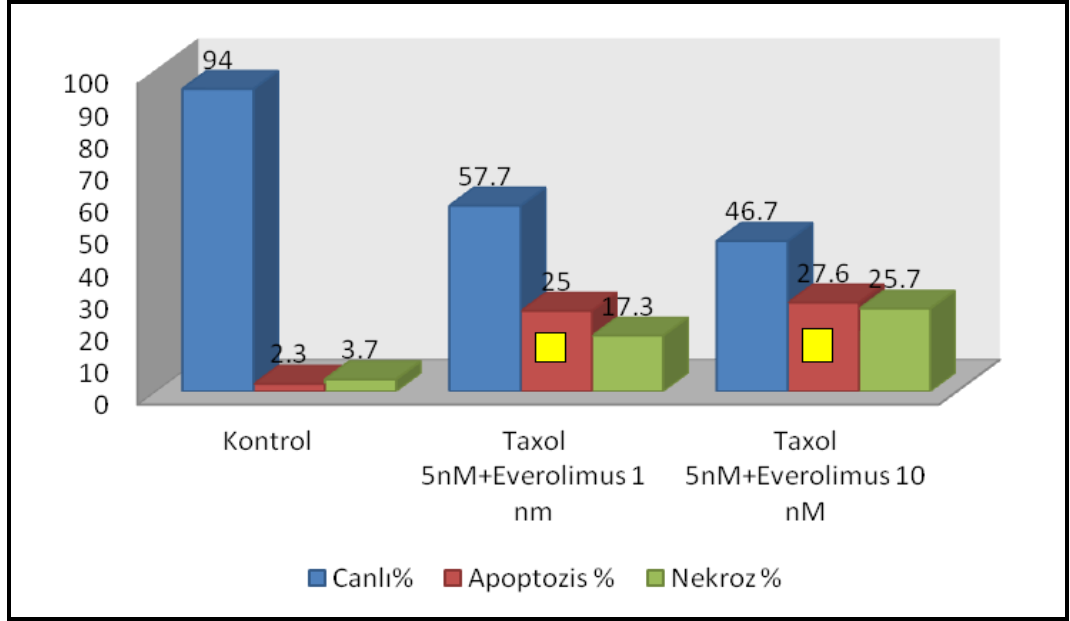
	canlı	canlı-standart sapma	apoptozis	apoptozis-standart sapma	nekroz	nekroz-standart sapma
kontrol	94	3.174905	2.3	1.0	3.7	2.55
t5+e1	57.7	6.527206	25	0.1	17.3	6.4
t5+e10	46.7	7.750226	27.6	2.9	25.7	4.9

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:2.563 p:0.157

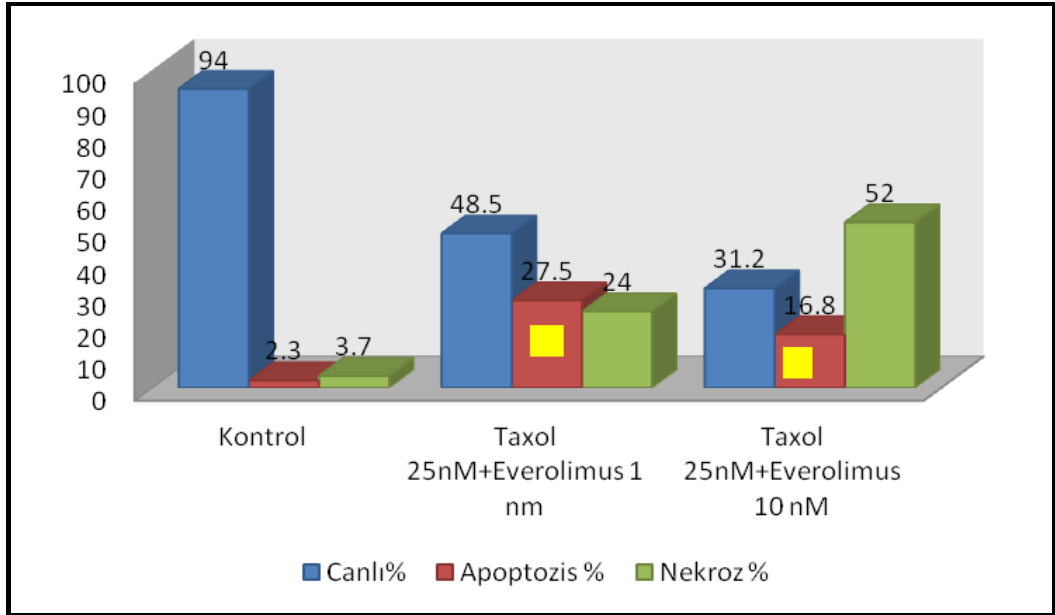
Tablo 19 : ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu)Taxol 25 nM + Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/ Apoptozis/ Nekroz üzerine olan etkisi

	canlı	canlı-standart sapma	apoptozis	apoptozis-standart sapma	nekroz	nekroz-standart sapma
kontrol	94	3.174905	2.3	1.0	3.7	2.55
t25+e1	48.5	9.356437	27.5	4.1	24	5.3
t25+e10	31.2	8.40718	16.8	1.2	52	7.2

Varyans Homojenitesi Levene İstatistik değeri:1.902 p:0.229



Şekil 26 : ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Taxol 5 nM+ Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz üzerine olan etkisi (sarı işaret: $p<0.05$)



Şekil 27 : ES-2/CRL-1978 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Taxol 25 nM+Everolimus 1 ve 10 nM konsantrasyonda 48 saat uygulamasının Hücre Canlılığı/Apoptozis/Nekroz üzerine olan etkisi (sarı işaret: $p<0.05$)

4.3. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması

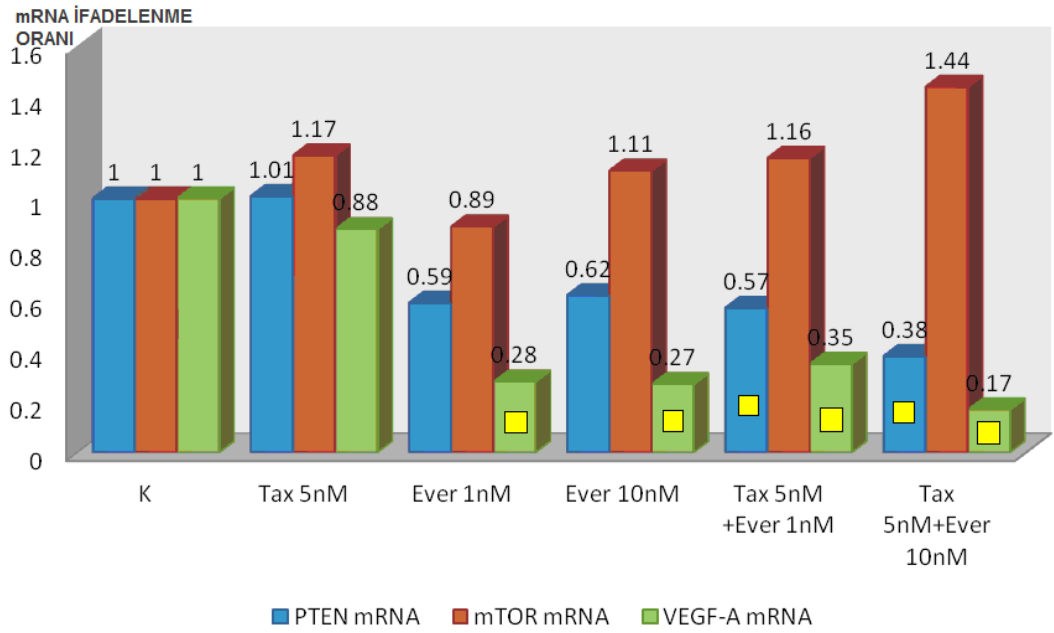
ES-2/CRL-1978 hücrelerinde sadece everolimus ve taxol kullanılması yanında bunların kombinasyonlarının farklı doz aralıklarında kullanılmaları ile PTEN, mTOR, VEGF-mRNA ifadenmesi üzerine olan etkileri değerlendirildi.

PTEN mRNA seviyesinde, taxol 5nM + everolimus 1nM ve taxol 5nM + everolimus 10nM kombinasyonlarının kullanılması ile istatistiki olarak anlamlı düşme izlendi (Şekil 28). PTEN mRNA ve VEGF mRNA seviyelerindeki en fazla düşmenin taxolun 5nM + everolimus 10nM dozlarında beraber kullanımı ile saptandı (Şekil 28).

Tablo 20 : Taxol 5nM+Everolimus 1nM-10nM uygulanmasında PTEN, mTOR, VEGF-mRNA ifadenmesi

	PTEN	standart sapma	mTOR	standart sapma	VEGF	standart sapma
kontrol	1	0.02	1	0.02	1	0.02
tax5	1.01	0.11	1.17	0.19	0.88	0.12
ever1	0.59	0.04	0.89	0.11	0.28	0.03
ever10	0.62	0.09	1.11	0.21	0.27	0.02
tax5+ever1	0.57	0.03	1.16	0.17	0.35	0.01
tax5+ever10	0.38	0.02	1.44	0.15	0.17	0.001

mTORMRNA seviyelerinde ise kombinasyonların kullanılmasında artış izlendi. Ancak bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 28).

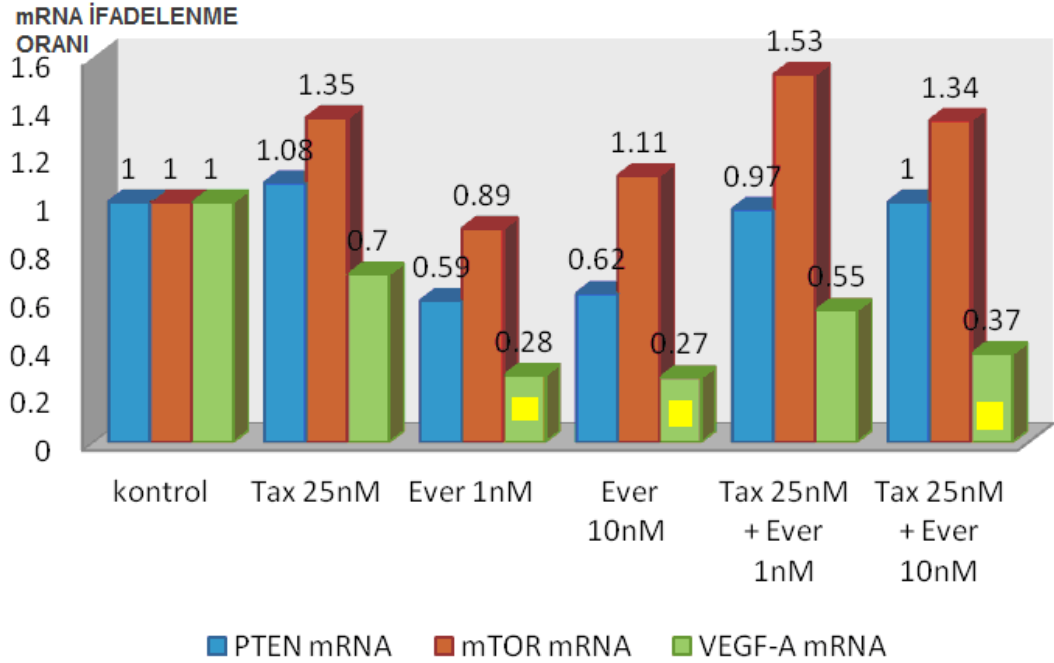


Şekil 28 : Taxol 5nM+Everolimus 1nM-10nM uygulanmasında PTEN, mTOR, VEGF-mRNA ifadenmesi (sarı işaret: $p<0.05$)

VEGFmRNA seviyesinde, everolimusun 1 nm ve 10 nM olarak tek başına kullanılması yanında taxol ile kombinasyonlarının kullanılması ile istatistiki olarak anlamlı değerler saptandı (Şekil 28-29, Tablo 20-21).

Tablo 21 : Taxol 25nM+Everolimus 1nM-10nM uygulanmasında PTEN, mTOR, VEGF-mRNA ifadenmesi

	PTEN	standart sapma	mTOR	standart sapma	VEGF	standart sapma
kontrol	1	0.02	1	0.03	1	0.02
tax25	1.08	0.11	1.35	0.15	0.7	0.08
ever1	0.59	0.06	0.89	0.12	0.28	0.03
ever10	0.62	0.04	1.11	0.09	0.27	0.01
tax25+ever1	0.97	0.1	1.53	0.07	0.55	0.11
tax25+ever10	1	0.3	1.34	0.19	0.37	0.04



Şekil 29 : Taxol 25nM+Everolimus 1nM-10nM uygulanmasında PTEN, mTOR, VEGF-mRNA ifadenmesi (sarı işaret: $p<0.05$)

Taxol 25 nM dozunun, everolimusun 1 nm ve 10 nM ile ayrı ayrı ve kombinasyonlarının kullanılmasında PTEN mRNA seviyesinde istatistiki olarak anlamlı olmayan değişiklikler saptanır iken, mTOR mRNA seviyesinde artma saptandı, ancak bu değerlerde istatistiki olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 29, Tablo 21).

VEGF mRNA seviyelerinde de taxol 25nM + everolimus 10 nM beraber kullanımı ile belirgin düşme saptandı ve bu değerler de istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 29, Tablo 21).

5-TARTIŞMA

Jinekolojik kanserler ile ilgili artan moleküler bilgiler ve araştırmalar ışığında daha etkin ve aynı zamanda da daha az toksik olabilen yeni ilaç arayışları sonucu bulunmuş olan ‘Moleküler Hedefli Tedaviler’ önemli bir grubu oluşturmaktadır.^{5,6} mTOR inhibitörü olan ‘rapamisin’ ve onun türevi ‘everolimus’ bu konuda umut veren bir kimyasal ajan olmaktadır.⁵⁷

Over tümörlerinin önemli bir alt grubu olan berrak hücreli kanserlerinin agresif yapıda olması, tam olarak tedavilerinin hala sağlanamaması ve mevcut tedaviler ile sık olarak izlenen toksik yan etkileri nedeni ile mTOR inhibitörlerinin mevcut tedavilere alternatif veya bu tedavilere ek etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda; mTOR inhibitörü olan everolimus’u tek başına ve taxol ile beraber kombine ederek over berrak hücreli kanser hücre hattı olan ES-2/CRL-1978® ‘de kullanarak, hücre canlılığı, apoptozis, PTEN, mTOR ile VEGFA genlerinin ifadenmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Everolimusun hücre hattında tek başına kullanılmasının hücre canlılığına etkisi düşük olup ancak yüksek dozlarda etki izlenmektedir (Şekil 14-16). Everolimus 500 nM doz gibi yüksek dozda 24 saat kullanımı ile elde edilen hücre canlılığında azalma oranı ancak % 53.3 olabildiği olup bu durum literatür ile uyumludur (Şekil 14).⁸¹

Taxolun 24 saat süreli 500 nM dozda uygulanması ile % 50.3 ve 48 saat süreli 25nM dozda uygulaması ile ancak %55.9 gibi bir hücre canlılığı değeri elde edilmiştir (Şekil 17-18). Hücre hattımızda taxol'un tek başına kullanılması (Şekil 17-19) ile elde edilebilen değerlere yakın değerler, taxol ile everolimus kombinasyonlarında çok daha düşük taxol dozu kullanarak elde edilebildiği gözlenmiştir (Şekil 20-21).

Taxol 10nM + everolimus 1nM kombinasyonunun 24 saat süre ile kullanılmasında %48.1 canlılık oranı elde edildi (Şekil 20). Bu oran taxolun aynı sürede tek başına 500 nM gibi yüksek olan doz da yapmış olduğu oran olan % 50.3'e yakındır (Şekil 17). Taxol 5nM + everolimus 1nM kombinasyonun 48 saatlik kullanılması ile elde edilen % 54.8 oranı (Şekil 21) taxolun tek başına 25nM dozda kullanılmasına yakın oranda (%55.9) hücre canlılığını azaltmayı başarmıştır (Şekil 18).

Hücre canlılığı üzerine taxol ile beraber olarak everolimusun 10nm dozda olarak kullanılması 24 ve 48 saat ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilmiş olup artan uygulama süresi ile korele olarak 48 saat ölçümlerinde daha düşük canlılık değerleri elde edilmiştir. Taxol 5nm + everolimus 10nM beraber kullanılması ile % 45.8 oranın da hücre canlılığı değeri elde edilmiştir (Şekil 23).

Floresan Mikroskobunda canlı/apoptotik/nekrotik hücrelerin değerlendirilmesi sonucunda taxol ile everolimusun beraber kombine kullanıldığı tüm dozlarının istatistiksel olarak değerlerde apoptozis üzerine etkili olduğu saptandı. Apoptozis üzerine tek başına taxol 25 nM ile elde edilen % 26.6 (Şekil 24) oranına yakın değerler taxol 5nm + everolimus 1nM ve taxol 5nM + everolimus 10nM kombinasyonu ile de elde edilmiştir (Şekil 26).

Çalışmamızda, taxol 25nm + everolimus 10nm dozda kullanılması ile elde edilen %31.2'lik hücre canlılığı oranı çok dikkat çekicidir. Ancak bu değer sırasındaki nekroz oranının da %52 gibi yüksek oranda saptanmış olması nedeni ile elde edilen sonuçların hücrelerin artık nekroza girmesi ile ilgili olduğunu düşündürmektedir (Şekil 27). Daha düşük doz olan kombinasyonların tercih edilmesi ile de zaten istatistiksel olarak anlamlı apoptozis değerleri elde edilebilmiştir.

Everolimusunda üyesi olduğu rapaloglar (rapamisin ve türevleri) bilinen tüm hücre sistemlerinde apoptozisi uyarabildiği bildirilmiş olup artmış apoptozisin sistemlerde mTOR hedeflerinin (MDM2, Myc, Bad, GSK3 ve FOXO) down regülasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir.⁸²

Ancak Gingras'ın da belirttiği üzere rapamisin apoptozis üzerine olan etkisi tek başına kullanıldığında belirgin değilken diğer ajanlar ile kombine kullanılması durumunda apoptozisi belirgin olarak arttırmaktadır.⁸³ Taxol uyarımlı hücre hasarında, mTOR inhibisyonu oluşan apoptozise ek katkı sağlamaktadır.^{74,84} Meme, servikal, baş-boyun gibi birçok kanser türünde de taxol ve rapamisin'in kombine kullanılmasının sinerjik etki göstererek apoptozisi arttırdığı ve hücre proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir.⁸⁵ Rapaloglar ile beraber taxol kullanılmasının altında yatan mekanizmalarının açıklanabilmesi için çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Rapamisin tarafından inhibe edilen mTOR yolağı ile taxol gibi mikrotübül hasarı yapan ajanlar ile uyarılan apoptotik uyarı yolları beraber yürümektedir. Taxol, Bcl-2 inhibisyonu ve mikrotübül depolimerizasyonu inhibe etmektedir ve programlı hücre ölümünün eşiğini düşürmekte olduğu bunun da mTOR üzerinden uyarısında Bcl-2'nin kritik denge unsuru olduğu ileri sürülmektedir.⁸⁶ Ayrıca taxol ile rapamisin kombinasyonunun, tek başına taxol kullanılmasına göre α -tübülin üzerinde

daha etkili olduğu saptanmıştır.⁷⁴ Taxoller, túbülin asetilasyonunu tek başına 1.3-1.5 kat arttırmakta iken rapamisin ile beraber kullanılması durumunda túbülin asetilasyonunu 3.1-4 kat arttırmaktadır. Rapamisinin tek başına túbülin asetilasyonuna etkisi ise saptanmamıştır.⁷⁴

Diğer taraftan rapamisin'in, endometrial, ovarian ve servikal kanser hücrelerinde izlenen etkilerinde, telomeraz aktivitesini hTERT mRNA üzerinden baskılanmasının da rolü olduğu belirtilmektedir.⁷⁴ Rapamisinin hTERT ekspresyonu üzerindeki etkisi, hücre döngüsü üzerindeki etkisinden bağımsızdır.⁸⁸ Tek başına taxol uygulamasının hTERT mRNA ekspresyonunu ama rapamisin ile taxol kombinasyonun hTERT mRNA ekspresyonunu azalttığı ileri sürülmüştür.⁷⁴ Taxol'un telomeraz aktivitesini regüle etmeyip telomeraz erezyonu yaptığı düşünölmektedir. Bu telomer erezyonu tam olarak anlaşılamamış olmakla beraber taxol ile beraber telomeraz inhibitör kullanılması da *In vivo* ve *In vitro* olarak anti-tümör aktivitesini arttırdığı ve tedaviye katkı sağladığı belirtilmektedir.⁸⁹

Rapamisin diğer sitotoksik ilaçlar ile kombinasyonu da apoptozisi arttırmaktadır. Bu durum cisplatin ve carboplatin için de gösterilmiştir.¹³² Over kanserinde yapılan benzer bir çalışmada, cisplatin ile beraber mTOR inhibitörü kullanılması, tek başına kullanılması gereken cisplatin dozunun daha düşük kullanılabilmesine olanak sağlamış ve aynı zamanda belirgin apoptozis değeri elde edilmiştir.¹⁸

Rapamisin ve türevlerinin, hücreleri G1 fazında durduran sitostatik ajanlar gibi davranmaktadırlar. S6K1, pro-apoptotik molekül olan BAD (Bcl-2-associated death promoter, Bcl-2 gen ailesinden olup apoptozisi başlatır) inaktivasyonu rapamisin tedavisi ile geriye dönmektedir.⁹⁵

mTOR inhibisyonun beraberinde başka bir hedefli tedavi ajanının kullanılması da özellikle ortak yolak aktivasyonu gösteren kanserlerde daha da anlamlı olabileceği ileri sürülmektedir. Preklinik ve erken insan çalışmaları TSC (Tuberous Sclerosis Complex) ilişkili tümörlerde de mTOR inhibitörlerinin etkili olduğu gösterilmiş olup özellikle kanser tedavisinde PI3K ve mTOR inhibisyonun beraberce uygulanmasının çok daha avantajlı olabileceği bildirilmiştir.¹³³ Radyoterapi ile beraber rapamisin kullanılması da apoptozis ve otofajiyi de arttırmaktadır.⁹⁷

Apoptozis’de mTOR sisteminin tek başına sorumlu olmadığı ve mTOR blokajı sonrasında paralel yollarda aktivasyon oluşabileceği düşünülmektedir.^{98,135} Bazı durumlarda da rapamisin uygulanması sonrası alternatif yolların aktive olabileceğini ve bununda sonradan ortaya çıkan rapamisin duyarlılık farklılıkları yaratabileceğini düşündürmektedir.⁸¹

Çalışmamızda taxol ve everolimus’un tek olarak kullanılması ile PTEN mRNA değerlerinde değişim saptanmadı. Taxol 5nM + everolimus 1nM ve Taxol 5nM + everolimus 10nM kombinasyonlarının kullanılması ile PTEN mRNA değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşme ($p<0.05$) izlenmiştir (Şekil 28). Taxol 25nM + everolimus 1nM ve taxol 25nM+ everolimus 10nM kombinasyonların uygulanması ile PTEN mRNA değerinde değişim saptanmamıştır (Şekil 29).

PTEN’in kontrolü üzerinde çok sayıda kompleks denetleme mekanizmaları mevcut olup pozitif ve negatif regülatörleri ile modüle edildiği bilinmektedir.^{48,54,103,104,107}

PTEN’in denetimini açıklamaya çalışan çok sayıda çalışma mevcuttur. Yuh ve arkadaşlarının bizim de kullanmış olduğumuz hücre hattı olan ES-2 hücre hattında Troglitazone (TGZ) (Peroxisome

Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ) agonisti, nükleer reseptör super-ailesinden olup antihiperlipidemik yapısı yanında mitotik arrest ve apoptozis uyarımı ile antikanser özellikleri gösterilmiş sentetik maddedir) ile yaptıkları çalışmada hücrelerde doz bağımlı olarak büyüme arrestini arttırdığı bulunurken tedavi sonrası PTEN seviyesi (yaklaşık 1.8-3.1 kat) azalmıştır. Aynı şekilde fosforile PTEN seviyesi de doz bağımlı olarak azalmış olup TGZ'nin PTEN degradasyonunu ve defosforilasyonunu uyardığını ileri sürmüşlerdir. Bu azalmanın mekanizması çok iyi açıklanamamış olup aynı çalışmada ayrıca PTEN'in hücre içi dağılımı da değişerek hücre membranında toplandığı izlenmiştir.⁹⁹ Hücre içi PTEN dağılımı PTEN'in hücredeki aktivasyon durumuna göre değişmektedir.¹⁵⁷

Noh yaptığı çalışmasında, ER(Estrogen Receptor) pozitif olan MCF-7 hücrelerde PI3K inhibitörü olan Wortmannin kullanmış ve PTEN seviyesinde düşme saptamıştır. ER α -negatif MDA-MB-231 hücrelerde ise Wortmannin kullanımı ile PTEN seviyesinde değişim saptanmamıştır. ER α 'nın meme epitelinde PI3K/Akt yolağını uyardığı ve PTEN'i regüle ettiğini öne sürmüşlerdir.¹⁰⁰

PTEN'in mRNA ölçümlerinin aslında PTEN'in fonksiyonu ile doğrudan paralel bir ilişki sağlamadığını gösteren Wu ve arkadaşlarının çalışmasında Vinculin-null hücrelerde normal PTEN mRNA seviyesi olmasına rağmen PTEN proteini saptanamamıştır.¹⁰²

PTEN'in mutasyonu aslında jinekolojik kanserlerde ve çoğu tümör grubunda %40-50 oranında saptanmaktadır. PTEN kaybı ile Akt aktivasyon gerçekleşmekte ve dolayısı ile de mTOR aktivasyonu oluşmaktadır. PTEN mutasyonu olan hücreler mTOR inhibisyonu için belirgin bir hedef oluşturmaktadır. Over kanserlerinde de mTOR ve Akt aktivasyonu da sıklıkla beraber olarak izlenmektedir.^{51,105,136,137} PTEN defektif kanser hücrelerinde mevcut Akt aktivasyonu en alt basamaklardaki

p70S6K1 aktivitesini ve 4EBP fosforilasyonunu arttırmaktadır ve c-myc ekspresyonunu yükseltmektedir. PTEN defektif hücrelerde hücre proliferasyonundan sorumlu olabilecek ikincil mTOR aktivasyonu sıklıkla gerçekleşmektedir. Bu yüzden de bu tür tümörler mTOR inhibitörleri ile tedaviye de çok yatkın olmaktadır. Aynı şekilde tümör gelişmiş olan tüberoz skleroz vakaları da mTOR inhibitörleri ile tedaviye yatkındır. Diğer taraftan mTOR inhibitörlerinin p53 veya p21 aktivitesi/ekspresyonun yokluğunda kuvvetli terapatik etkisinin olduğu da bilinmektedir.⁵⁵ Farelerdeki bir çalışmada da PTEN -/+ tümörler rapamisinin büyüme önleyici etkisine çok duyarlıdır. ^{52,106}

OBHK hücre hatlarından oluşan 40 tane vakayı içeren bir çalışmada parafin gömülü dokularda immünohistokimyasal olarak inceleme yapılmış ve vakaların 15 tanesinde (%37.5) PTEN'de azalma izlenmiştir. ⁴⁶

Cheng'in çalışmasında mTOR mRNA ve Akt seviyeleri yüksek olan K562 hücrelerinde PTEN transfeksiyonu yaparak beraberinde rapamsin kullanmışlar ve tekrar değerlendirdiklerinde mTOR mRNA ve Akt seviyeleri'nin düştüğü gözlemişlerdir. Bu çalışmada sadece PTEN transfeksiyonunu takiben 3. Günde PTEN hızla artarken tam zıt yönde mTOR hızla düşmektedir. Çalışmada tek başına rapamisin kullanılmasının mTOR seviyesini etkilemediği, belirgin etkinin ancak rapamisin ile beraber PTEN transfeksiyonu ile sağlanabildiği izlenmektedir.¹²⁴ Birle'de PTEN'in kendi transkripsiyonunu feed-back mekanizma ile geriye dönük olarak Akt üzerinden negatif regüle ettiğini ileri sürmüştür.¹⁰¹

Rapalogların uygulanması sonucu mTORC1 fonksiyonunda blokaj oluşmakta ve bu da mTOR sonrasında yer alan 4E-BP1 ve p70S6K1'ni seviyesini azaltmaktadır. Bu azalma da normal şartlardaki buradan kaynaklanan mTOR öncesi PI3K-Akt basamağına yönelik negatif

kontrolü ortadan kaldırmaktadır. Negatif kontrol etkisi ortadan kalkınca burada var olan PTEN'in negatif kontrol etkisine olan ihtiyacı da ortadan kaldırmaktadır. Çalışmamızda izlenen PTEN'deki azalma PTEN'in kompleks denetlenme prosedürleri nedeni ile olası negatif feed-back mekanizmalarının aktivasyonu sonucu oluştuğunu ve literatür ile uyumlu olduğu düşünülmektedir.⁵¹

Çalışmamızda taxol, everolimus ve bunların kombine kullanılmaları ile mTOR mRNA ifadelenmesinde istatistiki olarak anlamlılık saptayamadık (Şekil 28,29). mTOR işleyişinde de çok sayıda denetleme ve feed-back mekanizmaları olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan everolimus mTOR inhibitörü olup görevini mTORC1 kompleksine bağlanarak mTOR'un fonksiyon yapmasına engel olmaktadır. Yani mTOR inhibitörleri mTOR'un seviyesini değil fonksiyonunu azaltmaktadır.¹⁴⁴

Çeşitli over kanserlerinde mTOR inhibitörlerinin kullanılması genelde doz-bağımlı büyüme inhibisyonunu gerçekleştirmektedir.²⁸ Morris'ın da belirttiği üzere rapamisin etkilediği mTORC1 yanında rapamisine duyarsız olan ve etkileri tam olarak bilinmeyen mTORC2 kompleksinden de söz etmektedir. mTOR'un yer aldığı uyarı yollarının kompleks bir yapı sergilemekte olduğunu ve mTORC1'in rapamisin tarafından inhibisyonunun da beklenen antikanser etkinin tersi yönde geriye dönük olarak etkiyen başka yolların da aktivasyonunu sağladığı ileri sürülmüştür.¹¹⁰

Yapılan bir çalışmada ovarian kanserli fare modelinde everolimus ile bireysel olarak izlenen farklı sonuçlar izlenmiştir. Bu farklı sonuçların sekonder ortaya çıkan ve mTOR inhibisyonunun ikincil olarak aktive ettiği bir feedback loop mekanizmasının etkin olabileceği öne sürülmüştür.^{20,109} Outmezguine, mTOR inhibitörlerinin Akt üzerinde bifazik etkisi olduğunu ve feed-back mekanizma ile de RTK(reseptör tirozin kinaz)

inhibisyonu yaparak sekonder olarak PI3K aktivasyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir. Çok önemli bir noktaya da değinerek onkolojik ağda signal yolaklarının monoterapi ile blokajının adaptasyon mekanizmalarını uyardığını öne sürmüşlerdir.¹⁰⁸

Everolimus tarafından tedavi edilen hastalarda '*rapalog aracılı Akt aktivasyonu*' tanımlanmıştır. Kalın bağırsak ve meme kanseri hastalarında everolimusun tedavisinin 1. ayında yapılan biyopsi incelemelerinde immünohistokimyasal olarak hastaların yaklaşık %50'sinde çok daha yüksek Akt seviyesi saptanmıştır.^{110,111} Diğer gösterilmiş olan bir bulguya göre de, mTOR üzerinde denetleme yapan yapılarından biri de; hipoksi sonrası salınan HIF1'dir.⁶⁵

Kanser hücreleri sıklıkla mTOR aktivasyonu ile sonuçlanan çok sayıda uyarı molekülündeki mutasyon ve/veya ekspresyon artışını zaten içermektedir. Örneğin meme kanserinde 1/3 vakada saptanmakta olan HER2 ekspresyon artışını sıklıkla PI3K/Akt/mTOR uyarı yolağının aktivasyonu ile de beraberdir.¹²⁰

mTOR inhibitörleri de mTOR un FKBP-12 ile etkileşerek oluşan inhibitör kompleks'ü mTORC1'ni inhibe etmekte olup mTOR seviyesinde de değişme olması beklenmemektedir.^{51,110,130} (Şekil 5).

Çalışmamızda everolimusun tek başına hem 1nM hem de 10 nM dozda kullanılması ile VEGF-A mRNA seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı olarak düşme bulunmuştur. Benzer durumda everolimusun, taxol ile beraberce kombine olarak kullanılması ile de VEGF-A seviyelerinde benzer etki elde edilmiştir. Bu da everolimusun vasküler etkisinin öncelikli olarak taxolden bağımsız olarak geliştiğini düşündürmektedir (Şekil 28,29). VEGF, mTOR yolağı ile tetiği çekilmektedir.¹¹² mTOR ve HIF-1 α , HIF-1 transkripsiyon faktörü'nün heterodimerik subuniti regülasyonu ile tümör

hücrelerinin hipoksik strese karşı cevabı geliştirmekte ve tümörün vasküler kompartmanının gelişmesi için de teşvik etmektedir.¹¹³

Everolimusun klinik çalışmalardaki çok sayıda tümör türünde damar dansitesini ve lenf nod metastazını azalttığı gösterilmiştir.^{115,131,132} mTOR inhibisyonu ile lenfatik damar gelişimi arasında da belirgin ilişki olup lenfatik endotel hücrelerinde VEGF-A ve VEGF-C rapamisin ile bloke olduğu ve *In vivo* olarak da rapamisin'in lenfatik damar yoğunluğunu ve lenfatik metastazı belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir.^{112,114}

Everolimus, HIF-1 ve VEGF üzerinden tümördeki endotel hücrelerinin proliferasyonunu önleyerek anjiogenezisi de inhibe etmektedir.⁷⁵ Hipoksi sonrası salınan HIF1, REDD1 ve REDD2'nin her ikisinin de artışına yol açmakta ve bir süre sonra da ters yönden de TSC1 ve TSC2 üzerinden mTORC1'un feed-back inhibisyonunu gerçekleştirmektedir.⁶⁵ Everolimus'un tümör vaskülaritesine etkisi direkt olarak (endotelyal, düz kas ve perisitler üzerine) ve indirekt olarak (VEGF üzerinden) gerçekleşebilmektedir. Bu etkileri nedeni ile everolimusun, VEGFR hedefli tedavilerine eklenmesinin çok daha etkin sonuçlar ortaya çıkaracağı ileri sürülmektedir.¹¹⁶

İlginç olarak tümör anjiogenezisindeki mTOR aracılı direk etkilerinden başka olarak, tümör damarlarındaki doku faktörlerini MAP kinaz yolağı ile aktive ettiği de belirtilmiştir. Rapalogların endotelial prekürsör hücrelerde gelişim durması ve hücre ölümü ile sonlandığı konusunda da belirgin kanıtlar mevcuttur.¹¹⁹

mTOR inhibisyonunun, hipoksik şartlar altında dahi olsa HIF-1 α 'yı azaltması izlenebilmektedir.¹¹⁷ Bizim çalışmamız ile uyumlu olarak Yuan'ın çalışmasında düşük doz rapamisin ile düşük doz taxolun beraber kullanılması ile kuvvetli sinerjistik etki saptanmıştır.¹¹

Everolimus, taxol toksitesinin kontrolü için beraberce haftalık olarak everolimus 30mg, taxol 80mg ile beraber 3 veya 4 haftalık sikluslar halinde birçok insan malignitesinde kullanılabileceği önerilmiştir.¹²⁵ Uygulama zamanlaması için; *In vitro* olarak mTOR inhibisyonundan önce uygulanacak olan taxol tedavisi, bu tedavinin mTOR inhibisyonu ile aynı anda veya daha sonra uygulanmasına göre daha belirgin olarak apoptozisi arttırmaktadır.⁸⁴ O'Reilly'de *In vivo* olarak taxol ve everolimusun beraberce kullanılmasının, additif ve sinerjistik etki göstererek tümör aktivitesini azalttığını belirtmiştir.¹²¹ Benzer olarak servikal kanser hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada da; taxol'den önce kullanılan rapamisin, daha iyi klinik sonuçların oluşmasını sağlamış olması rapamisin farklı bir mekanizma ile etkisinin ortaya çıktığı ileri sürülmüştür.¹¹⁸ Bu bilgiler taxol yerine taxol-everolimus kombinasyonlarının emniyetli olarak uygulanabilmesi ve uygulama zamanlamasının belirlenebilmesi için ileri araştırmalar gerektiğini düşündürmektedir.¹⁷

Çeşitli over kanser hatlarında mTOR inhibitörlerinin kullanılması geleneksel ilaçların kemosenesitivitesini arttırdığı ve direkt etkisi olmasa bile potensiyel kemosenesitizer olarak da kullanılabileceği ve konvansiyel tedaviye mTOR inhibitörlerinin eklenmesinin fayda sağlayacağı görüşü hakimdir.^{87,90}

Everolimus'un tümör büyüme ve yayılmasında önemli bir faktör olan damar gelişimininde ki ana faktörlerden VEGFA'yı azaltması nedeni ile de kombine tedavilere eklenebileceğini gösterdik. Everolimus ile yapılan kombine ilaç uygulamalarının over kanser tedavisinde değerlendirilmesi gereken önemli tedavi seçeneği olması gerektiğini belirledik. Ancak hem elde edilen sonuçların desteklenmesi ve taxol-everolimus kombinasyonun uygulanma zamanlamasının da daha net olarak belirlenebilmesi için yeni *In vivo* ve *In vitro* çalışmalara ihtiyaç vardır.

mTOR yolağı ile ilgili olarak bu yolağın etkilediği/etkilendiği yollar ve kompleksler hala tam olarak belirlenememiştir.⁵⁷ Bu yolların ve mekanizmalarının belirlenmesiyle everolimusun etki mekanizması daha iyi açıklanabilecektir. Diğer taraftan over kanserinde, PTEN defektif tümör hücrelerin de mTOR ve Akt aktivasyonu da sıklıkla saptanmış olması nedeni ile mTOR inhibitörlerine özellikle daha fazla duyarlı olmaktadır ve PTEN defektif olan hasta gruplarının everolimus için tedaviye özellikle seçilmesi de başarıyı daha da arttıracaktır.^{105,128,136,137}

mTOR inhibitörlerinin taxol dışında diğer önemli kemoteropatik ajanlar olan cisplatin gibi sitotoksikler ve gefitinib, imatinib, zoledronate gibi hedefli ajanlar ile ve aynı zamanda da iyonize radyasyon ile kombinasyonlarını da tümör büyümelerinde belirgin inhibisyon yaptığı gösterilen çok sayıda çalışma vardır.^{87,91,90, 92,93} Over kanser hatlarında, Akt inhibitörleri kullanılması durumunda taxol etkinliğinde belirgin artış olduğu saptanmıştır.^{96,134} Over kanserlerinde de mTOR ve Akt aktivasyonu da sıklıkla beraber olarak izlenmekte olup tedavilere mTOR inhibitörlerinin eklenmesinin tedavi başarısını yükseltebileceği düşünülmektedir.^{51,105,136,137}

Sonuç olarak yaptığımız çalışmamızda over kanser hattı olan ES-2/CRL-1978 hücre hattında, taxol + everolimus kombinasyonunun kullanılmasının tek başına taxol kullanılmasına göre hücre canlılığını azaltmada ve apoptozisi artırma gibi değerlerde daha etkin olduğu ve taxolun daha küçük dozda kullanılmasına olanak sağladığını, dolayısı ile taxolun tedavinin gidişini etkileyen ve çok önemli olan doz bağımlı yan etkilerinin de azaltılabilmesi amacı ile tedaviye eklenebileceğini saptadık.

6-SONUÇ

ES-2 hücre hattında, yaptığımız XTT analizi sonuçlarına göre taxol ve everolimus ile beraber kullanılması sonucunda ise hücre canlılığında azalmanın taxolun tek başına kullanılmalarına göre daha düşük dozlarında sağlandığı saptandı. Özellikle bu etkin seviye taxolun çok daha küçük miktarları ile sağlanmış olup taxolun tek başına 5 nM ile sağladığı hücre canlılık değeri %81.7 iken buna 10nM everolimus eklenmesi ile %45.8 gibi bir değere düşmektedir.

Floresan Mikroskobunda canlı/apoptotik/ nekrotik hücrelerin değerlendirilmesine göre; apoptozis değerlerine bakıldığında; taxol'ün everolimus ile beraber kullanılması ile çok daha iyi sonuçların elde edildiği görüldü. Özellikle taxol 5nM + everolimus 1nM kullanılması ile elde edilen sonuçların taxolun tek başına 25 nM kullanılmasına yakın olduğu saptandı.

PTEN, mTOR ve VEGF-A mRNA seviyelerini değerlendirdiğimizde düşük doz taxol 5nM ile beraber everolimus 1nM ve 10nM ile kombinasyonunun uygulanmasının istatistiksel olarak anlamlı PTEN-mRNA ve VEGF-mRNA değişimi saptadık.

İlginç olarak Everolimusta tek başına olarak VEGF-A seviyelerinde de taxollu kombinasyon'lar kadar anlamlı değişiklikler yapmıştır. VEGF-A ekspresyonunda etkisine taxol'un katkısı izlenmemiştir. Bu da everolimusun vasküler etkisinin bağımsız olarak geliştiğini düşündürmektedir.

Yaptığımız çalışmamızda rapamisin analogu olan everolimus'un over berrak hücreli adenokarsinoma hücre hattı olan ES-2/CRL-1978®'de taxol ile beraber kullanılmasının tümör hücrelerindeki büyüme inhibisyonunu ve apoptozisi arttırdığı ve kullanılan taxol ilaç dozunun daha düşük miktarda kullanılmasına yardımcı olduğunu saptadık. Bu etkilerini gösterirken tümör büyümesinde ve metastazında çok önemli bir faktör olan VEGF-A mRNA'sın da çok anlamlı düşmelere sebep olması tedavide bu amaç için dahi kullanılabileceğini gösterdik.

7-ÖZET

EVEROLİMUS'UN OVER BERRAK HÜCRELİ KANSER HATTINDA PTEN/ mTOR/ VEGFA SİNYAL YOLAĞINDAKİ ETKİLERİNİN APOPTOTİK DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Over berrak hücreli karsinomu tedaviye dirençli düşük differensiasyon gösteren kanserlerdir. mTOR hücrede birçok stimulan yolağın birleşkesinde yer alarak hücre proliferasyonu ve anjiogenezisi stimüle eden önemli bir role sahiptir. Çok sayıda hücre dışı uyaran ve hücre içi uyaran etkilerini mTOR aracılığı ile gerçekleştirir. Bir tümör supressörü olan PTEN hücre siklusunda önemli bir role sahip olup PI3K inhibisyonu yapar. mTOR inhibitörü olan everolimus rapamisin türevi olup antianjiogenik ve antiproliferatif etkilere sahiptir.

Çalışmamızda everolimus ve taxolun ES-2 hücre hattına etkilerini sitotoksik, apoptotik ve genomik düzeyde araştırması yanında PTEN, mTOR, VEGFA yolağındaki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Taxol'un 500 nM dozda 24 saat uygulanması ile elde edilen %50.3 hücre canlılık oranı, çok düşük doz taxol'un (10nM) ve everolimus kombinasyonu ile de yaklaşık olarak benzer oranda elde edilebilmiştir. 48 saat süreli 5nM taxol ve 10nM everolimus kombinasyonu ile de yüksek apoptozis oranı (%27) ve düşük canlılık oranı (%46.7) elde edilebilmiştir ($p<0.05$). Everolimus ve taxol kombinasyonu ile VEGFAmRNA ve PTENmRNA seviyesinde azalma ($p<0.05$) ve mTORMRNA seviyesinde değişme olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak everolimus ve taxol kombinasyonun kullanılmasının hücre canlılığını azaltmada ve apoptozisi arttırmada tek başına taxol kullanılmasına göre daha etkin olduğu ve bu etkiyi taxolun çok daha düşük dozları ile de etkin sonuçlar sağlayarak, taxolun yüksek sitotoksitesinden koruyabileceğini ve PTEN ile VEGFA seviyelerini değiştirebilecek etkiler oluşturduğunu saptadık.

Anahtar Kelimeler: Over Kanseri, ES-2 hücre hattı, everolimus, taxol, apoptosis, mTOR, PTEN, VEGFA

8-SUMMARY

RESEARCH OF EVEROLIMUS ON OVARY CLEAR CELL CARCINOMA CELL LINE ON PTEN/mTOR/VEGF PATHWAY WITH APOPTOSIS

Ovary's clear cell cancers are among the low differential and treatment-resistant cancers. mTOR forms the junction of many stimulant paths in the cell and it stimulates cell proliferation and angiogenesis through VEGF. PTEN, a tumor suppressor and it has the key role in cell cycle. It does the inhibition of PI3K. Everolimus, which is mTOR inhibitor, is a derivative of rapamycin which has a effect of antiangiogenic and antiproliferative.

In our study, it is aimed to show the evaluate the cytotoxic, apoptotic and genomic effects of everolimus on ES-2 Cell Line, on PTEN/mTOR/VEGFA path and to research the effect of taxol, which is a currently used standard treatment element.

Treatment with taxol only for 24h incubation at 500nm dose resulted in the low viability percentage (50.3%) while a same percentage (48.1%) was observed after treatment with the very low dose (10nM) taxol and everolimus combination for the same incubation duration. Treatment with 5 nM taxol and 10 nM everolimus combination for the 48h incubation duration resulted low apoptosis percentage (27%) and low viability percentage (46.7%) ($p<0.05$). After treatment of everolimus and taxol combination VEGFA mRNA and PTEN mRNA level decreased ($p<0.05$) and mTOR mRNA level unchanged.

It further shows that use of everolimus and taxol combination leads to a further increase in this effect. In conclusion, our study draws attention to the possible clinical effectiveness of use of Everolimus together with chemotherapeutic agents with high cytotoxicity due to the opportunity to attain suitable apoptotic effect with reduced dose in cancer treatment targeting PTEN/mTOR/VEGFA pathway.

Key Words: Ovary cancer, ES-2 cell line, everolimus, taxol, apoptosis, mTOR, PTEN, VEGFA

9-KAYNAKLAR

1-Rebecca Siegel, Elizabeth Ward, Otis Brawley ,Ahmedin Jemal, The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths, Cancer Statistics, 2011, A Cancer Journal for Clinicians, 2011,Volume 61, Issue 4, pages 212–236

2-Loris De Cecco, Luigi Marchionni, Manuela Gariboldi, James F Reid, M Stefania Lagonigro, Stefano Caramuta, Cristina FerrarioErica BussaniDelia Mezzanzanica, Fabio TurattiDomenico Delia, Gene expression profiling of advanced ovarian cancer: characterization of a molecular signature involving fibroblast growth factor 2, Oncogene, 2004, 23, 8171–8183

3-S. Decruze, j. Green, Hormone therapy in advanced and recurrent endometrial cancer: a systematic review, , International Journal of Gynecological Cancer, 2007, vol. 17,no. 5, pp. 964–978

4-Sanjeev Kumar, Haider Mahdi, Christopher Bryant, Jay P Shah, Gunjal Garg, and Adnan Munkarah,Clinical trials and progress with paclitaxel in ovarian cancer, Int J Womens Health. 2010; 2: 411–427

5-Ivan Diaz-Padilla,Ignacio Duran, Blaise A. Clarke, Biologic rationale and clinical activity of mTOR inhibitors in gynecological cancer, Cancer Treatment Reviews, Volume 38, Issue 6, Pages 767-775, 2012

6-Flora Zagouri, George Bozas, Eftichia Kafantari, Endometrial Cancer: What Is New in Adjuvant and Molecularly Targeted Therapy, International Obstetrics and Gynecology,2010,Volume 11, Published online 2010 February 2. doi: 10.1155/2010/749579

7-Lloyd P. McMahon, Kin M. Choi, Tai-An Lin, Robert T. Abraham, and John C. Lawrence Jr The Rapamycin-Binding Domain Governs Substrate Selectivity by the Mammalian Target of Rapamycin. Mol. Cell. Biol. November 2002 22: 7428-7438

8-Blume-Jensen P, Hunter T., Oncogenic kinase signaling. Nature, 2001; 411:355-64

9-Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. Leukemia, 2003 Mar;17(3):590-603

10-Laudański P, Kowalczyk, Selective gene expression profiling of mTOR-associated tumor suppressor and oncogenes in ovarian cancer, Folia Histochem Cytobiol. 2011;49(2):317-24.

11- RuiRong Yuan, Andrea Kay, William J Berg and David Lebwohl, Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy, Journal of Hematology & Oncology 2009, 2:45

12-Lalwani MD, Srinivasa R. Prasad, Raghunandan Vikram, Histologic, Molecular and Cytogenetic Features of Ovarian Cancers Implications for Diagnosis and Treatment, Neeraj, RadioGraphics 2011; 31:625–646

13-Schiller W, Mesonephroma ovarii.1939, Am J Cancer 35:1–21

14-Michael P. Stany , Michael P. Stany, Vinod Vathipadiekal, Laurent Ozbun, Rebecca L. Stone, Identification of Novel Therapeutic

Targets in Microdissected Clear Cell Ovarian Cancers, PLoS ONE 6,7:e21121,2011

15-Yoshida S, Furukawa N, Haruta S, Tanase Y, Kanayama S, Noguchi T, Sakata M, Yamada Y, Oi H, Kobayashi H, Theoretical model of treatment strategies for clear cell carcinoma of the ovary: focus on perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2009 Nov;35(7):608-15. Epub 2009 Aug 8.

16-M. Köbel, S. E. Kalloger, J. Carrick, A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary, *American Journal of Surgical Pathology*, 2009, vol. 33, no. 1, pp. 14–21

17-Zorn KK, Bonome T, Gangi L, Chandramouli GV, Awtrey CS, Gardner GJ, Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:6422–64230.

18-Seiji Mabuchi, Deborah A. Altomare, Mitchell Cheung, Lili Zhang, RAD001 Inhibits Human Ovarian Cancer Cell Proliferation, Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis, and Prolongs Survival in an Ovarian Cancer Model, *Clin Cancer Res* July 15, 2007 13; 4261

19-Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S Study Group. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*, 2008;372(9637):449–56.

20-Seeliger H, Guba M, Kleespies A, Jauch KW, Bruns, Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutical target against primary

tumor growth, metastases, and angiogenesis, J Cancer Metastasis Rev. 2007 Dec;26(3-4):611-21

21-Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. New England Journal of Medicine, 1971, 285, 1182–1186

22-McDougall, S.R, Anderson, A.R.A., Chaplain, M.A.J. Mathematical modelling of dynamic adaptive tumour-induced angiogenesis: Clinical implications and therapeutic targeting strategies. Journal of Theoretical Biology, 2006 Aug 7;241(3):564-89

23-L. Ricci-Vitiani, R. Pallini, M. Biffoni, Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells, Nature November, 2010, 468 (7325): 824–8

24-Benizri E, Ginouvès A, Berra E, The magic of the hypoxia-signaling cascade. Cell. Mol. Life Sci. 2008;65 (7-8): 1133–49

25-Iyer, N.V. et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1 α , Genes Dev. 1998, 12, 149–162

26- Peter Carmeliet, Yuval Dor, Jean-Marc Herbert, Dai Fukumura, Koen Brusselmans, Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis, Nature, 1998, Vol 394, 485-490

27-Marcus Fruttige, VEGF Gene Regulation <http://rd.springer.com/book/10.1007/978-0-387-78632-2>, Molecular Biology, 2008, Intelligence Unit, pp30-39

28-Mabuchi S, Altomare DA, Connolly DC, Klein-Szanto A, Litwin S, Hoelzle MK, Hensley HH, Hamilton TC, Testa JR, RAD001 (Everolimus) delays tumor onset and progression in a transgenic mouse model of ovarian cancer, *Cancer Res.* 2007 Mar 15;67(6):2408-13...

29-Kumar H et al. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:1279-88

30-Ohmori S et al. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated chronic liver diseases. *Hum Pathol* 2001;32:1363-70

31-Banerjee S, Gore M The future of targeted therapies in ovarian cancer. *Oncologist.* 2009 Jul;14(7):706-16.

32-Heidi A. Lane, Jeanette M. Wood, Paul M.J. McSheehy, Peter R. Allegrini mTOR Inhibitor RAD001 (Everolimus) Has Antiangiogenic/Vascular Properties Distinct from a VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitor , *Clin Cancer Res* March 1, 2009 15; 1612

33-Debbie Liao and Randall S. Johnson, Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer, *Cancer and Metastasis Reviews* Volume 26, Number 2 (2007), 281-290

34-Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J, Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Laboratory Investigation,* 1993,69 (5): 508–17

35-Terence O'Reilly and Paul MJ McSheehy, Biomarker Development for the Clinical Activity of the mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001): Processes, Limitations, and Further Proposals, *Transl Oncol.* 2010 April; 3(2): 65–79.

36-Hockenbery D., Defining Apoptosis, *Am J Pathol*, 1995, Vol 146, No:6

37-Kerr J.F.R, Wyllie A.H, Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide Ranging Implications in Tissue Kinetics, *Br J Cancer*, 1972, 26, 239-252

38-Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells, 2008, *Molecular Biology of the Cell* (textbook), 5th ed, Chapter 18, p. 1115

39-Statunton M, Gaffney Eoin F, Apoptosis, Basic Concepts and Potential Significance in Human Cancer, *Arch Pathol Lab Med* Vol 1998, 122:310-319

40-Santos A. Susin; Daugas, E; Ravagnan, L; Samejima, K; Zamzami, N; Loeffler, M; Costantini, P; Ferri, KF et al, Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis, *Journal of Experimental Medicine*, 2000, 192 (4): 571–80

41-Brüne B, Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ*, 2003, 10 (8): 864–9

42-Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW
Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2): 191–201

43-Fesik SW, Shi Y. "Controlling the caspases". *Science* (2001) 294 (5546): 1477–8

44-Zhi Y Cheng, Xiao L Guo, Xiao Y Yang, PTEN and rapamycin inhibiting the growth of K562 cells through regulating mTOR signaling pathway, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2008, 27:87

45-Jorge A. Garcia and David Danielpour, mTOR inhibition as a Therapeutic Strategy in the Management of Urologic Malignancies, *Mol Cancer Ther.* 2008 June; 7(6): 1347–1354.

46-Chih-Ming Ho, Ming-Chieh Lin, Shih-Hung Huang, Chi-Jung Huang, PTEN promoter methylation and LOH of 10q22–23 locus in PTEN expression of ovarian clear cell adenocarcinomas, *Gynecologic Oncology*, Volume 112, Issue 2, February 2009, Pages 307– 313

47-T Fujita, H Doihara, K Kawasaki, PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer, *Br.J Cancer.* 2006 January 30; 94(2): 247–252

48-Tanja Tamguney and David Stokoe, New insights into PTEN, *Journal of Cell Science*, 2007, 120, 4071-4079

49-Mayer C, Grummt I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*, 2006;25: 6384–6391

50-Eng C., Constipation, polyps, or cancer, Let PTEN predict your future, *Am J Med Genet*, 2003 A 122:315-322

51-Maria-Magdalena Georgescu, PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control, *Genes Cancer*. 2010 December; 1(12): 1170–1177.

52-Tanja Tamguney and David Stokoe, New insights into PTEN, *Journal of Cell Science* 2007,120, 4071-4079

53-A. Gericke, M. Munson, and A. H. Ross, Regulation of the PTEN phosphatase, *Gene*, 2006, vol. 374, no. 1-2, pp. 1–9

54-Jimmie E. Fata, Shawon Debnath, Edmund C. Jenkins Jr., and Marcia V. Fournier, Nongenomic Mechanisms of PTEN Regulation, *International Journal of Cell Biology*, 2012 2012, Article ID 379685, 10 pages, doi:10.1155/2012/379685,

55-Bing-Hua Jiang and Ling-Zhi Liu, Role of mTOR in anticancer drug resistance perspectives for improved drug treatment, *Drug Resist Updat*. 2008 June; 11(3): 63–76.

56-Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2004;4:335–348.

57-Helena Pópulo, José Manuel Lopes, Paula Soares, Review, The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer, *Int. J. Mol. Sci*. 2012, 13(2), 1886-1918

58-Samlowski WE, Vogelzang NJ: Emerging drugs for the treatment of metastatic renal cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 2007;12:605-618.

59-Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*,2008;1784:150–158

60-Levine, A. J.Feng, Z., Mak, T. W., You, H., & Jin, S. Coordination and communication between the p53 and IGF- 1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes & Development*, 2006,20, 267–275

61-Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ. Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 2004;14:639–647.

62-Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B, Pan D. Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat. Cell Biol* 2002;4:699–704.

63-Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev.Cancer* 2007;7:295–308.

64-Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov. Today* 2007;12:112–124

65-Fang J, Xia C, Cao Z, Zheng JZ, Reed E, Jiang BH. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J* 2005;19: 342–353

66-Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Drug Discov* 2006;5: 671–688.

67-Jastrzebski K, Hannan KM, Tchoubrieva EB, Hannan RD, Pearson RB. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth Factors* 2007;25: 209–226.

68-Jefferies, HB. Fumagalli, S. Dennis, PB. Reinhard, C. Pearson, RB. Thomas, G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k; *Embo J.* 1997. p. 3693-704

69-Zhang, D. Bar-Eli, M., Meloche, S., & Brodt, P. Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals. *Journal of Biological Chemistry*, (2004). 279, 19683–19690.

70-Hornberger, T. A., & Chien, S. Mechanical stimuli and nutrients regulate rapamycin-sensitive signaling through distinct mechanisms in skeletal muscle. *Journal of Cellular Biochemistry*, (2006). 97, 1207–1216.

71- Angeles Duran, Ramars Amanchy, Juan F. Linares, p62 Is a Key Regulator of Nutrient Sensing in the mTORC1 Pathway, *Molecular Cell*, 2011 October Volume 44, Issue 1, 134-146

72-Seghal SN, Baker H, Vézina C: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot*, 1975, 28:727-732.

73-Hara K, Yonezawa K, Weng QP, et al. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* 1998;273:14484–94.

74-Aaron Shafer, Chunxiao Zhou, Paola A. Gehrig, MD, John F. Boggess, and Victoria L. Bae-Jump, Rapamycin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis¹ *Int J Cancer*. 2010 March 1; 126(5): 1144–1154

75-Beuvink I, O'Reilly T, Zumstein S, Antitumor activity of RAD001, an orally active rapamycin derivative. *Proc Am Assoc Cancer Res*(2001) 42: 366

76- Jonathan H Fox, Teal Connor, Vanita Chopra, The mTOR kinase inhibitor Everolimus decreases S6 kinase phosphorylation but fails to reduce mutant huntingtin levels in brain and is not neuroprotective in the R6/2 mouse model of Huntington's disease, *Molecular Neurodegeneration* 2010, 5:26,

77-Boulay A, Zumstein-Mecker S, Stephan C, Beuvink I, Zilbermann F, Haller R, Tobler S, Heusser, O'Reilly T, Stolz B, Marti A, Thomas G, Lane HA Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res* (2004) 64: 252–261

78-Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM, Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101

79-Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L, Shand N, Macarulla T, Ramos FJ, Dimitrijevic S, Zoellner U, Tang P, Stumm M, Lane HA, Lebwohl D, Baselga J Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* (2008) 26: 1603– 1610

80-O'Donnell A, Faivre S, Burris III HA, Rea D, Papadimitrakopoulou V, Shand N, Lane HA, Hazell K, Zoellner U, Kovarik JM, Brock C, Jones S, Raymond E, Judson I Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* (2008) 26: 1588– 1595

81-Calastretti, A. Bevilacqua, A.; Ceriani, C.; Vigano, S.; Zancai, P.; Capaccioli, S.; Nicolin, A. Damaged microtubules can inactivate BCL-2 by means of the mTOR kinase; *Oncogene*. 2001. p.6172-80

82-Moumen A Met acts on Mdm2 via mTOR to signal cell survival during development. *Development* 2007,134: 1443-1451,

83-Gingras, AC. Raught, B.; Sonenberg, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR; *Genes Dev*. 2001. p. 807-26

84-Aissat N, Le Tourneau C, Ghoul A, Serova M, Bieche I, Lokiec F, Raymond E, Faivre S, Antiproliferative effects of rapamycin as a single agent and in combination with carboplatin and paclitaxel in head and neck cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* (2007) 62: 305–313

85-Mabuchi, S. Altomare, DA. Cheung, M. Zhang, L. Poulikakos, PI. Hensley, HH. Schilder, RJ. Ozols, RF. Testa, JR. RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model; Clin Cancer Res.2007. Jul 15;13(14):4261-70

86-Jiang, BH.; Liu, LZ.,Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment; Drug Resist Updat. 2008. p. 63-76s

87-Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, Manikhas A, Bellet M, Mayordomo J, Campone M, Kubista E, Greil R, Bianchi G, Steinseifer J, Molloy B, Tokaji E, Gardner H, Phillips P, Stumm M, Lane HA, Dixon JM, Jonat W, Rugo HS: Phase II randomized study of neoadjuvanteverolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer.J Clin Oncol 2009, 27:2630-2637.

88-Bae-Jump, VL. Zhou, C. Gehrig, PA. Whang, YE. Boggess, JF. Rapamycin inhibits HTERT telomerase mRNA expression, independent of cell cycle arrest; Gynecol Oncol. 2006. p. 487-94

89-Mo, Y. Gan, Y. Song, S. Johnston, J. Xiao, X. Wientjes, MG. Au, JL. Simultaneous targeting of telomeres and telomerase as a cancer therapeutic approach; Cancer Res. 2003. p. 579-85

90-Gligorov J, Azria D, Namer M, Khayat D, Spano J-P: Novel therapeutic strategies combining antihormonal and biological targeted therapies in breast cancer: Focus on clinical trials and perspectives. Crit Rev Hematol Oncol 2007, 64:115-128.

91-O'Reilly T, McSheehy P, Kawai R, Kretz O, McMahon L, Brueggen J, Brueglisauer A, Gschwind H, Allegrini P, and Lane H. Comparative pharmacokinetics of RAD001 (everolimus) in normal and tumor-bearing rodents. *Cancer Chemother Pharmacol* (2010). 65, 625–639.

92-Morgan TM, Pitts TE, Gross TS, Poliachik SL, Vessella RL, and Corey E. RAD001 (everolimus) inhibits growth of prostate cancer in the bone and the inhibitory effects are increased by combination with docetaxel and zoledronic acid. *Prostate* (2008). 68, 861–871.

93-Rossi F, Ehlers I, Agosti V, Socci ND, Viale A, Sommer G, Yozgat Y, Manova K, Antonescu CR, and Besmer P. Oncogenic kit signaling and therapeutic intervention in a mouse model of gastrointestinal stromal tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103, 12843–12848.

94-Athanassiadou P, Athanassiades P, Grapsa D, Gonidi M, Athanassiadou AM, Stamati PN, Patsouris E. The prognostic value of PTEN, p53, and beta-catenin in endometrial carcinoma: a prospective immunocytochemical study. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 May-Jun;17(3):697-704

95-Harada H., Andersen JS.; Mann M.; Terada N.; Korsmeyer, SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001. p. 9666-70.

96-Helen Foster, Helen M Coley, Anastasia Goumenou, George Pados, Amanda Harvey And Emmanouil Karteris, Differential Expression of mTOR Signalling Components in Drug Resistance in Ovarian Cancer *Anticancer Research* (2010)30: 3529-3534

97-Cao, C. Subhawong, T., Albert, J. M., Kim, K. W., Geng, L., Sekhar, K. R., et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. *Cancer Research*, (2006). 66,10040–10047.

98-Buck E, Eyzaguirre A, Brown E., Petti F., McCormack S.,Haley J. D., et al. Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, (2006). 5, 2676–2684.

99-Yuh-Cheng Yang, Tsung-Chuan Ho, Inhibition of cell motility by troglitazone in human ovarian carcinoma cell line, *BMC Cancer*, 2007, 7:216,

100-Noh EM, Lee YR, Chay KOH. Estrogen receptor α induces down-regulation of PTEN through PI3-kinase activation in breast cancer cells. *Mol Med Report*. 2011 Mar-Apr;4(2):215-9

101-Birle D, Bottini N, Williams S, Huynh H, deBelle I, Adamson E, Mustelin T Negative feedback regulation of the tumor suppressor PTEN by phosphoinositide-induced serine phosphorylation.*J Immunol* (2002) 169: 286–291

102-Wu, X., Hepner Wu, Y., Dowbenko, D., Spencer, S., Laura, R., Lee, J., Gu, Q. and Lasky, Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(2000). 97, 4233-4238.

103-Baker, S. J. PTEN enters the nuclear age. *Cell*(2007). 128, 25-28.

104-Gericke, A, Munson, M. and Ross, A. H. Regulation of the PTEN phosphatase Gene (2006). 374, 1-9

105-Oliver Treeck, Birgit Wackwitz, Ulrike Haus, Olaf Ortmann, Effects of a combined treatment with mTOR inhibitor RAD001 and tamoxifen in vitro on growth and apoptosis of human cancer cells Gynecologic Oncology Volume 102, Issue 2, August 2006, Pages 292–299

106-Neshat MS, Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumours to inhibition of FRAP/mTOR. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:10314-10319

107-Min Sup Song, Leonardo Salmena, Pier Paolo Pandolfi, The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor ,Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, 283-296 (May 2012)

108-Vanessa S. Rodrik-Outmezguine, Sarat Chandarlapaty, Nen C. Pagano, et al, mTOR Kinase Inhibition Causes Feedback-Dependent Biphasic Regulation of AKT Signaling Cancer Discovery; August 2011,1(3):248-259

109-Zeng, Z., Sarbassov dos, D., Samudio, I. J., Yee, K. W., Munsell, M. F., Ellen Jackson, C., et al. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. Blood, (2007). 109, 3509–3512.

110-Morris E. Feldman, Beth Apsel, Active-Site Inhibitors of mTOR Target Rapamycin-resistant Outputs of mTORC1 and mTORC2, PLoS Biology, February, 2009 , Volume 7, Issue 2 , e1000038

111- O'Reilly, K.E.; Rojo, F.; She, Q.B.; Solit, D.; Mills, G.B.; Smith, D.; Lane, H.; Hofmann, F.; Hicklin, D.J.; Ludwig, D.L.; Baselga, J.; Rosen, N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 2006, 66, 1500-1508

112-S Hube, C J Brun, G Schmid, P C Hermann - Inhibition of the mammalian target of rapamycin impedes lymphangiogenesis, *Kidney International* (2007) 71, 771–777

113-Majumder, P. K., Febbo, P. G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L. M., et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of 618 *Cancer Metastasis Rev* (2007) 26: 611–621

114-Kobayashi, S., Kishimoto, T., Kamata, S., Otsuka, M., Miyazaki, M., & Ishikura, H. Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Science*, (2007). 98, 726–733.

115-Patel et al, Decreased Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis by mTOR Inhibition in Head and Neck Cancer, *Cancer Research*, 2011, 71(22):7103-7112

116-Lane HA, Wood JM, McSheehy PM, Allegrini PR, Boulay A, Brueggen J, Littlewood-Evans A, Maira SM, Martiny-Baron G, Schnell CR, Sini P, O'Reilly T, mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2009 Mar 1;15(5):1612-22

117-Lang, S. A., Gaumann, A., Koehl, G. E., Seidel, U., Bataille, F., Klein, D., et al. Mammalian target of rapamycin is activated in

human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *International Journal of Cancer*, (2007). 120, 1803–1810

118-Faried LS, Faried A, Kanuma T, Nakazato T, Tamura T, Kuwano H, Minegishi T Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) by rapamycin increases chemosensitivity of CaSki cells to paclitaxel. *Eur J Cancer* (2006) 42: 934–947

119-.Miriuka SG, Rao V, Peterson M, Tumati L, Delgado DH, Mohan R, Ramzy D, Stewart D, Ross HJ, Waddell TK., mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death. *Am J Transplant*. 2006 Sep;6(9):2069-79.

120-Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan KH, Yang Y, Yang W, Smith TL, Shi D, Yu D) Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumorprogression in breast cancers. *Clin Cancer Res*, 2004 10: 6779–6788

121-Anne Boulay, Sabine Zumstein-Mecker, Christine Stephan, Iwan Beuvink, Frederic Zilbermann, Roland Haller, Sonja Tobler, Antitumor Efficacy of Intermittent Treatment Schedules with the Rapamycin Derivative RAD001 Correlates with Prolonged Inactivation of Ribosomal Protein S6 Kinase 1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Cancer Res* January 1, 2004 64; 252

122-C. Blake, Gilks, Molecular Abnormalities in Ovarian Cancer Subtypes Other than High-Grade Serous Carcinoma, *Journal of Oncology*, Volume 2010 (2010)

123-R. Wang, K. Chadalavada, J. Wishire et al "Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium". Nature (November 2010). 468 (7325): 829–33)

124-Zhi Y Cheng, Xiao L Guo, Xiao Y Yang, Zhi Y Niu, Shi H Li, Su Y Wang, Hao Chen and Ling Pan, PTEN and rapamycin inhibiting the growth of K562 cells through regulating mTOR signaling pathway * Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2008, 27:87 doi:10.1186/1756-9966-27-87

125- M Campone, V Levy, E Bourbouloux, D Berton Rigaud, D Bootle, C Dutreix, U Zoellner, N Shand, F Calvo, and E Raymond, Safety and pharmacokinetics of paclitaxel and the oral mTOR inhibitor everolimus in advanced solid tumours, Br J Cancer. 2009 January 27; 100(2): 315–321

126-Xia D, Srinivas H, Ahn YH, Sethi G, Sheng X, Yung WK, Xia Q, Chiao PJ, Kim H, Brown PH, Wistuba II, Aggarwal BB, Kurie JM, Mitogen-activated protein kinase kinase-4 promotes cell survival by decreasing PTEN expression through an NF kappa B-dependent pathway. J Biol Chem. 2007 Feb 9;282(6):3507-19. Epub 2006 Dec 11.

127-Susan Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, Toxicol Pathol. 2007; 35(4): 495–516.

128-Mehran S. Neshat, Ingo K. Mellinghoff, Chris Tran, Bangyan Stiles, George Thomas, Roseann Petersen, Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR., PNAS, vol. 98 no. 18> Mehran S. Neshat, 10314–10319

129-Klos KS, Wyszomierski SL, Sun M, Tan M, Zhou X, Li P, Yang W, Yin G, Hittelman WN, Yu D., ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells.,*Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):2028-37.

130-Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors, *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar;1804(3):433-9. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.12.001. Epub 2009 Dec 11.

131-Manegold PC, Paringer C, Kulka U, Krimmel K, Eichhorn ME, Wilkowski R, Jauch KW, Guba M, Bruns CJ, Antiangiogenic therapy with mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (Everolimus) increases radiosensitivity in solid cancer, *Clin Cancer Res.* 2008 Feb 1;14(3):892-900. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0955.

132-Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, Zhang L, Poulikakos PI, Hensley HH, Schilder RJ, Ozols RF, Testa JR., RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model.*Clin Cancer Res.* 2007 Jul 15;13(14):4261-70.

133-Goberdhan DC, Boyd CA. ,mTOR: dissecting regulation and mechanism of action to understand human disease,*Biochem Soc Trans.* 2009 Feb;37(Pt 1):213-6. doi: 10.1042/BST0370213

134- Su-Hyeong Kim, Yong-Sung Juhn, Yong-Sang Song Akt Involvement in Paclitaxel Chemoresistance of Human Ovarian Cancer Cells, ,*Annals of the New York Academy of Sciences*, January

2007, Volume 1095, Signal Transduction Pathways, Part C: Cell Signaling in Health and Disease pages 82–89

135-Kuntebommanahalli N. Thimmaiah, John Easton, Shile Huang, Karen A. Veverka, Glen S. Germain, Franklin C. Harwood, Peter J. Houghton, Insulin-like Growth Factor I-mediated Protection from Rapamycin-induced Apoptosis Is Independent of Ras-Erk1-Erk2 and Phosphatidylinositol 3'-Kinase-Akt Signaling Pathways, Cancer Res January 15, 2003 63; 364

136-Deborah A Altomare, Hui Qin Wang, Kristine L Skele, Assunta De Rienzo, Andres J Klein-Szanto, Andrew K Godwin and Joseph R Testa, AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth, Oncogene (2004) 23, 5853–5857.

137-J. Wolf, B.M. Slomovitz, Novel biologic therapies for the treatment of endometrial cancer, International Journal of Gynecological Cancer, 2005, Volume 15, Issue 2, page 411

138-Brill A, Torchinsky A, Carp H, Toder V., The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development, J Assist Reprod Genet. 1999 Nov;16(10):512-9.

139-Deborah C.I. Goberdhan and Clive Wilson, PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more, Human Molecular Genetics, 2003, Volume 12, Issue suppl 2, Pp. R239-R248

140-Obias M. Ntuli, Apoptosis and Medicine, T ISBN 978-953-51-0701-9, Published: August 16, 2012

141-Linda S. Steelman, William H. Chappell, Stephen L. Abrams, C. Ruth Kempf, Jacquelyn Long, Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging , AGING, 2011, Vol 3, No 3 , pp 192-222

142-Bing-Hua Jiang, Ling-Zhi Liu,PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics,2008, Volume 1784, Issue 1, , Pages 150–158

143-Zhaohui Feng, Haiyan Zhang, Arnold J. Levine, Shengkan Jin,The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. PNAS(Proc Natl Acad Sci U S A). 2005; 102(23): 8204–8209

144-Afinitor(Everolimus) [online]. 2013, Available from: URL:http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/022334s6lbl.pdf

145- Olgar Ş., Yetkin S.,Anjiogenezis, ÇSHD,2003;46:2,139-147

146- <http://www.dept.math.lsa.umich.edu/~tjack.research.html>- 2013

147- <http://www.betz.lu/index.phpthe-mtor-pathway-2013>

148- Xiaolin Wan, Lee J. Helman, The Biology Behind mTOR Inhibition in Sarcoma-The Oncologist August 2007 vol. 12 no. 8 1007-1018

149- Murat Gültekin, Epitelyal Over Kanserlerinde Prognostik Faktörler, Dr., Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2006

150- Kajihara H, Yamada Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Clear cell carcinoma of the ovary: potential pathogenic mechanisms (Review). *Oncol Rep.* 2010 May;23(5):1193-203

151-Y.Nagai, M.Inamine, M. Hirakawa, Postoperative whole abdominal radiotherapy in clear cell adenocarcinoma of the ovary, *Gynecologic Oncology*, 2007,vol. 107, no. 3, pp. 469–473

152- Nurgün Erdemoğlu, Bilge Şener, The Antitumor Effects Of The Taxane Class Compounds *J. Fac. Pharm.*, 2000, 29(1)77-90

153- Stiffness, M, Wall, M.E. Discovery and development of taxol in *Science and Applications*, CRC Press, 1995,Boca Raton, 3-25

154-Fanyin Meng, Roger Henson, Tushar Patel, Samson T. Jacob , MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer,*Gastroenterology*, August 2007, Volume 133, Issue 2, Pages 647-658

155- Ana C. Carrera, TOR signaling in Mammals, *Journal of Cell Science*, 2004, 117, 4615-4616

156- Stephen W. G. Tait, Douglas R. Green, Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, September, 11, 621–632

157- Anabel Gil, Amparo Andre´s-Pons, Elena Ferná´ndez , Nuclear Localization of PTEN by a Ran-dependent Mechanism Enhances Apoptosis: Involvement of an N-Terminal Nuclear Localization Domain and Multiple Nuclear Exclusion Motifs *Molecular Biology of the Cell* 2006,Vol. 17, 4002–4013

158- Juan I. Luengo, Dennis S. Yamashita, Damien Dunnington, Structure-activity studies of rapamycin analogs: evidence that the C-7 methoxy group is part of the effector domain and positioned at the FKBP12-FRAP interface, *Chemistry & Biology*, 1995, Volume 2, Issue 7, 471-481

159- Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP,. Clinical pharmacokinetics of everolimus, *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(2): 83-95

10. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, bilgi, deneyim ve iyi niyetlerini esirgemeyen ve Tıp eğitimimden yıllar sonra tekrar öğrencileri olma şansına sahip olduğum, tez danışmanım hocam Sayın Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye, sayın hocalarım Prof. Dr. Sevda MENEVŞE'ye, Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ'ye ve Doç Dr.Ece Konaç'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin her aşamasında bilgi ve desteklerini, esirgemeyen, birlikte çalışmaktan keyif duyduğum Sayın Dr. Akın YILMAZ'a ve Sayın Araş. Gör. Volkan Ergin'e ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik bölümünde özveri ile görev yapan herkese teşekkürlerimi sunarım.

Uzun süren eğitimim boyunca her zaman yanımda olan ve destekleyen eşim Dr Derya Müftüoğlu'na ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Kamil Hakan
Soyadı : MÜFTÜOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi : Antakya, 22.09.1965

Eğitim :

2006- Gazi Üniversitesi, Ankara
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Ana Bilim Dalı, Doktora Programı
1995-1999 Patoloji Uzmanlık Eğitimi
1982-1989 Gazi Üniversitesi, Tıp Eğitimi

Yabancı Dili : İngilizce