

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE
SERUM VE GLUKOKORTİKÖİD İLE
İNDÜKLENEBİLEN KİNAZ 1 (SGK-1)
İNİBİSYONUNUN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ
RESEPTÖRÜ (EGFR) ARACILI SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Dr. Abdulsamet SANDAL

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2018

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE SERUM VE
GLUKOKORTİKOİD İLE İNDÜKLENEBİLEN KİNAZ 1 (SGK-1)
İNİBİSYONUNUN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ
RESEPTÖRÜ (EGFR) ARACILI SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Dr. Abdulsamet SANDAL

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. A. Lale DOĞAN**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Gürcan GÜNAYDIN**

ANKARA

2018

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE SERUM VE GLUKOKORTİKOID İLE
İNDÜKLENEBİLEN KİNAZ 1 (SGK-1) İNHİBİSYONUNUN EPİDERMAL BÜYÜME
FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFR) ARACILI SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Abdulsamet SANDAL

Danışman: Prof. Dr. A. Lale DOĞAN

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gürcan GÜNAYDIN

Bu tez çalışması 28.09.2018 tarihinde jürimiz tarafından "Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. S. Ayşe KARS
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Yasemin AKSOY
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL
(Gazi Üniversitesi)

Üye:

Doç. Dr. Füsun ÖZMEN
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Doç. Dr. Resul KARAKUŞ
(Gazi Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

03 Ekim 2018

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezimin aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

28/09/2018

 Abdulsamet SANDAL

i

ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
 Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. A. Lale DOĞAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.


Dr. Abdulsamet SANDAL

TEŞEKKÜR

Hayatım boyunca her türlü zorluğu aşmam için varını yoğunu ortaya koyan, gelecekte de bu fedakârlığı tereddütsüz yapacaklarına inandığım, bütün sevinç ve başarılarımı adadığım annem, babam ve ağabeyime,

Doktora eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, karşılaştığım sorun ve aksaklıkları aşmamda desteklerini ve anlayışlarını esirgemeyen başta tez danışmanım Prof. Dr. A. Lale DOĞAN ile Prof. Dr. Dicle GÜÇ olmak üzere Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Göğüs Hastalıkları Uzmanlığı eğitimimde bilgi ve deneyimlerini paylaşma olanağı bulduğum, sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim başta tez danışmanım Prof. Dr. Lütfi ÇÖPLÜ ile Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet Uğur DEMİR olmak üzere Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

İş ve Meslek Hastalıkları Yan Dal Uzmanlığı eğitimim sırasında doktora eğitimimi tamamlamam konusunda anlayış ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Ali Naci YILDIZ'a,

Tez çalışmam sırasında bilgi ve becerilerini paylaşan ve her konuda yardımlarını aldığım Dr. Elif HAZNEDAROĞLU ve Uzm. Biyolog M. Emre GEDİK'e,

Değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Kayhan İNAN, Yüksek Mühendis Yiğit DEDEMEN, Uzm. Dr. Burak Yasin AKTAŞ ve Uzm. Dr. Özge ÖZTÜRK AKTAŞ ile yan dal uzmanlık eğitimine aynı dönem başladığım ve yoğun çalışma dönemlerinde anlayış ve desteklerini hissettiğim Uzm. Dr. Seval Müzeyyen ECİN ve Uzm. Dr. Adem KOYUNCU'ya, eğitimim boyunca birlikte çalışma imkânı bulduğum Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Anabilim Dalı ve İş ve Meslek Hastalıkları Bilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlisi ve öğrenci arkadaşlarım ile idari personele,

Sonsuz teşekkürler...

ÖZET

Sandal, A., Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Serum ve Glukokortikoid ile İndüklenebilen Kinaz 1 (SGK-1) İnhibisyonunun Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) Aracılı Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Doktora Tezi, Ankara, 2018. Küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde (KHDAK) epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal yolağının onkojenik aktivasyonu görülmektedir. KHDAK hücrelerinde Serum ve Glukokortikoid ile İndüklenebilen Kinaz 1'in (SGK-1) ekspresyonunun artması proliferasyon ve migrasyonla ilişkili bulunmuştur. SGK-1'in substratı olan NDRG1 proteininin, pankreas ve kolon kanserinde EGFR aracılı sinyal iletimi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada, A549 ve H1299 insan KHDAK hücre dizilerinde SGK-1 inhibitörü GSK650394'ün hücre proliferasyonu ve EGFR sinyal yolağı üzerine etkisi ilk kez incelendi. GSK650394 ile inkübasyonun (8 ve 16 μ M), A549 ve H1299 hücrelerinde hücre çoğalması ve koloni oluşumunu anlamlı olarak azalttığı belirlendi ($p<0,05$). Bu sonuç KHDAK hücrelerinin proliferasyon için SGK-1 aktivitesine ihtiyaç duyduğuna işaret etmektedir. KHDAK hücre dizilerinde SGK-1 aktivitesi GSK650394 'e duyarlı bulundu. H1299 hücrelerinde NDRG1 fosforilasyonu inhibe olurken ($p<0,001$), A549 hücrelerinde GSK3 β 'nin fosforilasyonu baskılandı ($p<0,01$). Çalışmamızda, SGK-1 inhibisyonunun EGFR sinyal yolağı üzerine etkisi ve bunun NDRG1 fosforilasyonundaki değişim ile ilişkisi incelendi. H1299 hücrelerinde NDRG1 fosforilasyonunun değişimine rağmen her iki hücre dizisinde de EGFR ekspresyonunda ve aktivasyonunda anlamlı değişiklik izlenmedi. Sonuç olarak, KHDAK hücrelerinde NDRG1 ekspresyon düzeyi artırılarak, EGFR sinyal yolağı üzerindeki etkinin incelenmesinin mekanizmaya ışık tutabileceği düşünülmektedir. KHDAK hücrelerinin proliferasyon için SGK-1 aktivitesine ihtiyaç duymaları, SGK-1 inhibitörlerini kombinasyon tedavilerinde dikkate değer bir seçenek yapmaktadır.

Anahtar Kelimeler: KHDAK, SGK1 inhibisyonu, NDRG1, EGFR

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: TDK-2016-13331).

ABSTRACT

Sandal, A., Effects of Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 (SGK-1) Inhibition on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling in Non-Small Cell Lung Cancer, Hacettepe University Institute of Health Sciences Tumor Biology and Immunology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2018.

Oncogenic activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling exists in non-small cell lung cancer (NSCLC). Increased expression of Serum and Glucocorticoid Inducible Kinase 1 (SGK-1) in NSCLC cells was found related to proliferation and migration. Relationship between EGFR signaling and a SGK-1 substrate, NDRG1, was also shown in pancreas and colon cancer. In this study, we analyzed the effects of SGK-1 inhibitor GSK650394 on cell proliferation and EGFR signaling in A549 and H1299 human NSCLC cell lines for the first time. Incubation with GSK650394 (8 and 16 μ M) significantly decreased cell proliferation and colony formation in A549 and H1299 cells ($p < 0.05$). This result points out that NSCLC cells need SGK-1 activity for proliferation. SGK-1 activity was sensitive to GSK650394 in NSCLC cells. Phosphorylation of NDRG1 ($p < 0.001$) and GSK3 β was suppressed ($p < 0.01$) in H1299 and A549 cells respectively. We evaluated effects of SGK-1 inhibition on EGFR signaling together with alteration in NDRG1 phosphorylation. Although significant NDRG1 phosphorylation decrease in H1299 cells, any significant change in expression and activation of EGFR wasn't observed in both cell lines. In conclusion, possible mechanisms could be enlightened by evaluating effects on EGFR after increasing NDRG1 expression in NSCLC cells. SGK-1 inhibitors could be a remarkable alternative in combination treatments with their effects on NSCLC cell proliferation.

Keywords: NSCLC, SGK1 inhibition, NDRG1, EGFR

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project Number: TDK-2016-13331).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Akciğer Kanseri	4
2.2. KHDAK Moleküler Biyolojisinde Önemli Moleküller	5
2.2.1. EGFR	6
2.2.2. KRAS	7
2.2.3. BRAF	8
2.2.4. MEK	8
2.2.5. HER2	9
2.2.6. PI3K/AKT/mTOR	9
2.2.7. ALK	10
2.2.8. MET	10
2.2.9. ROS1	10
2.2.10. RET	11
2.2.11. FGFR1	11
2.2.12. Tümör Supresör Genler	11
2.3. KHDAK'de EGFR Aracılı Sinyal Yolağının Önemi	13
2.4. Serum ve Glukokortikoid ile İndüklenebilen Kinaz -1	13
2.5. Enzim İnhibisyon Mekanizmaları ve SGK-1 İnhibisyonu	17
2.5.1. Enzim İnhibisyon Mekanizmaları	17
2.5.2. SGK-1 İnhibisyonu ve SGK-1 İnhibitörü GSK650394	19

2.6. N-myc downregulated gene 1	20
2.7. SGK-1/NDRG1/EGFR İlişkisi	22
2.8. A549 ve H1299 Hücre Dizilerinin Özellikleri	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar	25
3.2. Aletler ve Cihazlar	27
3.3. Hücre Kültürü	28
3.3.1. Tripsinizasyon	28
3.3.2. Hücre Pasajı	30
3.3.3. Hücre Dondurma	30
3.3.4. GSK650394 alikotlarının hazırlanması	30
3.4. MTT Assay	31
3.5. Kristal Viyole Assay	32
3.6. Western Blot Deneyleri	33
3.6.1. İlaç Uygulama	33
3.6.2. Lizat Hazırlama	34
3.6.3. Protein Kantitasyonu	36
3.6.4. <i>Western Blot</i> ve Protein Analizi	37
3.7. İstatistiksel Analiz	43
3.8. Etik Onay ve Araştırma Desteği	43
4. BULGULAR	44
4.1. KHDAK Hücrelerinde SGK-1 Ekspresyonunun Gösterilmesi	44
4.2. KHDAK Hücrelerinde GSK650394'ün Subtoksik Dozunun MTT Canlılık Testi ile Belirlenmesi	46
4.3. GSK650394 'ün KHDAK Hücrelerinin Çoğalmasına ve Koloni Oluşturmasına Etkisinin Kristal Viyole Yöntemi ile İncelenmesi	49
4.4. KHDAK Hücrelerinde SGK-1'in GSK650394 ile Farmakolojik İnhibisyonunun Western Blot Yöntemiyle İncelenmesi	52
4.4.1. GSK650394'ün NDRG1 ve p-NDRG1 Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi	52
4.4.2. GSK650394'ün SGK-1 Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi	61
4.4.3. GSK650394'ün p-GSK3 β Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi	69
4.4.4. GSK650394'ün EGFR Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi	77
4.4.5. GSK650394'ün EGFR Aktivasyonuna (p-EGFR Ekspresyonuna) Etkisinin İncelenmesi	85

5. TARTIŞMA	90
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	98
7. KAYNAKLAR	100
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-3: Turnitin Programı Ekran Görüntüsü Çıktısı	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

AGC	PKA-, PKG-, PKC-ilişkili
AKT	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz
APS	Amonyum persülfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
C-terminal	Karboksi terminal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DYRK1A	<i>dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase</i>
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EML4	Ekinoderm mikrotübül ilişkili protein-benzeri 4
ErbB	<i>V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene</i>
FBS	Fötal Dana Serumu
FGFR1	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HRP	<i>Horseradish</i> Peroksidaz
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
GDP	Guanozin difosfat
GSK3β	Glikojen sentaz kinaz-3β
GTP	Guanozin trifosfat
IU	Uluslararası ünite
KHDAK	Küçük Hücreli Dişi Akciğer Kanseri

KRAS	<i>Kirsten ras oncogene homolog</i>
JAK	<i>JAnus kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MEK	<i>Bkz. MAPK</i>
mRNA	Mesajcı RNA
MSK1	Mitojen- ve stres- ile aktive olan protein kinaz 1
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	Metil-tiyazol-tetrazolyum
NDRG1	<i>N-myc downregulated gene 1</i>
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
N-terminal	Amino terminal
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI3K	Fosfoinozidit 3-Kinaz
PIC	Proteaz İnhibitör Kokteyli
PIP3	Fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfat
PKD-1	Fosfoinozidit Bağlımlı Kinaz 1
PH	Pleckstrin homoloji
PRK2	Protein kinaz C-ilişkili kinaz 2
PVDF	Polivinilidin florür
RAS	<i>Rat Sarcoma oncogene</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SGK	Serum ve Glukokortikoid ile İndüklenebilen Kinaz
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
STAT	<i>Signal Transducer Activator of Transcription</i>
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TNM	<i>Tumor, Node, Metastasis</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Akciğer adenokarsinomunda sürücü onkogen mutasyonları sıklığı.	6
2.2. EGFR aracılı sinyal yolağı.	7
2.3. Serum ve Glukokortikoid ile İndüklenebilen Kinaz izoformları.	14
2.4. AKT'ın ve SGK-1'in aktivasyon basamakları.	15
2.5. SGK-1'in aktivasyonu.	16
2.6. Reversibl inhibisyon mekanizmaları.	18
2.7. SGK-1 inhibitörü GSK650394'ün kimyasal yapısı.	20
2.8. N-myc downregulated gene izoformları.	21
2.9. EGFR/SGK-1/NDRG ilişkisi.	23
3.1. EGFR sinyal yolağı aktivasyonunun değerlendirildiği deney planı.	34
4.1. KHDAK hücrelerinde SGK-1 ekspresyonunun 3 bağımsız örnekte gösterilmesi (n=3).	44
4.2. A549 ve H1299 hücrelerinde SGK-1 rölatif bant yoğunluğu (SGK-1/GAPDH).	45
4.3. A549 hücrelerinde GSK650394 inhibitörünün zaman ve doza bağlı etkisi.	47
4.4. H1299 hücrelerinde GSK650394 inhibitörünün zaman ve doza bağlı etkisi.	48
4.5. A549 hücrelerinde GSK650394 'ün hücre çoğalmasına etkisi.	50
4.6. H1299 hücrelerinde GSK650394 'ün hücre çoğalmasına etkisi.	51
4.7. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.	53
4.8. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisi.	54
4.9. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.	55
4.10. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisi.	56
4.11. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.	57
4.12. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisi.	58
4.13. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.	59

- 4.14. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisi. 60
- 4.15. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun SGK-1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. 61
- 4.16. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak SGK-1 ekspresyonuna etkisi. 62
- 4.17. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun SGK-1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. 63
- 4.18. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak SGK-1 ekspresyonuna etkisi. 64
- 4.19. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun SGK-1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. 65
- 4.20. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak SGK-1 ekspresyonuna etkisi. 66
- 4.21. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun SGK-1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. 67
- 4.22. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak SGK-1 ekspresyonuna etkisi. 68
- 4.23. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-GSK3 β ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. 69
- 4.24. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-GSK3 β ekspresyonuna etkisi. 70
- 4.25. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-GSK3 β ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. 71
- 4.26. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-GSK3 β ekspresyonuna etkisi. 72
- 4.27. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-GSK3 β ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. 73
- 4.28. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-GSK3 β ekspresyonuna etkisi. 74
- 4.29. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-GSK3 β ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. 75
- 4.30. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-GSK3 β ekspresyonuna etkisi. 76
- 4.31. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. 77
- 4.32. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi. 78

- 4.33.** A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. **79**
- 4.34.** A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi. **80**
- 4.35.** H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. **81**
- 4.36.** H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi. **82**
- 4.37.** H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR ekspresyonuna etkisinin incelenmesi. **83**
- 4.38.** H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi. **84**
- 4.39.** A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR aktivasyonuna (fosforilasyonuna) etkisinin incelenmesi. **86**
- 4.40.** A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR aktivasyonuna (p-EGFR ekspresyonuna) etkisi. **87**
- 4.41.** H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR aktivasyonuna (fosforilasyonuna) etkisinin incelenmesi. **88**
- 4.42.** H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR aktivasyonuna (p-EGFR ekspresyonuna) etkisi. **89**

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. A549 ve H1299 hücre dizilerinin bazı özellikleri.	24
3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin, kitlerin ve tamponların adları ve üretici firmalarının adları.	25
3.2. Çalışmada kullanılan aletlerin ve cihazların adları ve üretici firmaların adları.	27
3.3. Kullanılan kristal viyole solüsyonunun bileşenleri ve kullanılan örnek hacimler.	33
3.4. Lizis tamponu bileşenlerinin konsantrasyonları ve kullanılan bileşenlerin hacimleri.	35
3.5. Jel hazırlamak için kullanılan çözelti miktarları.	38
3.6. Transfer işleminde kullanılacak bileşenler ve örnek hacimler.	40
4.1. A549 ve H1299 hücrelerinde SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunluğu (SGK-1/GAPDH) (n=3).	45
4.2. KHDAK hücrelerinde 96 kuyuluk plaklarda kuyu başına farklı sayılarda hücre ekilmesine bağlı olarak saptanan MTT deney sonuçları.	46
4.3. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (NDRG1/GAPDH ve p-NDRG1/NDRG1), (n=3).	54
4.4. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (NDRG1/GAPDH ve p-NDRG1/NDRG1), (n=3).	56
4.5. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (NDRG1/GAPDH ve p-NDRG1/NDRG1), (n=3).	58
4.6. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (NDRG1/GAPDH ve p-NDRG1/NDRG1), (n=3).	60
4.7. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (SGK-1/GAPDH), (n=3).	62

- 4.8.** A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (SGK-1/GAPDH), (n=3). **64**
- 4.9.** H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (SGK-1/GAPDH), (n=3). **66**
- 4.10.** H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (SGK-1/GAPDH), (n=3). **68**
- 4.11.** A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-GSK3 β ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (p-GSK3 β /GAPDH), (n=3). **70**
- 4.12.** A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-GSK3 β ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (p-GSK3 β /GAPDH), (n=3). **72**
- 4.13.** H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-GSK3 β ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (p-GSK3 β /GAPDH), (n=3). **74**
- 4.14.** H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-GSK3 β ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (p-GSK3 β /GAPDH), (n=3). **76**
- 4.15.** A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası EGFR ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (EGFR /GAPDH), (n=3). **78**
- 4.16.** A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası EGFR ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (EGFR /GAPDH), (n=3). **80**
- 4.17.** H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası EGFR ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (EGFR /GAPDH), (n=3). **82**
- 4.18.** H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası EGFR ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (EGFR /GAPDH), (n=3). **84**
- 4.19.** A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu ve EGF ligand uyarısı ile EGFR (EGFR/GAPDH) ve fosforile EGFR (p-EGFR/EGFR) ortalama rölatif bant yoğunlukları (n=3). **87**
- 4.20.** H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu ve EGF ligand uyarısı ile EGFR (EGFR/GAPDH) ve fosforile EGFR (p-EGFR/EGFR) ortalama rölatif bant yoğunlukları (n=3). **89**

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, erkeklerde ve kadınlarda en fazla mortaliteye sebep olan kanser tipidir (1). Akciğer kanserlerinde beş yıllık sağ kalımın kolon, meme ve prostat kanseri gibi kanserlerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşük olması ileri evrelerde tanı alması ve histolojik ve biyolojik olarak daha heterojen yapıda olmasına bağlanmaktadır (2). Solunum yolu epitelinden köken alan tümörler olarak tanımlanan akciğer kanserleri, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) patolojik sınıflamasına göre küçük hücreli akciğer kanseri, adenokarsinom, yassı hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere dört ana tipe ayrılmaktadır (3). Adenokarsinom, yassı hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom; küçük hücreli akciğer kanserlerden ayrılan bazı ortak özellikleri dikkate alınarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak adlandırılmaktadır. KHDAK, tüm akciğer kanseri olgularının yaklaşık %85'inde görülen ana grubu oluşturmaktadır (4). KHDAK histopatolojik ve radyolojik olarak invazyon ve metastaz özellikleri de göz önünde bulundurularak TNM evreleme sistemine göre dört evrede incelenmektedir; ancak olguların yaklaşık %70'inde hastalığın ileri evrelerinde tanı konulmaktadır (4). Güncel kılavuzlara göre, KHDAK tedavisinde cerrahi rezeksiyon yalnızca erken evrelerde tedavi seçeneği olurken Evre II'den itibaren adjuvan tedavi ilk seçenek olmakta veya palyatif endikasyonlarla kemoterapi ve radyoterapi rejimleri önerilmektedir. KHDAK olgularında evreye ve bölgesel farklılıklara bağlı olmak üzere 5 yıllık sağ kalım %4 ile %17 arasında saptanmaktadır (5).

KHDAK'de klasik tedavi protokollerinin sınırlı etkinliği, daha etkin ve hedefe yönelik tedavilerin araştırılmasına yol açmıştır. KHDAK'leri içerisinde yer alan adenokarsinom olgularında, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)) mutasyonu yaklaşık %10 sıklıkla görülmektedir. Hedeflenmiş tedavi ajanı olan erlotinib EGFR inhibitörü olarak etki eden bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Hastaların yaklaşık %4'ünde ise, translokasyon sonucu oluşan EML4-ALK (Ekinoderm mikrotübül ilişkili protein-benzeri 4/Anaplastik lenfoma kinaz) füzyon proteini saptanmaktadır. Krizotinib bu proteinin kontrolsüz kinaz aktivitesini baskılamak üzere geliştirilen bir tirozin kinaz inhibitörüdür (5). Ancak yapılan çalışmalarda bu hedefe yönelik ajanlara tedavinin başlangıcında veya daha

sonra direnç geliştığının gösterilmiş olması özellikle EGFR sinyal yolağının düzenlenmesinde etkili olan mekanizmalarla ilgili yeni araştırmalara ihtiyaç doğurmuştur. KHDAK gelişiminde farklı mekanizmaların da karsinogenez sürecinde rolü olmakla birlikte, kanseri başlatıcı etkenin EGFR'nin aktive edici mutasyonunun varlığı olduğu ve bu yolağın hedeflenmesinin önemli bir strateji olduğu düşünülmektedir (6).

Serum ve Glukokortikoid ile İndüklenebilen Kinaz (serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK)) ailesinin üyesi olan SGK-1, bazı hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından aktivitesi düzenlenen, epitelyal iyon taşınması ve sodyum metabolizmasında rolleri olan bir proteindir (7). SGK-1 ekspresyonunun, mRNA promotor bölgesindeki hormone responsive elementler nedeniyle hormonal düzenlenmesinin yanı sıra aktivasyonu ve kinaz fonksiyonlarını kazanması için EGFR gibi birçok büyüme faktörü reseptör sinyal yolağı kaskadının ortak substratı olan *mammalian Target of Rapamycin Complex 2* (mTORC2) tarafından fosforile edilerek Fosfoinozidit Bağımlı Kinaz 1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1)) tarafından fosforile edilmeye hazırlanması gerektiğinin gösterilmesi, SGK-1 in büyüme faktörü sinyal yolları ile ilişkisinin araştırılmasının önemini ortaya koymuştur (7). Ayrıca normal dokularda düşük düzeyde eksprese edilmesine rağmen farklı kanser dokularında artmış SGK-1 ekspresyonunun saptanması, SGK-1'in karsinogenezdeki rolünün ve kinaz fonksiyonu inhibisyonunun karsinogenez açısından öneminin farklı araştırmalara konu edilmesine yol açmıştır. Literatürde SGK-1 inhibitörü olarak ilk bildirilen ajan olan GSK650394'ün baş boyun tümörlerinde platin bazlı ajanlar ile kombinasyonunun sinerjistik etkisi gösterilmiştir (8, 9). Yakın zamanda KHDAK hücre hatlarında da SGK-1'in artmış ifadesinin proliferasyon ve migrasyonla ilişkili olduğu ve SGK-1 susturulmasının KHDAK hücrelerinde proliferasyonu azalttığı gösterilmiş olmasına rağmen SGK-1'in kinaz fonksiyonunun inhibisyonunun KHDAK'deki rolü halen bilinmemektedir. (10).

SGK-1 substratlarından biri olan ve *N-myc downregulated gene* (NDRG) ailesinin bir üyesi olan NDRG1 proteini, kinaz özelliği olmayan ve çeşitli kanserlerde metastaz baskılayıcı özellikleri gösterilmiş olan bir proteindir (11). NDRG1 fosforilasyonunun biyolojik etkileri henüz tam olarak ortaya konmamıştır; ancak

fosforilasyonun NDRG1'in inaktivasyonu ve proteozomal degradasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (12). Yakın zamanda NDRG1'in ekspresyonunun artırılmasının pankreas ve kolon kanseri hücre dizilerinde EGFR sinyal yolağı aktivasyonunu inhibe edici özellikleri gösterilmiştir (13). Ancak NDRG1 fosforilasyonunun inhibisyonu ile EGFR sinyal yolağı ve KHDAK hücre proliferasyonu arasındaki ilişki henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada, SGK-1 inhibitörü olan GSK650394 ile SGK-1'in farmakolojik inhibisyonunun A549 ve H1299 KHDAK hücre hatlarında EGFR aracılı sinyal yolağı ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri DSÖ tarafından bronş, bronşiyol ve alveol epitelinden gelişen tümörler olarak tanımlanmaktadır (3). Dünya genelinde ve ülkemizde kanser ilişkili ölümler içerisinde en fazla pay akciğer kanserininindir (1, 14). Ayrıca ülkemizde kanser tipleri açısından değerlendirmede erkeklerde insidans hızı en yüksek olan kanser tipinin akciğer kanseri olduğu saptanmıştır (14). Akciğer kanseri için dünya genelinde en önemli risk faktörü tütün kullanımınıdır; sigara içiciliği başta olmak üzere nargile, tütün çiğneme gibi tütün kullanımının tüm tiplerinin akciğer kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir (1). Akciğer kanserlerinin yaklaşık %90'ına tütün kullanımının neden olduğu saptanmıştır (15). Bununla birlikte tütün ürün kullanıcılarının yalnızca %10'unda akciğer kanseri geliştiğinin izlenmesi, genetik ve epigenetik faktörlerin ve tütün kullanımı dışındaki diğer risklerin akciğer kanseri gelişiminde önemli olduğunu göstermektedir (2). Tütün kullanımı dışında bazı çevresel ve mesleki etkilenmelerin de akciğer kanseri riskini artırdığı saptanmıştır (3). IARC International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı) sınıflamasına göre Grup 1 kategorisinde sınıflandırılan ve insanlar için akciğer kanseri açısından kanserojen özelliği epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan deneyleri ile gösterilmiş olan ajanlar arasında asbest, krom (IV) bileşikler, silika, kaynak dumanı, berilyum, dış ortam hava kirliliği, dizel egzoz dumanı yer almaktadır (16).

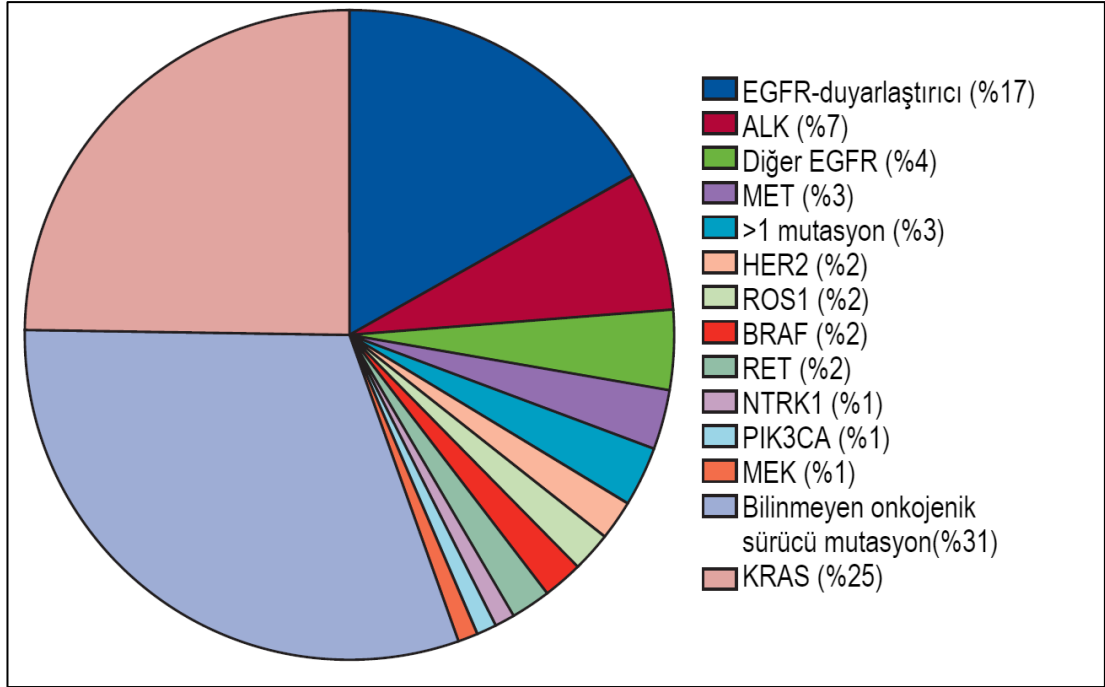
Akciğer kanseri, DSÖ sınıflama sistemine göre küçük hücreli akciğer kanseri, adenokarsinom, yassı hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere dört ana grupta incelenmektedir (3). Adenokarsinom, yassı hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomun küçük hücreli akciğer kanserinden ayrılan benzer özellikleri, bu tümörlerin hep birlikte tüm akciğer kanseri olgularının yaklaşık %85'ini içeren ana grup olan KHDAK olarak adlandırılmasına yol açmıştır (3, 4). KHDAK alt tiplerinden adenokarsinomlar, tüm akciğer kanserlerinin %40'ını oluşturacak şekilde en sık görülen tip olup yassı hücreli karsinomlar tüm akciğer kanseri olgularının %25-30'unu; büyük hücreli karsinomlar ise tüm olguların %5-10'unu oluşturmaktadır (17). KHDAK olgularının %70'inin tanıyı ileri evrelerde almakta olduğu gösterilmiştir (4).

Bununla birlikte, KHDAK olgularında evreye ve bölgesel farklılıklara bağlı olarak 5 yıllık sağ kalım %4 ile %17 arasında saptanmaktadır (5).

KHDAK tedavisinde, TNM evrelemesine göre Evre I, II ve IIIA olan hastalar için cerrahi tedavi, Evre II ve IIIA hastalarda adjuvan olarak ve Evre IV hastalarda ise ana tedavi seçeneği olarak kemoterapi, cerrahi için kontrendikasyon bulunması durumunda, Evre IIIB hastalarda kemoterapi ile eş zamanlı olarak veya Evre IV hastalarda palyatif amaçlarla radyoterapi kullanılmaktadır (17). Bu klasik tedavi rejimlerinin yanı sıra KHDAK biyolojisi ve karsinogenezi ile ilgili araştırmalar neticesinde özellikle akciğer adenokarsinomları için karsinogenezde anahtar rolü olan hücre içi sinyal iletim yollarında rolü olan EGFR ve EML4-ALK gibi hücre içi hedeflere yönelik tedaviler geliştirilmiştir (18). Hedefe yönelik bu tedavilerle, belirli özellikleri olan adenokarsinom olgularında daha iyi tedavi sonuçlarının elde edilmiş olması ile birlikte bu tedavilere başlangıçta veya izlemde direnç gelişebilmesi, KHDAK tedavisinde hücre içi sinyal yollarını hedefleyen yeni tedavi seçeneklerinin ortaya konması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır.

2.2. KHDAK Moleküler Biyolojisinde Önemli Moleküller

KHDAK karsinogenezinde hücresel düzeyde etkili olan mekanizmalar, büyümeyi destekleyen yolların aktive olması ve tümör baskılayıcı yolların inhibe olması şeklinde karsinogenezin ana ilkelerine uygun şekilde birçok genetik ve epigenetik mekanizmayı içermektedir (19). Hücre çoğalmasını destekleyen onkogen aktive edici özelliği olan gen amplifikasyonları, nokta mutasyonları ve yapısal rearanjmanlar, onkojenik yollar üzerinden kontrolsüz sinyal aktivasyonuna yol açmaktadır (19). Bu mutasyonlar tanısal veya prognostik biyobelirteçler olarak kullanılabilir (2). Bununla birlikte tümör hücrelerinin sağkalımının aberan sinyal aktivasyonuna bağımlı olması durumuna “onkogen bağımlılığı” denmektedir ve bu özellik, ilgili genetik değişikliği hedefe yönelik tedaviler için ideal adaylar haline getirmektedir (19). Bununla birlikte KHDAK’de histolojik alt tiplerle de ilişkili olarak bu genetik değişiklikler değişen sıklıklarda görülmektedir (Şekil 2.1) (5). Bu bölümde KHDAK moleküler biyolojisinde önemli rolleri bulunan EGFR, KRAS, ALK, ROS1 gibi hücre içi sinyal iletim yollarında rol alan moleküllerle birlikte KHDAK gelişiminde rolü bulunan bazı tümör supresör genlerden bahsedilecektir.

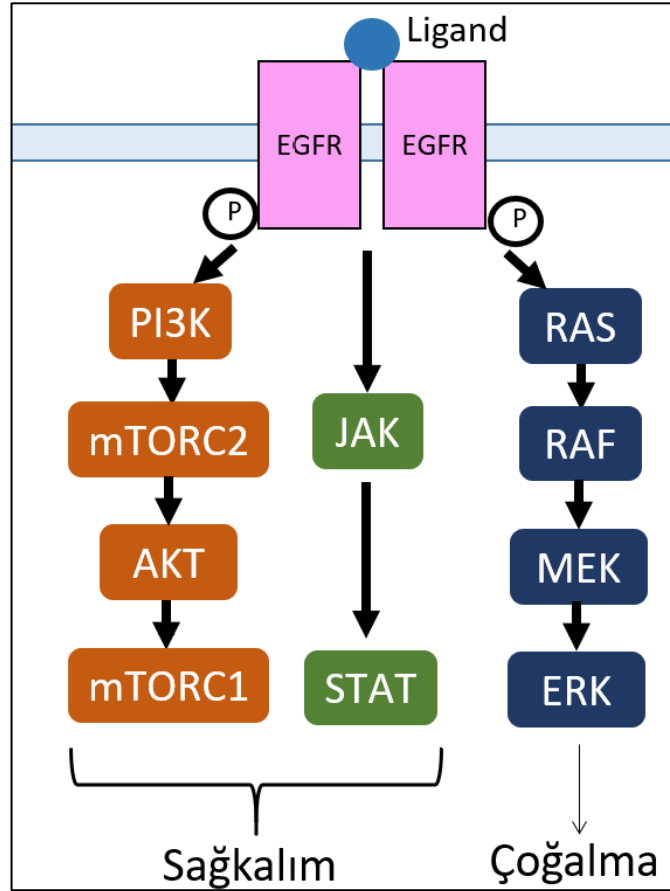


Şekil 2.1. Akciğer adenokarsinomunda sürücü onkogen mutasyonları sıklığı. (Hirsch F. R., Scagliotti G. V., ve ark., 2012'den (5) uyarlanmıştır.)

2.2.1. EGFR

EGFR 7. kromozomun kısa kolunda yer almakta ve hücre dışında bir ligand bağlayan kısmı ve tirozin kinaz aktivitesi olan bir bölgeyi de içeren hücre içi kısmı olan transmembran bir reseptörü kodlamaktadır (6, 19). EGFR, *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene* (ErbB)/HER İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü isimli tirozin kinaz reseptör ailesinin bir üyesidir ve bu ailenin diğer üyeleri HER2/c-neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) ve HER4 (ErbB4)'dir (6). Ligandı olan EGF'yi bağlayan reseptör homodimer veya EGFR ailesinin başka bir üyesi ile heterodimer oluşturacak şekilde dimerizasyona uğramakta ve tirozin kinaz bölgesi aktive olmaktadır (19). EGFR aktivasyonu ile PI3K/AKT/mTOR (Fosfoinozidit 3-Kinaz/*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*/mammalian Target Of Rapamycin), RAS/RAF/MAPK (*Rat Sarcoma-Mitogen Activated Protein Kinase*) ve JAK/STAT (*JANus kinase – Signal Transducer Activator of Transcription*) sinyal yolları aktive olmaktadır (Şekil 2.2) (18, 19). EGFR hücre çoğalması, sağkalımı,

neovaskularizasyon, invazyon ve metastaz gibi birçok onkojenik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (19).



Şekil 2.2. EGFR aracılı sinyal yolağı. (Wu K., House L., ve ark., 2012'den (18) uyarlanmıştır.)

KHDAK'te EGFR aracılı sinyal yolağının öneminden Bölüm 2.3'te daha detaylı bahsedilecektir.

2.2.2. KRAS

KRAS (*Kirsten ras oncogene homolog*), *RAS* proto-onkogen ailesinin bir üyesidir ve hücre çoğalması, diferansiyasyon ve sağkalımını düzenleyen sinyal iletim yollarında kritik rolü olan bir G-proteini kodlamaktadır (20). Ras proteinleri guanozin difosfat (GDP) bağlı formlarında inaktif olup büyüme faktörü reseptörleri sinyal kaskadı aktive olduğunda guanozin trifosfat (GTP) bağlı aktif forma geçerek kaskadın aşağısında yer alan MAPK, RAS/RAF/MEK/MAPK ve PI3K yollarını aktive eder (19). KRAS, EGFR gibi birçok büyüme faktör reseptörünün sinyal iletim

yolaklarında rol oynamaktadır. KRAS'ın sürekli aktive olmasına neden olan ve proteinin GTPaz aktivitesini bozan aktive edici mutasyonlar, hücre çoğalmasını uyaran birden fazla yolda sinyal artışına sebep olmaktadır (21).

KHDAK tiplerinden olan akciğer adenokarsinomlarında, *KRAS* aktive edici mutasyonları en sık mutasyonlar olup olguların %25-40'ında görülmektedir (19). *KRAS* mutasyonları Asya popülasyonlarıyla karşılaştırıldığında Batı popülasyonlarında daha sık olarak ve aynı zamanda erkekler ve sigara içicilerinde daha sık saptanmaktadır (19). Bununla birlikte *KRAS* mutasyonları küçük hücreli akciğer kanserleri ve yassı hücreli akciğer kanserlerinde çok nadiren saptanmakta veya saptanmamaktadır, adenokarsinom olgularındaki *KRAS* değişiklikleri ise sürücü mutasyonlardır ve *EGFR* mutasyonlarla bağlantılı olarak değildir (19). Bununla birlikte *KRAS* mutasyonları *EGFR* sinyal kaskadının aşağısında kalan yolların sürekli aktivasyonuna neden olduğundan *KRAS* mutant tümörler *EGFR* tirozin kinaz inhibitörlerine dirençlidir (22).

2.2.3. BRAF

BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), sinyal kaskadında *KRAS*'ın aşağısındaki efektör bir protein olan ve hücre çoğalması ve sağkalımının düzenlenmesinde rolü olan MAPK sinyal yolağının aktive eden bir serin/treonin kinazı kodlamaktadır (19). KHDAK olgularının %2-3 gibi az bir kısmında *BRAF* aktive edici mutasyonları saptanmaktadır (5, 19).

2.2.4. MEK

MEK veya MAPK1, RAS aktivasyonu sonrasında kaskadın aşağısındaki moleküllerden biridir ve sinyal yolağının devamındaki MAPK2 ve MAPK3'ün aktive edilmesine neden olmaktadır (19). *MEK1* somatik mutasyonu izlenen az sayıda KHDAK olgusu bildirilmiştir; akciğer adenokarsinomlarının %1'inde *MEK1* mutasyonu saptanmaktadır (5, 19).

2.2.5. HER2

HER2/ERBB2 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2) geni EGFR gibi bir ErbB reseptör ailesi üyesi olan membrana bağlı bir reseptör tirozin kinazı kodlamaktadır (23). Ancak diğer ErbB reseptörlerinden farklı olarak doğrudan ligand bağlamayan HER2 bu reseptör ailesinin diğer ligand bağlayan üyeleri ile heterodimer oluşturmaktadır (24). KHDAK'lerinin %20'sinde artmış ekspresyon, %2'sinde gen amplifikasyonu ve %1,6-4'ünde aktive edici mutasyonu bulunduğu gösterilmiştir (19).

2.2.6. PI3K/AKT/mTOR

PI3K/AKT/mTOR yolu, hücre çoğalması, sağ kalımı, farklılaşması, adhezyon ve motilitesinde rol alan önemli bir sinyal iletim yoludur; bu yolak, EGFR, HER2, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi çeşitli membran tirozin kinaz reseptörleri aktivasyonu ile aktive edilir (19). Aktive olan reseptör tirozin kinazlar PI3K'ı, fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat (PIP2)'ı fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfat (PIP3)'a çevirdiği membrana çeker, oluşan PIP3 AKT'ı membrana PI3K ve mTOR tarafından fosforile edildiği membrana çeker. mTOR, kaskadın aşağısında da AKT'ın hedeflerinden biri olan bir serin/treonin kinazdır (25). Aktive olan AKT, hücre çoğalması ve sağkalımı ile ilişkili birçok hedefin aktive etmektedir (25). Bununla birlikte yolğun RAS/RAF/MEK gibi diğer yollarla da ilişkisi vardır; RAS PI3K'ı doğrudan aktive edebilmektedir (25).

PI3K/AKT/mTOR yolğunun regülasyonu KHDAK olgularının %50-70'inde bozulmuştur (19). Kanser Genom Atlası projesinde yer alan yassı hücreli akciğer karsinomu olgularının %47'sinde PI3K yolğında önemli değişiklikler saptanmıştır. Bu yolğun aktivasyonu *EGFR*, *KRAS*, *PI3K* veya *AKT* mutasyonu ile *PIK3CA* amplifikasyonu ve bir tümör supresör gen olan *PTEN*'in negatif regülasyonunun kaybı ile gerçekleşmektedir (25-27).

2.2.7. ALK

Bir reseptör tirozin kinaz olan ALK'ın rearanjmanları, en sık hücre içi kinaz bölgesinin EML4'ün amino ucuyla füzyonu şeklinde akciğer kanserlerinin bir bölümünde izlenmektedir (19). ALK rearanjmanları KHDAK popülasyonunun yaklaşık %4'ünde izlenmektedir (28). Daha genç olan ve tütün kullanım öyküsü bulunmayan veya tütün kullanımı düşük düzeyde olan hastalarda daha sık izlenmekte ve neredeyse sadece adenokarsinom olgularında izlenmektedir (19). Bu olgularda tirozin kinaz inhibitörü olan krizotnib tedavide kullanılmaktadır (5).

2.2.8. MET

7. kromozomun uzun kolunda yer alan *MET* proto-onkogeni hepatosit büyüme faktörü reseptörü olarak da adlandırılan bir tirozin kinaz reseptörünü kodlamaktadır (29). Ligandı olan hepatosit büyüme faktörü bağlandıktan sonra homodimerizasyon sonrasında kinaz aktivasyonu ve sinyal kaskadının devamında yer alan RAS/RAF/MEK/MAPK, PI3K/AKT ve c-SRC kinaz yolları aktivasyonu gerçekleşmektedir (6). KHDAK'de *MET* amplifikasyonu hiç tedavi almamış hastalarda %1-7 arasında saptanmaktadır (19). *MET* amplifikasyonu ile PI3K/AKT yolağının EGFR'yi by-pass ederek aktive olması, bu tümörlerin EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine dirençli olmasına neden olmakta ve bu inhibitörlere kazanılmış direnç gelişen hastaların yaklaşık %20'sinde *MET* amplifikasyonu saptanmaktadır.

2.2.9. ROS1

ROS1 6. kromozomun uzun kolunda lokalize olan ve protein kinaz bölgesinde ALK ile yüksek homolojisi bulunan bir transmembran tirozin kinaz reseptörü kodlayan bir proto-onkogendir (30). ROS1 aktivasyonu PI3K/AKT/mTOR, STAT3 ve RAS/MAPK/ERK yollarında sinyal aktivasyonuna sebep olmaktadır (30). ROS1 gen rearanjmanları KHDAK olgularında saptanmakta ve daha genç, tütün kullanım öyküsü olmayan ve Asya kökenli olgularda daha sıklıkla saptanmaktadır (31). ROS rearanjmanı saptanan olgular da ALK ve MET inhibitörü krizotinib tedavisine duyarlıdır (5).

2.2.10. RET

10. kromozomun uzun kolunda bulunan *RET* geni bir reseptör tirozin kinaz proteinini kodlamaktadır ve kromozom rearanjmanı ile RET aktivasyonu akciğer kanseri olgularının sınırlı bir kısmında saptanmaktadır (32). *ALK* ve *ROSI*'e benzer şekilde *RET* rearanjmanlarının da tütün kullanma öyküsü olmayan adenokarsinom olgularında daha sık görüldüğü saptanmaktadır (32).

2.2.11. FGFR1

FGFR1 (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1), MAPK ve PI3K yollarının aktivasyonu ile hücre çoğalması üzerine etkili olan bir membran reseptör tirozin kinazdır. Yassı hücreli karsinom olgularının yaklaşık %20'sinde amplifikasyonu saptanmasına rağmen adenokarsinom olgularında FGFR1 ile ilgili anormallikler sık değildir (33).

2.2.12. Tümör Supresör Genler

Tümör supresör genler normal hücre büyümesinin önemli negatif düzenleyicileridir. Tümör supresör gen fonksiyonunun kaybı karsinogenezde önemli bir mekanizmadır ve Knudson'un iki vuruş hipotezinde belirtildiği üzere iki gen allelinin de inaktive edilmesi gerekmektedir (34). Bir allel sıklıkla mutasyon, epigenetik susturma veya diğer bozukluklarla inaktive olurken diğer allel sıklıkla LOH loss of heterozygosity (heterozigotluğun kaybı) olarak adlandırılan ve kromozomun bir bölgesinin delesyon, dengeli olmayan translokasyon veya mitotik rekombinasyon ile kaybedildiği mekanizmalarla kaybolur (19). Akciğer kanserinde sıklıkla inaktive olan tümör supresör genler arasında *TP53*, retinoblastoma 1 (*RBI*), serin-treonin kinaz 11 (*STK11*), *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A* ve *PTEN* bulunmaktadır (35-37).

TP53

TP53, 17. Kromozomun kısa kolunda yer alan, hasarlı DNA bölgelerini tanıyıp bağlanabilen ve bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynayabilen bir fosfoproteindir (38). DNA hasarı veya karsinojenik stres TP53'ü uyarmakta, TP53 de siklin bağımlı

kinaz inhibitörlerinin ekspresyonunun uyararak DNA tamiri veya apoptozun başlatılması için hücre siklusunun durmasını sağlamaktadır (19). TP53 inaktivasyonu akciğer kanserinde görülen en önemli genetik bozukluklardan biridir ve KHDAK olgularının yaklaşık %65'inde saptanmaktadır (39). Bununla birlikte 74 araştırmanın verilerinin değerlendirildiği bir meta analizde protein ekspresyonu veya mutasyon analizi ile saptanan p53 anormalliklerinin KHDAK için kötü prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır (40).

PTEN

10. kromozomda yer alan PTEN, PI3K/AKT/mTOR yolağını PIP3'ü defosforile ederek inhibe eden bir fosfataz proteini kodlamaktadır (19). PTEN'in azalmış ekspresyonu KHDAK olgularının %75'inde; mutasyonları ise olguların %5'inde saptanmakta ve bu mutasyonlar adenokarsinom olgularına kıyasla yassı hücreli karsinom olgularında daha sık saptanmaktadır (41, 42).

LKB1 (STK11)

LKB1 (STK11) mTOR'u inhibe eden bir serin-treonin kinazı kodlayan bir tümör supresör gendir ve hücre siklusu, kromatin yeniden modellenmesi, hücre polaritesi ve enerji metabolizması gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rolünün olduğu saptanmıştır (19). Özellikle akciğer adenokarsinom olgularında çeşitli somatik mutasyon ve delesyonlarla inaktivasyonu %11-30 sıklıkta izlenen *LKB1* bozuklukları *TP53* ve *KRAS*'tan sonra akciğer adenokarsinomlarında üçüncü en sık genetik bozukluktur (19).

p16^{INK4A}-Siklin D1-CDK4-RB yolağı

p16^{INK4A}-RB yolağı hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçişini düzenlemektedir. *RB1*, hücre siklusunun G1/S geçişini transkripsiyon faktörü E2F1'i bağlayarak düzenleyen RB proteinini kodlamaktadır. RB1'in, KHDAK olgularının %10-15'inde inaktive olduğu saptanmıştır (43). KHDAK olgularında yolağın daha sık olarak siklin D1, CDK4 ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p16^{INK4A} (CDKN2A) (37). p16^{INK4A}'in KHDAK olgularının %80'inde delesyon, inaktive edici mutasyon veya metilasyonla inaktive olduğu saptanmaktadır (44). İlaveten, KHDAK olgularının

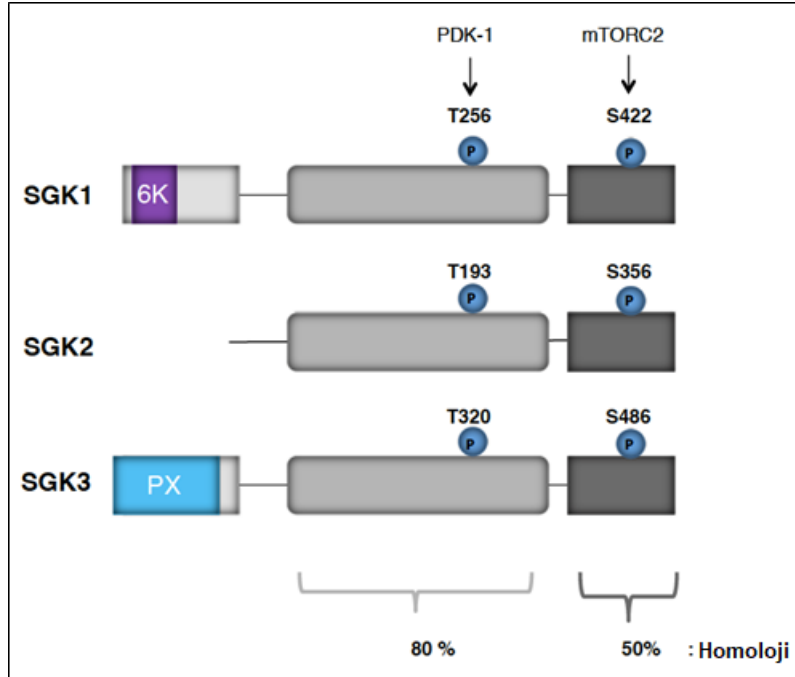
%40'ında siklin D1'in gen amplifikasyonu veya diper mekanizmalarla ekspresyonunda artış olduğu saptanmaktadır (45).

2.3. KHDAK'de EGFR Aracılı Sinyal Yolağının Önemi

KHDAK'lerinde histolojik tipte de ilişkili olarak akciğer adenokarsinomlarda hedefe yönelik tedavi seçenekleri arasında yer bulmasıyla klinik açıdan önemi de artmış olan EGFR aracılı sinyal yolağında, artmış sinyal uyarısı ile ilişkili mekanizmalar reseptörün tirozin kinaz aktivitesinin sürekli olmasına neden olan aktive edici mutasyonlar, artmış reseptör ekspresyonu ve artmış gen kopya sayısıdır (19). KHDAK olgularının %40-80'inde EGFR ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (2). EGFR aktive edici mutasyonlar Batılı hasta gruplarının %10-15'inde, Asyalı hasta gruplarının ise %30-40'ında saptanmaktadır. KHDAK'ta *EGFR* mutasyonları hücre içi tirozin kinaz bölgesinin ilk 4 ekzon'unda saptanmaktadır (19). Bu mutasyonların en sık görüleni, %45 sıklıkla ekzon 19'da izlenen in-frame delesyonlardır; ikinci sıklıkta göülen mutasyonlar ise ekzon 18'de izlenen L858R'de izlenen nonsense mutasyondur (19). Bu mutasyonlar dışında daha az sıklıkta saptanan, EGFR tirozin kinazi inhibitör tedavilerine direnç ile ilişkili olan ve ekzon 20'de izlenen mutasyonlar bulunmaktadır. Bu mutasyonlardan T790M mutasyonunun EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine kazanılmış direnç olgularının %50'sinde bulunduğu gösterilmiştir (46). Akciğer kanserlerindeki *EGFR* mutasyonlarının neredeyse tamamı akciğer adenokarsinomlarında saptanmaktadır; mutasyonlar kadın, genç ve tütün kullanım öyküsü olmayan kişilerde daha sık saptanmaktadır (19).

2.4. Serum ve Glukokortikoid ile İndüklenebilen Kinaz -1

SGK-1 bir serin/treonin kinazdır; SGK-2 ve SGK-3 ile birlikte üyesi olduğu SGK ailesi AGC (PKA-, PKG-, PKC-ilişkili) kinaz grubunda yer almaktadır (Şekil 2.3) (7, 8, 12). Yapısal olarak N-terminal değişken bölge, katalitik bölge ve C-terminal kuyruktan oluşmaktadır (47). Ailenin üç üyesinin katalitik bölgeleri %80 benzerlik taşımaktadır (48).

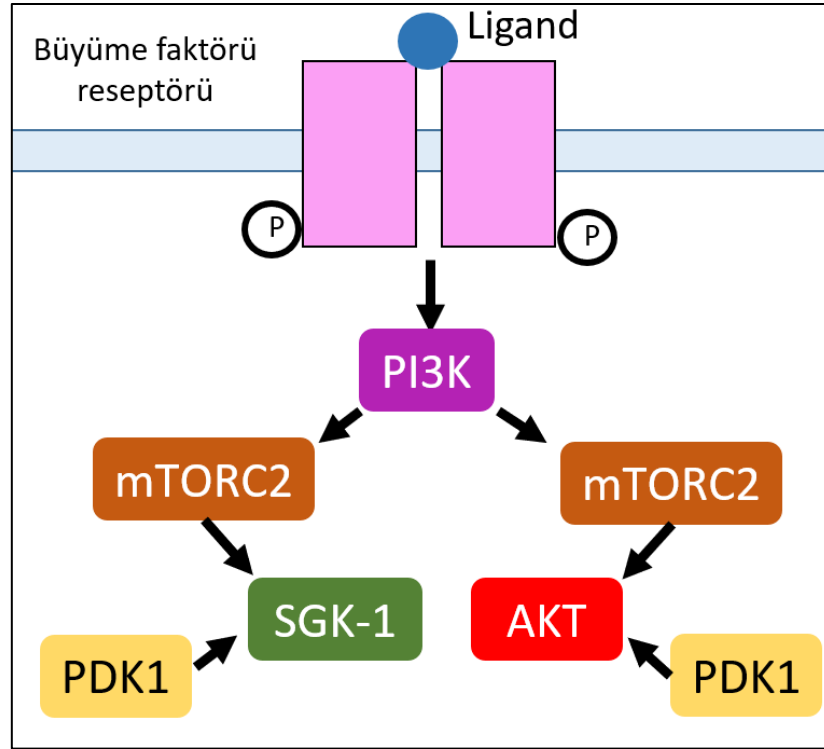


Şekil 2.3. Serum ve Glukokortikoid ile İndüklenebilen Kinaz izoformları. (Gasser J. A., 2014'ten (12) uyarlanmıştır.)

SGK-1 1990'lı yıllarda keşfedilmiştir; farklı düzeylerde insülin, siklik adozin monofosfat (cAMP), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), steroidler, interlökin-2, *transforming growth factor-beta* (TGF- β) tarafından düzenlenmektedir ve epitelyal sodyum kanalları aracılı sodyum taşınmasının düzenlenmesinde peptid ve steroid hormonların kesişiminde yer alan temel bir noktada rol oynadığı düşünülmektedir (8, 48). Epitelyal iyon taşınması, sodyum reabsorpsiyonu ve renal potasyum sekresyonundaki rollerinin yanı sıra implantasyon ve gebelik, myokard hasarı, kas kütlesi, T hücre aktivasyonu, makrofaj motilitesi ve fonksiyonu ve insülin duyarlılığındaki rolleri araştırılmıştır (47). İncelendiği tüm dokularda ekspresyon saptanmakla birlikte SGK-1 ekspresyonunun transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel olarak kontrol edildiği gösterilmiştir (47).

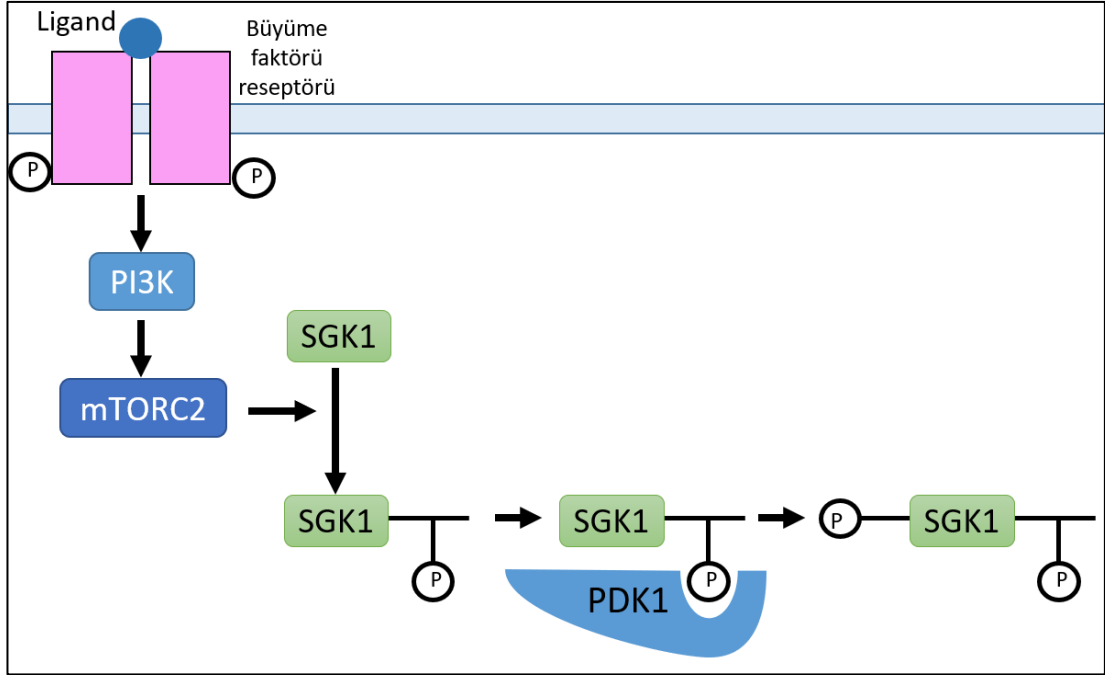
Hücre içi sinyal yollarında SGK-1'in aktivasyonu, AKT aktivasyonu ile benzerlik göstermektedir (Şekil 2.4) (7). AKT aktivasyonuna benzer şekilde, membran reseptör tirozin kinaz aktivasyonu sonrasında PI3K aktivasyonu ile hücre membranında fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfat (PIP3) sentezi sonrasında pleckstrin homoloji (PH) bölgesi taşıyan PDK1 ve AKT gibi proteinlerin PIP3'le etkileşmesi sonrasında AKT'ın sırasıyla mTORC2 ve PDK1 ile fosforile edilmesi sonrasında AKT

aktive olur (7). SGK-1'in yapısında ise PH bölgesi bulunmamaktadır (47). SGK-1 aktivasyon mekanizması da AKT aktivasyonuna benzer şekilde öncelikle mTORC2 ve PDK-1 tarafından fosforilasyonunu gerektirmektedir (Şekil 2.5) (49). PDK1, fosforile edilerek PDK1 bağlanmasına hazır hale getirilmiş SGK-1'i T-loop bölgesinden fosforile ederek aktive etmektedir (48).



Şekil 2.4. AKT'in ve SGK-1'in aktivasyon basamakları. (Di Cristofano A., 2017'den (47) uyarlanmıştır.)

Aktivasyon mekanizmalarındaki benzerliğin yanında SGK-1 ile AKT'in bazı ortak substratları olduğu; ancak her birinin bazı özgün substratlarının da olduğu saptanmıştır (47). Glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK3 β) proteininin SGK-1 ve AKT'in ortak substratı olduğu gösterilmiştir (50). NDRG1 proteini ise SGK-1'in özgün substratlarından biridir (51). NDRG1'den Bölüm 2.6'da daha detaylı bahsedilecektir.



Şekil 2.5. SGK-1'in aktivasyonu. (Garcia-Martinez J. M., 2008'den (49) uyarlanmıştır.)

SGK-1'in patolojik olmayan koşullarda birçok dokudaki ekspresyonunun düşük düzeyde olduğu ve SGK-1 knock-out farelerde sodyum homeostazındaki bazı bozukluklar dışında bir patoloji saptanmadığı gösterilmiştir (8). Bununla birlikte SGK-1'in meme, dil, over, prostat, multipl myelom gibi birçok kanser dokularında ekspresyonunun artmış olduğu saptanmıştır (8). Kanser dokularındaki artmış SGK-1 ekspresyonunu gösteren araştırma sonuçları ile birlikte, SGK-1 ekspresyonu invazyon, metastaz ve tedavi direncini ilgilendiren biyolojik süreçlerle ilişkili olarak tanımlanmaktadır (8). *SGK-1*'in insan tümörlerinde sıklıkla mutasyonu gösterilmese de nodüler lenfosit baskın Hodgkin lenfoma'da örneklerin yaklaşık %50'sinde mutasyon, meme kanseri hastalarının %31'inde amplifikasyon ve %48'inde artmış ekspresyonun gösterildiği araştırma sonuçları mevcuttur (47). Meme kanseri hücrelerinde artmış SGK-1 artışının AKT inhibitörlerine dirençle ilişkili olduğu ve PDK1/SGK-1 sinyal iletiminin AKT'ı bypass eden bir direnç mekanizması olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır (52, 53). Berdel ve arkadaşları ise araştırmalarında baş ve boyun yassı hücreli karsinomunda cis-platin ile birlikte SGK-1'in enzimatik inhibitörünün uygulandığı kombinasyon tedavisinin, her iki ajanın tek başına tedavisine göre daha iyi tümör kontrolü sağladığını ortaya koymuştur (9). SGK-1

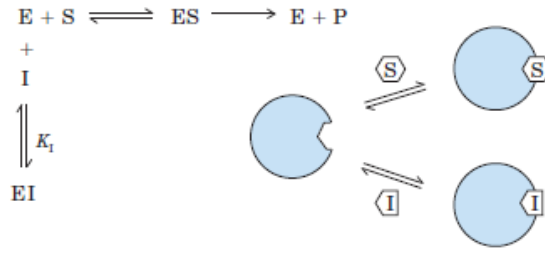
inhibisyonu ile malign gliom hücrelerinde temozolamid direncinin aşılabilirdiği gösterilmiştir (54). 2016 yılında Xiaobo ve arkadaşları tarafından yayınlanan araştırmada KHDAK hastalarından elde edilen tümör dokuları ve normal dokular kıyaslandığında, tümör dokularında artmış SGK-1 ekspresyonu gösterilmiş ve aynı zamanda KHDAK hücre dizilerinde SGK-1'in susturulmasının büyüme ve migrasyonu inhibe edici etkisi gösterilmiştir (10). Bu sonuçla birlikte KHDAK'de SGK-1'i hedefleyen inhibitör tedavilerinin araştırılmasının önemi artmıştır.

2.5. Enzim İnhibisyon Mekanizmaları ve SGK-1 İnhibisyonu

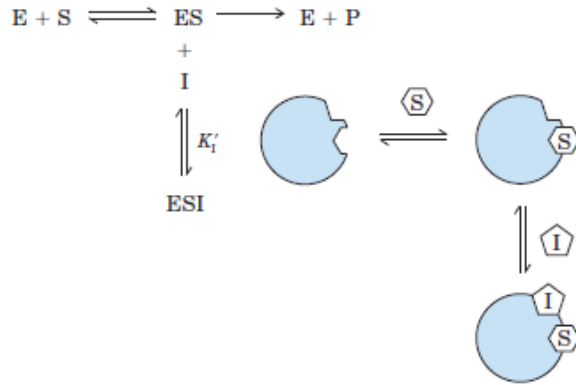
2.5.1. Enzim İnhibisyon Mekanizmaları

Enzim inhibitörleri, kataliz sürecine müdahale ederek enzimatik reaksiyonları yavaşlatan veya durduran moleküler ajanlardır (55). Enzim inhibisyonu reversibl ve irreversibl olmak üzere iki geniş gruba ayrılmaktadır. İrreversibl inhibitörler; kovalent bağlanarak, enzimin aktivitesi için gerekli olan bir fonksiyonel grubunu ortadan kaldırarak ya da enzimle nonkovalent ancak özellikle kararlı bir etkileşime girerek etki gösterebilmektedir. Reversibl inhibisyon ise inhibitörün enzime bağlanma bölgesi ve ortaya çıkan etkiye göre 3 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.6) (55). Kompetitif inhibitörler, enzimin aktif bölgesi için substratla yarışmaktadır. Bu gruptaki inhibitörlerin çoğu, yapısal olarak substrata benzer ve enzimlerle Enzim-İnhibitör kompleksi oluşturur. İnhibitör varlığında substrat aktif bölgeye bağlanamaz. Bununla birlikte substrat konsantrasyonu yeterince artırılırsa beklenen maksimum hıza (V_{max}) ulaşılabilir, bu nedenle V_{max} değişmez. Ancak V_{max} 'ın $1/2$ 'sindeki reaksiyon hızında substrat konsantrasyonu olan K_m artar. Unkompetitif inhibisyonda ise inhibitör enzimin aktif bölgesinden başka bir bölgeye ve sadece Enzim-Substrat kompleksi oluşuktan sonra bağlanır. Bu inhibisyonda V_{max} ve K_m azalır. Mikst inhibitörler de enzime aktif bölge dışında bir bölgeden bağlanır; ancak inhibitör enzime de Enzim-Substrat kompleksine de bağlanabilir. Bu inhibisyonda V_{max} ve K_m azalır. Nonkompetitif inhibitörler, mikst inhibitörler grubu içinde yer alan; ancak K_m 'ı etkilemeyen inhibitörlerdir (55).

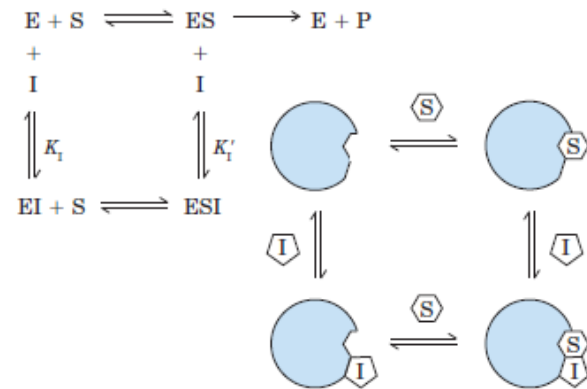
A. Kompetitif inhibisyon



B. Unkompetitif inhibisyon



C. Mikst inhibisyon



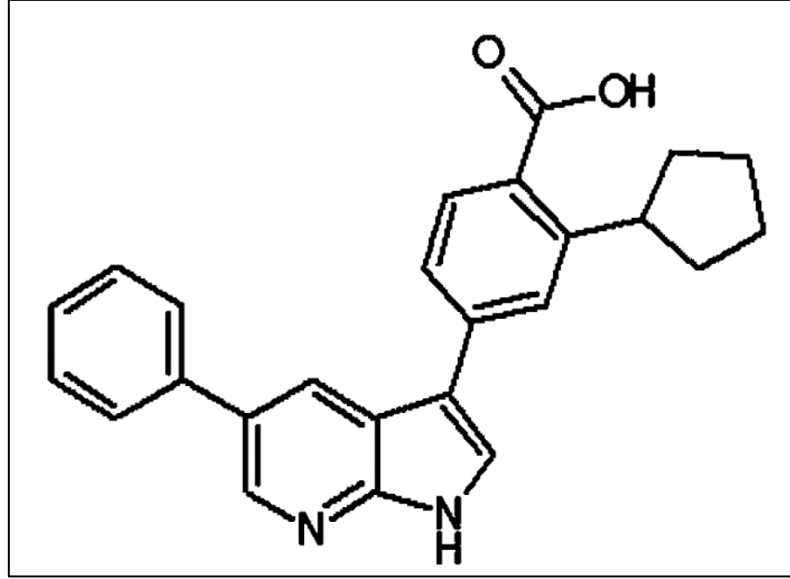
Şekil 2.6. Reversibl inhibisyon mekanizmaları. (Nelson D. L., 2013'ten (55) uyarlanmıştır.)

E: Enzim, **S:** Substrat, **I:** İnhibitör, **P:** Ürün.

2.5.2. SGK-1 İnhibisyonu ve SGK-1 İnhibitörü GSK650394

SGK-1'in kanser dokularında artmış ekspresyonunun/aktivitesinin gösterilmiş olması ile birlikte SGK-1'in özgün ve selektif inhibitörleri geliştirilmiştir. Literatürde muhtemel terapötik etkileri ile birlikte ilk ortaya konan SGK-1 kinaz inhibitörü, heterosiklik bir indazol türevi olan GSK650394'tür (Şekil 2.6) (56). GSK650394, SGK-1'in kompetitif inhibitörüdür (9). GSK650394'ün SGK-1 enziminde ATP bağlanan bölgeye floresan işaretli ATP analogunun bağlanmasını zaman içerisinde azalttığı gösterilmiştir (56). Biyolojik etkileri değerlendirildiğinde ise ilk kez androjen bağımlı prostat kanseri hücrelerinde hücre büyümesini bloke ettiği gösterilmiş olmakla birlikte baş boyun yassı hücreli karsinomu hayvan modelinde tedavide cis-platin ile sinerjistik etki gösterdiği gösterilmiştir (9, 56). GSK650394, SGK-1 ve SGK-2 üzerinde benzer şekilde etkilidir ve SGK-1'e IGF1R, *Rho-associated protein kinase* (ROCK), JAK izoformları (JAK1, JAK3), protein kinaz B izoformları (AKT1, AKT2, AKT3), *dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase* (DYRK1A) ve PDK1'e kıyasla 30 kat; Aurora and *c-Jun N-terminal kinase*'a kıyasla yaklaşık 10 kat daha selektiftir (8).

SGK-1'in literatürde ikinci bildirilen inhibitörü EMD638683 isimli bir benzohidrazid türevidir ve bu ajanla kolon kanseri deneysel modellerinde radyoterapi etkinliğinin arttığı gösterilmiştir (8). 1 µM gibi düşük dozlarda cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA), mitojen- ve stres- ile aktive olan protein kinaz 1 (MSK1), protein kinaz C-ilişkili kinaz 2 (PRK2), ve SGK izoformları SGK-2 ve SGK-3 üzerine etkisinin olduğu gösterildiğinden, ajanın 50 µM gibi daha yüksek dozda kullandığı araştırmalarda diğer kinazlar üzerine inhibitör etkilerinin olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (8). Ayrıca SRC/ABL küçük molekül inhibitörlerden SII13'ün AKT'a kıyasla SGK-1 üzerine daha selektif etkisinin olduğu gösterilmiştir (57).



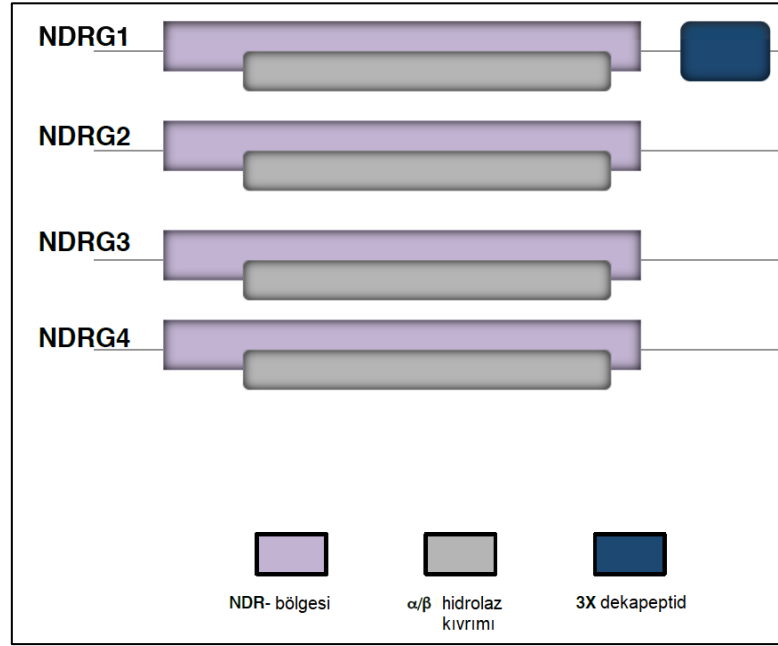
Şekil 2.7. SGK-1 inhibitörü GSK650394'ün kimyasal yapısı. (Sherk A. B., 2008'den (56) uyarlanmıştır.)

2.6. N-myc downregulated gene 1

N-myc down-regulated gene (NDRG) ailesi, NDRG1, NDRG2, NDRG3 ve NDRG4 olmak üzere 4 üyeden oluşmaktadır (Şekil 2.7) (12). Aminoasit dizisi %57-65 benzerlik taşıyan taşıyan dört proteinin hiçbirinin enzimatik aktivitesi bulunmamaktadır (58). *NDRG1*, *NDRG2*, *NDRG3* ve *NDRG4* genlerinin her biri farklı mRNA'lar ile birden fazla izoform şeklinde transkripsiyona uğramaktadır (58).

NDRG ailesinin yaşamın erken dönemlerindeki gelişme, immün sistem, endokrin sinyal iletimi ve sinir sistemi fonksiyonlarındaki görevleri konusunda araştırmalar bulunmaktadır (58). NDRG ailesi üyelerinden olan ve SGK-1'in özgün substratlarından birini kodlayan *NDRG1*, 1990'lı yılların ikinci yarısında insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde homosisteine yanıt veren bir stres yanıt geni olarak keşfedilmiştir (59). NDRG1 ekspresyonunun hipoksi, ağır metaller (nikel, kalsiyum, kobalt ve demir), forbol ester, histon deasetilaz inhibitörleri, retinoidler ve β -merkaptetanol ile uyarılması; onkogenler (N-myc ve c-myc), tumor supresör genler (p53, VHL ve PTEN) ve transkripsiyon faktörü Egr-1 tarafından düzenlenmesi NDRG1'in stresle indüklenen bir protein olduğunu göstermektedir (60). *NDRG1* mRNA ekspresyonunun birçok insan dokusunda mevcut olduğu gösterilmiş olsa da

prostat, beyin, böbrek, plasenta ve bağırsak dokularında düzeylerinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (61).



Şekil 2.8. N-myc downregulated gene izoformları. (Gasser J. A., 2014'ten (12) uyarlanmıştır.)

NDRG1 ekspresyonu ile kanser arasındaki ilişkiyi araştıran araştırmalarda bazı kanser tiplerinde yüksek; bazılarında ise düşük ekspresyon saptanması, etkilenen hücre tipi gibi diğer faktörlere bağlı olarak karsinogenezin uyarılması veya baskılanmasında bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (62). NDRG1 ekspresyonu ile kanser derecesi veya evresi arasında negatif korelasyonun saptandığı birden fazla araştırma sonucundan hareketle NDRG1'in tümör baskılayıcı, metastaz baskılayıcı veya hem tümör hem metastaz baskılayıcı bir protein olduğu görüşü öne çıkmaktadır (62). Ancak NDRG1 ekspresyonu ile kanser evresi arasında pozitif korelasyonun saptandığı bazı araştırma sonuçları, NDRG1'in pleiotropik rolleri olabileceğini veya NDRG1'in farklı izoformlarının karsinogenezde farklı rolleri olabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır (62, 63).

SGK-1'in özgün substratlarından biri olan NDRG1, SGK-1 tarafından Thr328, Ser330, Thr346, Thr356 ve Thr366 rezidülerinden fosforillendikten sonra GSK3 β tarafından Ser342, Ser352 ve Ser362 rezidülerinden fosforile edilmektedir (62). NDRG1 fosforilasyonunun hücre farklılaşması, mitoz sırasında sentromer işlevleri,

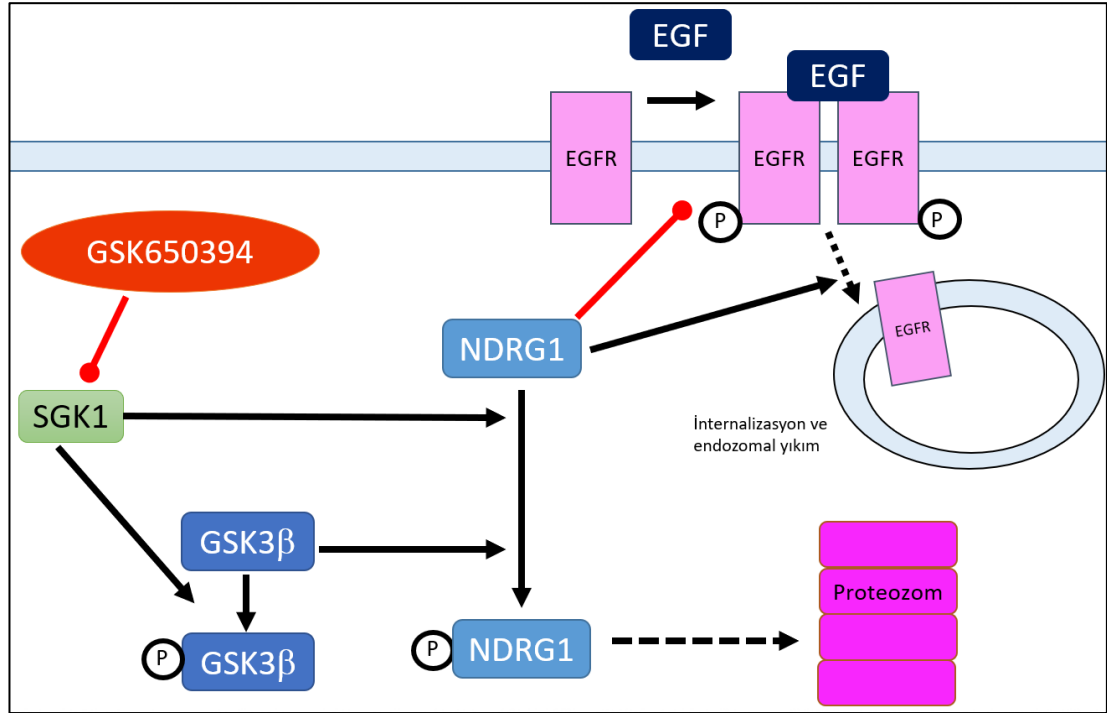
telofaz evresinde hücrenin bölünmesinde ve Alzheimer hastalığı patogeneğinde rolleri ile ilgili araştırmalar bulunmaktadır (62). NDRG1 fosforilasyonunun karsinogenezdaki rolü ile ilgili ise az sayıda araştırma bulunmaktadır. Murakami ve arkadaşları 2010 yılında yayınladıkları araştırmalarında pankreas kanseri hücrelerinde NDRG1'in Ser330 ve Thr346 rezidü fosforilasyonlarının, NF-κB sinyal yolağını ve CXC kemokin ekspresyonunu baskılayıcı fonksiyonu ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (60). Bununla birlikte meme kanseri hücrelerinde NDRG1 fosforilasyonunun NDRG1'in inaktive edilip proteozomal yıkımını başlattığı da gösterilmiştir (12). SGK-1 inhibisyonuna bağlı olarak NDRG1'deki fosforilasyon kaybının karsinogenezdaki rolü araştırılmayı bekleyen bir konudur.

NDRG1'in metastaz baskılayıcı rolleri ile araştırmalar, NDRG1'in bu aktivitesini NF-κB, PI3K/AKT/mTOR ve RAS/RAF/MAPK gibi anahtar rol oynayan sinyal yolakları ile etkileşerek gerçekleştirdiğini göstermektedir (61). NDRG1'in metastaz baskılayıcı rolleri konusunda araştırmaları bulunan Kovacevic ve arkadaşları, 2016 yılında yayınladıkları araştırmalarında NDRG1 ekspresyonunun, EGFR ve diğer ErbB reseptör ailesi üyeleri aracılı sinyal yolaklarını inhibe edici etkisini ortaya koymuştur (13). Bu araştırmada insan pankreas ve kolon kanseri hücrelerinde NDRG1 ekspresyonunun hem total hem de fosforile EGFR ekspresyonunda azalmayla ilişkisinin saptanmış olmasına karşın EGFR mRNA düzeylerinde değişiklik izlenmemesi, araştırmacıları NDRG1'in EGFR sinyal aktivasyonunu inhibe edici etkisinin yanı sıra EGFR internalizasyonu ve yıkımı üzerinde de rolü olabileceği sonucuna ulaştırmıştır (13). Bununla birlikte NDRG1 fosforilasyonunun, EGFR sinyal yolağı üzerine olası etkisi araştırılmayı bekleyen bir konudur.

2.7. SGK-1/NDRG1/EGFR İlişkisi

Güncel yayınlarda karsinogenezdaki önemine ilişkin verilerin saptandığı SGK-1'in aktivasyonunun, EGFR gibi büyüme faktörü reseptörü aracılı sinyal yolak aktivasyonu ile ilişkili olmasının yanı sıra SGK-1'in özđün substratı NDRG1'in EGFR'nin de üyesi olduğu ErbB ailesi üyelerinin aracılı olduğu sinyal yolaklarının aktivasyonuna olan etkilerinin ortaya konmasından hareketle araştırmamızın hipotezini teşkil eden SGK-1/NDRG1/EGFR ilişkisi şekil 2.8'de verilmiştir. Bu

modele göre NDRG1'in EGFR sinyal yolağı üzerindeki inhibe edici etkisi, SGK-1 aktivitesi sonucunda NDRG1'in fosforile edilerek inaktive olması ve proteozomal degradasyonu başlatılması nedeniyle baskılanmaktadır. Bundan hareketle SGK-1'in farmakolojik inhibisyonu, NDRG1 fosforilasyonunun inhibe edilmesiyle aktif NDRG1 havuzunun korunmasını sağlayarak NDRG1'in EGFR sinyal yolağı üzerindeki inhibe edici fonksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olacaktır.



Şekil 2.9. EGFR/SGK-1/NDRG ilişkisi.

2.8. A549 ve H1299 Hücre Dizilerinin Özellikleri

A549 ve H1299 hücre dizileri, insan akciğer adenokarsinomu hücre dizileridir. Bu hücre dizilerinin bazı özellikleri Tablo 2.1’de sunulmuştur (10, 64-66).

Tablo 2.1. A549 ve H1299 hücre dizilerinin bazı özellikleri.

Özellik	Hücre Dizisi	
	A549	H1299
Histolojik tip	Adenokarsinom	Büyük hücreli karsinom
İkiye katlanma süresi (<i>Doubling time</i>)	22 saat	30 saat
SGK-1 ekspresyonu	Var	Bilinmemekte
NDRG1 ekspresyonu	Var	Var (zayıf ekspresyon)
EGFR ekspresyonu	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>
PTEN ekspresyonu	<i>Wild type</i> , güçlü ekspresyon	<i>Wild type</i> , zayıf ekspresyon

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında kullanılan tüm malzemeler ve cihazlar, bütün deneylerin yürütüldüğü Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında bulunmaktadır.

3.1. Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerin, kitlerin ve tamponların adları ve üretildikleri firmaların adları Tablo 3.1’de sıralanmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin, kitlerin ve tamponların adları ve üretici firmalarının adları.

ÜRÜN ADI	ÜRETİCİ ADI ve ÜRETİLDİĞİ ÜLKE
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco by Life Technologies-ABD, Lonza-İsviçre
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) 1640	Gibco by Life Technologies-ABD, Biological Industries-ABD
FBS (Fötal Dana Serumu)	Lonza-İsviçre
L- glutamin	Biochrom-Almanya
Penisilin/Streptomisin	Biochrom-Almanya
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	Sigma Aldrich-Almanya
SGK1 (D27C11) Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
p-NDRG1 (Thr346) (D98G11) XP® Rabbit Anti- human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
NDRG1 (D8G9) XP® Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
p-EGFR (Tyr1068) (D7A5) XP® Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
EGFR Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
p-GSK3β (Ser9) (D85E12) XP® Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
GAPDH (D16H11) XP® Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
Anti-rabbit IgG, HRP-bağlı sekonder antikor	Cell Signaling Technology- ABD
GSK650394	Glaxo-Smith-Kline-İngiltere
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories-ABD

Tablo 3.1.(Devam) Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin, kitlerin ve tamponların adları ve üretici firmalarının adları

β -Merkaptoetanol	Merck-Schuchardt-Almanya
TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions	Bio-Rad Laboratories-ABD
Amonyum persülfat (APS)	Bio-Rad Laboratories-ABD
Tetrametiletilediamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories-ABD
10x Tris/Glycine/SDS (sodyum dodesil sülfat) Buffer	Bio-Rad Laboratories-ABD
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories-ABD
10x Tris Buffered Saline (TBS) Buffer	Bio-Rad Laboratories-ABD
Tween 20	AppliChem-Almanya
5x Transfer Buffer	Bio-Rad Laboratories-ABD
Etil alkol	Limko Kimya-Türkiye
Bovine Serum Albumin (BSA)	VWR Life Science-ABD
Super Signal West-femto Substrate	Thermo Scientific-ABD
“RIPA Lysis and Extraction Buffer” Lizis Tamponu	Thermo Scientific-ABD
NaF	Merck-Almanya
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail	Thermo Scientific-ABD
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific-ABD
Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set	Bio-Rad Laboratories-ABD
Yağsız Süt Tozu	Pınar Süt Ürünleri A.Ş.-Türkiye
Dimetil sülfoksit (DMSO)	WAK-Chemie Medical-Almanya
Dimetilformamid (DMF)	Sigma-ABD
Tripan Mavisi	Sigma-ABD
<i>Calyculin</i>	Cell Signaling Technology-ABD
Trypsin %0.05 (1X)	Lonza-İsviçre
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific-ABD
Kristal viyole	Sigma Aldrich-Almanya
Metil alkol	Emsure, Merck-Almanya
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	<i>Ortadoğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Elif ERSON tarafından temin edildi.</i>

3.2. Aletler ve Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan aletlerin ve cihazların adları ve üretildikleri firmaların adları Tablo 3.2’de sıralanmıştır.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan aletlerin ve cihazların adları ve üretici firmaların adları.

ÜRÜN ADI	ÜRETİCİ ADI ve ÜRETİLDİĞİ ÜLKE
Kodak Gel Logic 1500 Görüntüleme Sistemi	Carestream Healty İne.-ABD
Faz/Kontrast Mikroskop	Olympus-İngiltere
Etüv	Heraeus-Almanya
Otomatik Çalkalayıcı	Heidolph-Almanya
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Eppendorf-Almanya
Spektrofotometre	Spectramax-ABD
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo Electron-ABD
Santrifüj	Heraeus-Almanya
-196 Sıvı Azot Tankı	Taylor Wharton- ABD
Buz makinası	Scotsman AF200-İngiltere
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 1.0 mm thick handcast gels	Bio-Rad Laboratories-ABD
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories-ABD
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories-ABD
Hassas Terazı	Denver Instrument-ABD
Vorteks	Clofton Cycline-İngiltere
Distile Su Cihazı	GFL-Almanya
Çalkalayıcı	GFL-Almanya
Isıtma Bloğu	Techne Dri Bloc-İngiltere
Çeker Ocak	Ünitest-Türkiye
Dikey Akımlı Hava Kabini	Thermo-Electron-ABD
Su Banyosu	GFL-Almanya

Tablo 3.2.(Devam) Çalışmada kullanılan aletlerin ve cihazların adları ve üretici firmaların adları

+4 °C Soğuk Oda	Alarko Carrier-Türkiye
+4 °C Buzdolabı	Bosch-Almanya
-20 °C Derin Dondurucu	Bosch-Almanya
Thoma Lamı	Fuchs Roshenthal-ABD
Thoma Lamı	Neubauer-ABD
<i>Mr. Frosty</i> Dondurma Kabı	Nalgene, Thermo Scientific-ABD

3.3. Hücre Kültürü

İnsan KHDAK hücre dizileri olan A549 ve H1299, 9 Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hilal KOÇDOR tarafından temin edildi. Hücreler American Type Culture Collection (ATCC) tarafından belirtilen kültür şartları ve metoduna uygun olarak çoğaltıldı. A549 hücreleri, %10 FBS (Fetal Bovine Serum), 2 mmol/L L-glutamin, 100 IU penisilin ve 100 pg/ml streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) tam besiyeri ortamında; H1299 hücreleri ise %10 FBS, 2 mmol/L L-glutamin, 100 IU penisilin ve 100 pg/ml streptomisin içeren RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 tam besiyeri ortamında, 25 ve 75 cm² flasklar içinde, 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde çoğaltıldı. Flask içerisinde çoğalan hücrelerin yoğunluk oranları %80-90 arasına ulaştıklarında hücreler tripsinizasyon yapılarak pasajlandı. Hücrelerin ilk pasajı aşamasında kriyoviyal tüplere, tüp başına 1 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde konuldu ve daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere sıvı azot tankında muhafaza edildi. 3. ile 11. pasajlar arasındaki hücreler kullanılarak deneyler yürütüldü. Uygun pasaj sayısına ve deneylerde kullanılacak miktara ulaşan hücreler kaldırıldıktan sonra tripan mavisi ile boyandı ve Thoma Lamı kullanılarak sayıldı. Deneylerde hücrelerin ilaç ile inkübasyonları öncesinde %90'ın üzerinde canlılığın olmasına dikkat edildi.

3.3.1. Tripsinizasyon

Tripsinizasyon yöntemi ile aderan KHDAK hücre hatları olan A549 ve H1299 hücrelerinin flasktan ayrılması sağlandı. Bu işlem için ilk olarak flasklarda bulunan

besiyerleri hücrelere zarar verilmeden serolojik pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. T-25 cm² flask için 2 ml, T-75 cm² flask için 6 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) eklendi. Flask zemini PBS ile yıkandı ve daha sonra PBS serolojik pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Bu sayede aderan hücreler yıkanarak besiyeri artıkları ve tripsinin enzimatik reaksiyonunu indirgeyen FBS ortamdan uzaklaştırıldı. T-25 cm² flask için 1 ml tripsin/EDTA (etilendiamin tetra asetik asit), T-75 cm² flask için 3 ml tripsin/EDTA flask içine koyuldu. Tripsin/EDTA'nın flask içerisindeki aderan hücrelerin hepsine homojen olarak yayılması için flask hafifçe çalkalandı. 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 5-8 dakika arasında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmadığı faz/kontrast (inverted) mikroskopta kontrol edildi. Flask tabanından ayrılmayan hücrelerin yoğunluğuna göre etüv içerisinde birkaç dakika daha inkübe edilerek veya flask hafifçe çalkalanarak hücrelerin flask tabanından ayrılmaları sağlandı. Tripsin/EDTA'nın etkinliğini durdurmak için kullanılan tripsin/EDTA hacminin 3 katı hacimde tam besiyeri eklendi. Besiyerinin etkin bir şekilde tüm hücrelere ulaşabilmesi için serolojik pipet ile pipetaj yapıldı. Flask içerisinde süspansiyon halde bulunan hücreler 50 ml'lik falkon tüp içine alınıp +4 °C'de 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda hücre artıklarının bulunduğu süpernatant falkondan uzaklaştırıldı. Falkon tüpün alt kısmında oluşan hücre pelleti üzerine 6-10 ml arasında tam besiyeri eklendi. Pipetaj işlemi yapılarak süspansiyon hale getirildi.

Pipetaj işlemi sayesinde hücrelerin sayım işlemi öncesi birbirlerinden ayrılması ve lam üzerine tek düşmeleri sağlandı. Süspansiyon içerisinde 10 µl alındı ve 10 µl tripan mavisi ile karıştırıldı. Süspansiyon içerisinde bulunan hücre miktarı 1:1 oranında seyreltilmiş oldu. Tripan mavisi ile karıştırılan süspansiyon Thoma lamının iki ucuna 10'ar µl yayıldı ve mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Thoma lamı üzerindeki her iki uç için ayrı 5 alan seçildi ve bu alanlarda sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması alındı. Ölü hücrelerin parçalanmaya başlayan hücre zarı içerisinde kolayca geçebilen tripan mavisi sayesinde mavi olarak görülen hücreler ekarte edildi. Kullanılan Thoma lamının ölçüleri 0,1 mm x 0,1 mm olup lam ile lamel arasındaki uzaklık 0,1 mm'dir. Bu nedenle hücrelerin sayıldığı her alan 0,001 mm³'e (0,0001 ml'ye) karşılık geldiğinden sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması 10.000 ile çarpıldı.

Hücre süspansiyonu tripan mavisi ile 1:1 oranında seyreltiği için elde edilen değer 2 ile çarpılarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı.

3.3.2. Hücre Pasajı

Hücre sayım işleminden sonra uygun pasaj sayısına ulaşmamış veya deney için ihtiyaç duyulan hücre miktarına ulaşılammış durumlarda, A549 ve H1299 hücreleri pasajlandı. Süspansiyon içerisinde bulunan hücre miktarı göz önünde bulundurularak T-25 cm² flasklar için yaklaşık 500.000 hücre T-75 cm² flasklar için 1-1,25 milyon hücre aktarılacak şekilde pasaj yapılacak flask sayısı belirlendi. Pasaj yapılacak flasklara eşit sayıda hücre süspansiyonları aktarıldı. T-25 cm² flasklar son hacmi 5 ml, T-75 cm² flasklar son hacmi 15 ml olacak şekilde tam besiyeri (A549 hücreleri için DMEM, H1299 hücreleri için RPMI 1640) ile tamamlandı. Flasklar 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Flasklar günlük olarak mikroskop altında incelendi. pH'sı düşmüş ve rengi değişmiş olan, flask içerisinde ölü hücre miktarı artmış olan besiyerleri değiştirildi.

3.3.3. Hücre Dondurma

Daha sonraki deneylerde kullanılmak için A549 ve H1299 hücreleri 1. ve 3. pasajları arasında hücre sayımından sonra, krayovial tüp başına 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde konuldu. Süspansiyon içerisine dilüsyon oranı %10 olacak şekilde DMSO (Dimetil sülfoksit) eklendi. DMSO, besiyerinin donma sıcaklığını düşürmekte ve hücrede buz kristallerinin oluşmasını dolayısıyla hücrenin lizis olma riskini azaltmaktadır. Kryovial tüpler propanol içeren *Mr. Frosty* adlı kademeli soğutma sağlayan kaplar içerisinde 24 saat -86 °C donduruldu. 24 saat süre sonunda kryovial tüpler sıvı azot tankına konularak muhafaza edildi.

3.3.4. GSK650394 alikotlarının hazırlanması

Hücrelerle muamele edilecek SGK-1 inhibitörü olan GSK650394, dikey havalandırılmalı kabin içerisinde steril koşullar altında hazırlandı. Kristalize kuru toz halinde bulunan ajanlar, DMSO içerisinde vorteksenerek final konsantrasyonu 32 mM olacak şekilde çözüldü, ilaç stoğu 500 µl hacimlerde bölünerek -20 °C'de saklandı.

3.4. MTT Assay

MTT yöntemi, canlı hücrelerin mitokondriyal süksinat dehidrogenazları aracılığıyla çözünür metil-tiyazol-tetrazolyum tuzunu, çözünmeyen formazana dönüştürmesi ve çözünmeyen bu kristallerin SDS ile suda çözünür hale getirilmesi ile oluşan renk şiddetinin kolorimetrik olarak ölçümü esasına dayanan bir sitotoksosite testidir. Müdahale edilmeyen kontrol grubundaki renk yoğunluğunun, tedavi grubundaki renk yoğunluğuna kıyaslanmasıyla uygulanan tedavinin hücre canlılığını ne derecede etkilediği saptanmaktadır.

MTT assay deneyleri için 96 kuyulu plaklarda, hücre besiyeri içeren kuyular, hücre içeren ancak ilaç uygulanmayacak olan kontrol kuyuları ile 1 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM ve 32 μM konsantrasyonda GSK650394 inkübasyonu uygulanacak kuyular planlandı. Flaklardaki hücrelerden tripsinizasyon işleminden sonra 96 kuyulu plakların her bir kuyusuna 50 μl besiyeri içerisinde A549 ve H1299 hücreleri için 2.500 hücre eklenecek şekilde hesaplanan hacimlerde hücre süspansiyonları hazırlandı ve kuyulara 50'şer μl eklendi. Hücrelerin kuyu zeminlerine yapışması için 37 °C'de %5 CO₂'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Bu sayede hücreler kuyu zeminine yapıştı. 32 mM konsantrasyondaki GSK650394 alikotlarından kullanılacak konsantrasyonların 2 katı konsantrasyonda olacak şekilde besiyeri içerisinde dilüsyon yapıldı. Hücrelerle muamele edilecek SGK-1 inhibitörü olan GSK650394, dikey havalandırılmalı kabin içerisinde steril koşullar altında hazırlandı. Kristalize kuru toz halinde bulunan ajanlar, DMSO içerisinde vortekslenerek final konsantrasyonu 32 mM olacak şekilde çözüldü, ilaç stoğu 500 μl hacimlerde bölünerek -20 °C'de saklandı. Hücre besiyeri ve hücre içeren kontrol kuyularına ilaçsız besiyerinden, ilaç inkübasyonu uygulanacak kuyulara ise hazırlanmış olan alikotlardan 50 μl hacimde eklendi ve 24, 48 ve 72 saat süreler ile inkübe edildi. Bu sürelerin sonunda PBS içinde 5 mg/ml olacak şekilde çözülerek hazırlanan MTT tüm kuyulara 20 μl hacimde eklendi. Bu işlemden 4 saat sonra ekstraksiyon tamponu olarak, %45 DMF (Dimetilformamid) içinde çözülmüş %23 SDS (Sodyum dödesil sülfat) çözeltisi (pH= 4.7) 80 μl hacimde eklendi. Kör olarak kullanılmak üzere bir kuyuya da 80 μl hacimde ekstraksiyon tamponu eklendi ve plak ışıktan etkilenmeyecek şekilde bir gece boyunca 37 °C'de etüvde inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra plak okuyucu

spektrofotometre cihazına yerleştirildi. 570 nm dalga boyunda kuyuların renk yoğunlukları kantite edildi.

3.5. Kristal Viyole Assay

Kristal viyole assay protokolü için literatür incelemesiyle protokol belirlendi (67). Kristal viyole assay için tripsinizasyon işleminden sonra Western Blot analizi için 12 kuyulu plakların her bir kuyusuna A549 hücreleri için 100, H1299 hücreleri için 200 hücre eklenecek şekilde hücre süspansiyonları hazırlandı ve kuyulara eklendi. Hücrelerin kuyu zeminlerine yapışması için 37 °C'de %5 CO₂'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Bu sayede hücreler kuyu zeminine yapıştı. 24 saat sonra kuyu içerisinde bulunan tam besiyerleri çekildi ve serumsuz besiyeri eklendi. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Bu sayede hücrelerin aynı fazda (G0 fazı) kalmaları sağlanmış oldu. Serum starvasyon işlemi sonrası serumsuz besiyeri kuyulardan uzaklaştırıldı. Kuyu içerisinde bulunan besiyerini çekmeden önce, 32 mM konsantrasyonda DMSO içerisinde çözülmüş halde bulunan ilaç alikotları seri dilüsyon ile seyreltildi. Kuyulara 1 ml 4 µM, 8 µM, 16 µM, 32 µM GSK650394 içeren besiyeri eklendi; hücreler belirtilen konsantrasyonda GSK650394 ile 24 saat inkübe edildi. Kontrol kuyularına ilaçsız besiyerinden 1 ml eklendi. 24 saat sonra tüm kuyulardaki besiyerleri çekildi ve 1'er ml ilaçsız besiyeri eklendi. 12 kuyuluk plaklardaki hücre çoğalması ve koloni oluşumu günlük olarak mikroskop altında değerlendirildi. Kontrol kuyularındaki koloni oluşumu değerlendirilerek 7-10 gün sonra boyama aşamasına geçildi.

Boyamadan önce 12 kuyuluk plaklar 5 dakika süre ile buz üzerinde +4 °C odada bekletildi. 3 kez soğuk PBS ile yıkama yapıldıktan sonra kuyulara 1 ml +4 °C odada soğutulmuş metil alkol eklendi ve plaklar +4 °C odada 10 dakika bekletilerek hücreler fikse edildi. Kuyulardan metil alkol çekildi. Plaklar oda sıcaklığına getirildi ve Tablo 3.3'te belirtilen kristal viyole solüsyonunda 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda kristal viyole solüsyonu kuyulardan çekildi ve plaklar içerisindeki musluk suyu değiştirilen tanka batırılarak yıkandı ve fazla boyanın uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işlemi sonrasında ters çevrilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılan ve bir

gece boyunca kuruyan plaklardan ertesi gün makroskopik ve mikroskopik görüntüleme yapıldı.

Tablo 3.3. Kullanılan kristal viyole solüsyonunun bileşenleri ve kullanılan örnek hacimler.

Kullanılan Bileşenler	Kullanılan Bileşenlerin Örnek Hacimleri
Kristal viyole	60 mg
Metil alkol	3 ml
Distile su	9 ml

3.6. Western Blot Deneyleri

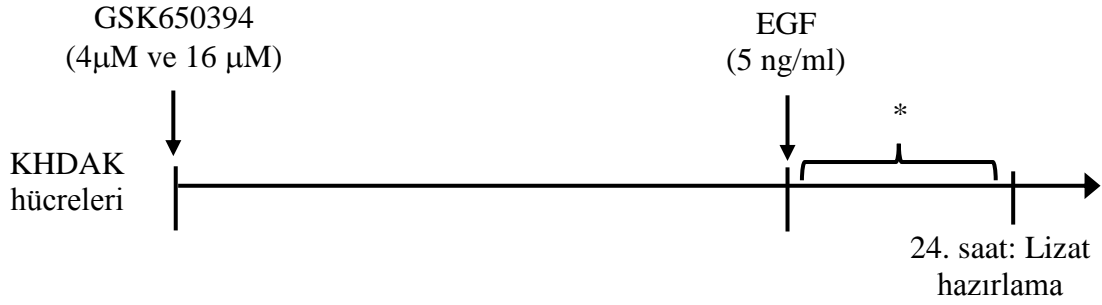
3.6.1. İlaç Uygulama

Hücrelerle muamele edilecek SGK-1 inhibitörü olan GSK650394, dikey havalandırmalı kabin içerisinde steril koşullar altında hazırlandı. Kristalize kuru toz halinde bulunan ajanlar, DMSO içerisinde vortekslenerek final konsantrasyonu 32 mM olacak şekilde çözüldü, ilaç stoğu 500 µl hacimlerde bölünerek -20 °C'de saklandı.

Tripsinizasyon işleminden sonra Western Blot analizi için 6 kuyulu plakların her bir kuyusuna 1×10^6 hücre eklenecek şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. 6 kuyulu plakların her birine 1×10^6 hücre eklendi. Hücrelerin kuyu zeminlerine yapışması için 37 °C'de %5 CO₂'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Bu sayede hücreler kuyu zeminine yapıştı. 24 saat sonra kuyu içerisinde bulunan tam besiyerleri çekildi ve serumsuz besiyeri eklendi. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Bu sayede hücrelerin aynı fazda (G0 fazı) kalmaları sağlanmış oldu. Serum starvasyon işlemi sonrası serumsuz besiyeri kuyulardan uzaklaştırıldı. Kuyu içerisinde bulunan besiyerini çekmeden önce, 32 mM konsantrasyonda DMSO içerisinde çözülmüş halde bulunan ilaç alikotları seri dilüsyon ile seyreltildi. Kuyulara tam besiyeri ile birlikte farklı dozlarda ilaç eklendi. İlaç eklenecek kuyulara 1,5 ml tam besiyeri ve üzerine 500 µl hedef konsantrasyonun 4 katı konsantrasyonda GSK650394 içeren besiyeri eklendi. Bu şekilde hücreler, 4 µM, 8 µM ve 16 µM konsantrasyonda

GSK650394 ile 6 saat ve 24 saat inkübe edildi. Kontrol kuyularına ilaçsız besiyerinden 2 ml eklendi.

EGFR sinyal yolağı aktivasyonunu değerlendirmek için p-EGFR ekspresyonunun saptanmasının planlandığı deneyler için GSK650394 ile 24 saat süreyle inkübasyonun sonunda, son konsatrasyon 5 ng/ml EGF içerecek şekilde eklendi (Şekil 3.1). Literatür incelemesi sonucunda EGF inkübasyonunun çoğu hücre hattında 10-15 dakika şeklinde uygulanmasına rağmen H1299 hücrelerinde EGFR aktivasyonu tepe noktasının, ligand uygulandıktan sonraki 5. dakika olduğu saptandı (64, 68).



Şekil 3.1. EGFR sinyal yolağı aktivasyonunun değerlendirildiği deney planı.

*EGF ligand uyarısı A549 hücreleri için 10 dakika, H1299 hücreleri için 5 dakika uygulandı.

3.6.2. Lizat Hazırlama

Western blot deneyinde kullanılacak olan proteinlerin elde edilebilmesi için lizis tamponu ile hücrelerin lizis edilmesi ve lizat hazırlanması gerekmektedir. Bunun için hücrelerden lizat elde edileceği zaman RIPA tamponu ve diğer bileşenler kullanılarak, hücrelerin lizis olmasını sağlayacak olan lizis tampon hazırlandı (Tablo 3.4).

RIPA tamponu sitoplazmik zarı parçalama özelliğine sahiptir. PIC proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli proteinlerin degradasyonunu ve defosforilasyonunu engellemektedir. EDTA kalsiyum ve demir iyonlarının solüsyonda kalmasını sağlayarak reaksiyona girmesini engeller. Calyculin ve NaF da protein fosfataz inhibitörü olarak kullanılır ve bu sayede fosfo proteinlerin degradasyonu önlenmiş

olur. Lizat hazırlama işlemine başlamadan önce lizis edilecek kuyu sayısının 2 katı kadar 1,5 ml'lik deney tüpü -20 °C dolapta soğutulmalıdır. Lizat hazırlama aşamasında kullanılacak pipet uçları ve PBS soğuk odada bekletilmiş olmalıdır.

Tablo 3.4. Lizis tamponu bileşenlerinin konsantrasyonları ve kullanılan bileşenlerin hacimleri.

Kullanılan Bileşenler ve Final Konsantrasyonları	Kullanılan Bileşenlerin Örnek Hacimleri
RIPA Tamponu	1900 µl
1X PIC (Proteaz İnhibitör Kokteyli)	20 µl
50 mM Calyculin	20 µl
20 mM NaF	40 µl
EDTA	20 µl

Altı plaklı kuyular içerisinde belirlenen saatlerde (6 ve 24 saat) GSK650394 ajanı ile inkübe edilen A549 ve H1299 hücrelerinin inkübasyon süreleri bittikten sonra lizat hazırlanacak hücre plağı etüvden alınarak +4 °C odada buz üstünde 5 dakika bekletildi. Bu aşamadan itibaren tüm işlemler sıcaklık faktöründen dolayı protein degradasyonunu önlemek amacıyla +4 °C odada yapıldı. Plağın 5 dakika süresince buz üstünde bekletilmesinden sonra kuyularda bulunan GSK650394 ve besiyeri uzaklaştırıldı. Kuyuların besiyeri ve ajandan temizlenmesi amacıyla 3 defa soğuk PBS ile kuyular yıkandı. Kuyu ve yıkama başına 400 ml PBS kullanıldı. Devamında her bir kuyuya 400 ml taze olarak hazırlanmış lizis tampon eklendi. 6 kuyulu plak +4 °C soğuk odada bulunan çalkalayıcıda 100 rpm hızda 5 dakika çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra her bir kuyu kazıyıcı (scraper) yardımı ile veya pipet ucunun arka kısmı ile kazındı. Kazıma işleminden sonra 6 kuyulu plak tekrardan 100 rpm hızda 10 dakika çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra her bir kuyuya tekrardan birer dakika kazıma işlemi yapıldı. Kazıma işleminden sonra son defa 100 rpm hızda 5 dakika çalkalandı ve son defa kazıma işlemi yapıldı. Toplamda 3 defa 20 dakika çalkama işlemi ve 3 defa kuyu başına birer dakika kazıma işlemi yapılmış oldu. Yapılan bu işlem ile hücrelerin lizis olması sağlandı. Son kazıma işleminden sonra -20 °C dolapta

soğutulan 1,5 ml'lik deney tüpleri alındı ve lizis edilen örnekler tüplere konuldu. 1,5 ml'lik deney tüplerine konulan örnekler +4 °C'ye soğutulmuş santrifüjde 13.000 rpm'da 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem ile çözültide bulunan atık maddelerin tüpün dibine çökmesi sağlandı. +4 °C soğuk odada dikkatli bir şekilde pellet kaldırılmadan, supernatant mikropipet ile çekilerek önceden 20 °C'de soğutulmuş olan 1,5 ml'lik deney tüplerine aktarıldı. Bu işlemden sonra protein kantitasyonu aşamasına geçildi veya protein lizatları daha sonra kantite edilmek üzere -86 °C buzdolabına kaldırıldı.

3.6.3. Protein Kantitasyonu

Western blot deneyinde kullanılacak olan protein lizatlarının, protein miktarlarının tayini amacıyla *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* ile protein kantitasyonu yapıldı. Kit içerisinde bulunan A ve B solüsyonlarından, deney sırasında kullanılacak hacme göre 50:1 oranında solüsyon hazırlandı. Düz tabanlı 96 kuyulu plakta bulunan kuyulara protein miktar tayini yapılacak protein lizat örneklerinden 10'ar µl eklendi. Ayrıca kantitasyonu yapılacak örneklerin protein miktarlarının belirlenebilmesi amacıyla, içeriğindeki protein miktarı oranları bilinen BSA (Bovine Serum Albumin) protein standartları 96 kuyulu plağın boş olan kuyularına eklendi. 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml ve 0,125 mg/ml olmak üzere toplamda 7 farklı BSA protein standartından 10'ar µl kuyulara eklendi. Son olarak lizat hazırlama aşamasında hücreleri lizis etmek için kullanılan lizis bufferın yapacağı olası ışımanın, proteinlerin yoğunlukları ile oluşan farklı renk yoğunluklarından çıkarılabilmesi amacıyla blank (kör) olarak kullanılacak bir kuyuya 10 µl lizis tamponu eklendi Her bir protein standardı, protein lizatı ve blank olarak kullanılacak lizis tamponu üzerine hazırlanan solüsyondan 200 µl eklendi. Kuyulara yavaş bir şekilde pipetaj yapılarak protein lizatının ve solüsyonun homojen şekilde karışması sağlandı. Kontrolsüz olarak yapılacak pipetaj işlemi koyularda baloncuk oluşumuna yol açabilir. Bu sebepten ötürü, kantitasyon verimliliği düşebilir. Ayrıca, ekleme aşamasının mümkün olduğunca hızlı bir şekilde manipüle edilmesi, ışığa duyarlı olan solüsyondan yüksek verim almak açısından önem arz etmektedir. Tüm kuyulara aynı işlem uygulandıktan sonra 96 kuyulu plak 37°C etüvde ışıktan muhafaza edilerek 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra plak okuyucu spektrofotometre cihazına yerleştirildi. 562 nm dalga boyunda kuyuların renk

yoğunlukları kantite edildi. Kör olarak kullanılan kuyunun renk yoğunluğunun protein kuyularındaki renk yoğunluklarından çıkarıldığı zaman elde edilen renk yoğunluğu salt olarak proteinlerin oluşturmuş olduğu yoğunluk olarak elde edildi. Kantitasyonda kullanılan protein standartlar mg/ml cinsinden olduğu için elde edilen bu değer, 1 ml lizat içerisinde bulunan proteinin mg cinsinden değerini vermektedir. Bu sebepten dolayı örneklerden elde edilen değerler 1 µl lizat içerisinde bulunan protein miktarını µg cinsinden karşılığını vermektedir. Western blot deneylerinde her bir örnekten 10 µg protein kullanılacağı için elde edilen değerleri doğru orantı yaparak 10 µg'ı kullanılacak lizat için kantitasyon sonucu hesaplanan µg/µl değerlerine bölerek kaç µl protein lizati kullanılacağı hesaplandı.

3.6.4. Western Blot ve Protein Analizi

Yükleme tamponu için kullanılacak miktar belirlendikten sonra bu miktarı sağlayacak 4 x Laemmli Sample Buffer ile β-merkaptoetanol 9:1 oranında karıştırılarak yükleme tamponu hazırlandı. Protein kantitasyonu yapılmış olan ve 1,5 ml'lik deney tüplerinde bulunan lizatlardan, kantitasyon sonucu belirlenen miktar ile yükleme tamponu 3:1 oranında ayrı birer 1,5 ml'lik deney tüpüne konulup karıştırıldı. Yükleme tamponunda β-merkaptoetanol bulunması nedeniyle bu işlem çeker ocak içerisinde yapıldı. Tüp içerisine eklenen ve pipetaj yapılarak homojen şekilde karışması sağlanan tamponu, proteinlerin denatürasyonu için önceden ısısı 95 °C'ye getirilmiş olan kuru ısıtma bloğu içerisinde 7 dakika bekletildi. Bu sayede Proteinler denatüre olmuş oldu. Proteinlerin denatürasyonu kullanılacak olan antikorların proteinleri tutunabilmesi açısından önemlidir. Aksi takdirde antikorların proteinlere tutunması imkansızlaşır. Tampon içerisinde bulunan merkaptoetanol proteinlerin disülfid bağlarının indirgenmesini sağlar. Yükleme tamponu içerisinde bulunan LDS maddesi denatüre edilen proteinlerin eksi (-) yük ile yüklenmesini sağlar. Tampon içerisinde bulunan diğer maddelerden biri olan gliserol proteinlerin jel kuyuları içerisine çökmesini sağlamakta ve bir diğer madde olan bromfenol mavisi ise jelde örneklerin görülmelerini sağlamaktadır.

Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Western blot deneyleri için “Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 1.0 mm thick handcast gels” (Biorad) sistemi kullanıldı. Bu sistemde 10 örnek yükleme kuyusu olan jeller hazırlanabilmekte, hazırlanmış olan 1-4 jele aynı anda elektroforez yapılabilir. Jel solüsyonlarının hazırlanması için “TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions” (Biorad) sistemi kullanıldı. Yükleme ve yürütme için kullanılacak jel solüsyonları Tablo 3.5’te belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3.5. Jel hazırlamak için kullanılan çözelti miktarları.

%10 Yürütme Jeli (2 Jel için)	%4 Yükleme Jeli (2 Jel için)
Resolver A → 6 ml	Stacker A → 2 ml
Resolver B → 6 ml	Stacker B → 2 ml
%10 APS → 60 µl	%10 APS → 20 µl
TEMED → 6 µl	TEMED → 4 µl

Jel solüsyonunu hazırlarken amonyum persülfat (APS) ve tetrametiletilendiamin (TEMED) en son eklenecek madde olmalıdır. APS solüsyonda bulunan akrilamidin polimerizasyonunu sağlayan ko-aktivatör madde, TEMED ise katalizör maddedir. Deneylerde en iyi performansı elde edebilmek için APS diğer çözeltilerden farklı olarak taze hazırlandı. APS, 0,1 µg/µl olacak şekilde distile su ile (50 µg APS + 500 µl distile su) çözüldü.

Jel solüsyonunu polimerizasyonu için kullanılacak olan cam sıkıştırma aparatlarının temiz olmasına dikkat edildi. Cam yüzeyi jel solüsyonu dökülmeden önce distile su ve etanol ile temizlenerek kullanıma hazır hale getirildi. Cam sıkıştırma aparatı arasına ilk olarak yürütme jeli solüsyonu eklendi. Kuyuların oluşması için kullanılacak tarağın ucunun denk geleceği yerin yaklaşık 1 cm aşağısına kadar yürütme jeli eklendi. *TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions* sisteminde yükleme

jelinin eklenmesi için yürütme jelinin donmasının beklenmemesi gerekmektedir. Bu nedenle hazırlanan yükleme jeli camların arasına eklendi ve camlar arası boşluk hacmi tamamen dolduktan sonra hemen kuyuların oluşmasını sağlayacak tarak aparat konuldu. Jelin donması için yaklaşık 30 dakika beklendi ve bu süre sonunda taraklar cam arasından dikkatlice çıkarıldı. Bu sayede yükleme jelinin donması ile yükleme yapılacak kuyular oluşturulmuş oldu. Cam arasında bulunan ve kullanıma hazır olan jel yürütme tankı içerisine konuldu. Yürütme tankı içerisine yerleştirilen cam sıkıştırma aparatı içerisinde bulunan jellerin arasına ve dış bölgede bulunan tank içerisine kullanılacak olan 1 x yürütme tamponu (“10x Tris/Glycine/SDS Buffer” Bio-Rad) eklendi. Yürütme tamponunun kuyuların içini doldurması sağlandı. Bu aşamadan sonra lizat örnekleri ve marker kuyulara yüklendi. Örnekler ve marker yüklendikten sonra tankın kapağı kapatıldı ve tank güç kaynağına bağlandı. 50 voltta 5 dakika yürütüldükten sonra 200 voltta 45 dakika yürütmesi sağlandı.

Trans-Blot® Turbo™ Transfer System ile Transfer ve Blotlama

Örneklerin yürütme işlemi bittikten sonra güç kaynağı kapatıldı. 1X yükleme tamponu tankın içerisinden uzaklaştırıldı. İçerisinde SDS jelin bulunduğu cam aparatlar içi dH₂O ile doldurulmuş bir kabın içerisine konuldu. Dikkatli bir şekilde, jelle zarar vermeden cam aparatlar birbirlerinden ayrıldı ve jel su içerisine bırakıldı. Bu aşamadan sonra transfer işlemi gerçekleştireceğimiz *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* transfer sistemi materyalleri hazırlandı. Bu sistemle gerçekleştirilen transfer işlemi yarı-kuru (semi-dry) olarak adlandırılmaktadır. Transfer işleminde kullanılacak tampon Tablo 3.6’da belirtildiği şekilde hazırlandı. “*Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit*” (Bio-Rad) kitinde bulunan PVDF (polivinilidinden florür) membran etil alkolde ıslatıldı. PVDF membran ile iyon rezervuarı olarak görev yapan süngerler transfer tamponunda 5 dakika bekletildikten sonra cihazda bulunan kasetler üzerinde aşağıdan yukarıya “sünger – PVDF membran – jel – sünger” sırasıyla konuldu. Sistem içerisinde bulunan merdane ile üzerinden geçilerek tabakalar arasındaki hava kabarcıkları çıkartıldı. Kaset kapağı kapatılarak cihaza yerleştirildi. Cihazda 5 – 150 kDa ağırlığındaki proteinler için önerilen ayar olan 25 volt akıma ayarlı program (MIXED MW) seçildi. Transfer işlemi sürerken %5’lik BSA (Bovine Serum Albumin) içeren TBS-T (%0,1 TBS-Tween 20) solüsyonu

hazırlandı. MIXED MW programında önceden tanımlanmış olan 7 dakikalık süre sonunda cihaz kapatıldı, kaset çıkarılarak kapağı açıldı. Jelin üstünde bulunan materyaller atıldı. Devamında jelin boyutları baz alınarak PVDF membranın jel dışında kalan bölgeleri membranın kuruma riskinden ötürü hızlı bir şekilde kesildi. Kesilen membran bir kap içerisinde önceden hazırlanmış olan BSA solüsyonuna konuldu. BSA solüsyonu içerisindeki membranın 1-1,5 saat süresince, oda sıcaklığında ve 100 rpm hıza ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde blokasyonu gerçekleştirdi. Solüsyonda bulunan albümin proteinlerin epitoplarına tutunarak blokasyon aşamasından sonra uygulanacak antikor inkübasyonunun spesifitesini arttırmayı sağlamaktadır. Bu sayede görüntüleme esnasında membran, arka planda daha temiz bir görüntü elde etmemizi sağlamaktadır. Blokasyon işlemi bittikten sonra 1X TBS-T ile membran aynı kap içerisinde 3 defa 5'er dakika 100 rpm hızda çalkalayıcıda yıkandı. Bu sayede BSA kalıntıları membran yüzeyinden temizlenmiş oldu.

Tablo 3.6. Transfer işleminde kullanılacak bileşenler ve örnek hacimler.

Kullanılan Bileşenler	Kullanılan Bileşenlerin Örnek Hacimleri
Trans-Blot® 5x Transfer Buffer	20 ml
Etil Alkol	20 ml
Distile Su	60 ml

Blokasyon ve ardından yapılan TBS-T ile yıkama aşamasından sonra membranı primer antikor ile muamele aşamasına geçildi. Bu aşamada, denatüre olmuş proteinleri tek bir determinantını tanıyan, yüksek afinite ve özgüllükte tanıyan monoklonal antikorlar kullanıldı. SGK1, fosforile NDRG1, NDRG1, fosforile EGFR, EGFR, fosforile GSK3 β proteinleri için sırasıyla SGK1 Rabbit Anti- human primer antikor, p-NDRG1 Rabbit Anti- human primer antikor, NDRG1 Rabbit Anti-human primer antikor, p-EGFR (Tyr1068) Rabbit Anti-human primer antikor, EGFR Rabbit Anti-human primer antikor, p-GSK3 β Rabbit Anti-human primer antikor kullanıldı. Kullanılan monoklonal antikorlar %5'lik BSA içeren TBS-T içerisinde 1:1000 oranında dilüe edildi (10 μ l primer antikor + 10 ml %5'lik BSA içeren TBS-T).

Kullanılacak antikorun homojen karışması için solüsyon 3-5 saniye vortekslendi. Dilüe edilen monoklonal antikor membranın bulunduğu kaba eklendi ve +4 °C odada, 100 rpm hızda çalışan çalkalayıcı üzerinde ajite edilerek bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin en az 18 saati geçmiş olmasına dikkat edildi. Bir gece primer antikor membran ile inkübasyonu sonrası antikor membrandan uzaklaştırıldı ve 3 defa 5'er dakika oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde TBS-T ile yıkandı. Bu işlemden sonra primer antikorun görüntülenebilmesi için HRP (*Horseshoe* Peroksidaz) konjuge primer antikorun üretildiği organizmaya karşı üretilmiş sekonder antikor ile inkübasyon aşamasına geçildi. Sekonder antikor olarak Anti-rabbit IgG, HRP-bağlı sekonder antikor kullanıldı. Sekonder antikor 1:10000 oranında %5'lik BSA içeren TBS-T ile dilüe edilerek membran ile 1 saat oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi (10 µl primer antikor + 10 ml %5'lik BSA içeren TBS-T). İnkübasyon süresi bittikten sonra sekonder antikor membrandan uzaklaştırıldı ve son olarak TBS-T ile 3 defa 5'er dakika oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Yapılan yıkama işlemleri sayesinde membran üstündeki olası non-spesifik bağlanmaların temizlenmesi sağlandı. Son yapılan yıkamadan sonra kemolüminesans görüntüleme aşamasına geçildi.

Kemolüminesans Görüntüleme

Sekonder antikor ile inkübasyon ve ardından yapılan TBS-T ile yıkama sonrası membran üzerinde görüntülemek istenilen hedef proteinlerin görüntülenmesi aşamasına geçildi. ECL (*enhanced chemiluminescence*) kiti içerisinde bulunan luminesans madde olan luminol, sekonder antikora konjuge HRP'de bulunan peroksidaz enziminin substratıdır. Bu sayede luminol, peroksidaz enzimi ile reaksiyona girerek peroksidazı okside eder ve 3-aminofthalat açığa çıkar. Açığa çıkan ürün foton saçarak (425 nm) düşük enerji seviyesine iner ve ışımaya oluşur. Meydana gelen bu reaksiyon sonucu inkübe edilen antikorun bağlandığı proteinler bant vererek görünür hale gelir. ECL kiti olarak *Super Signal West- femto Maximum Sensitivity Substrate* kullanıldı ve reaksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Kit protokülüne uygun olarak hazırlanan solüsyon membranın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde eklendi ve 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası solüsyon uzaklaştırıldı ve

membran üzerinde bulunan protein bantları *Kodak Gel Logic 1500* görüntüleme cihazı ile belirlenen pozlama sürelerinde görüntülendi.

GAPDH primer antikoru ile tekrar blotlama

Görüntüleme aşamasından sonra elde edilen protein bantlarının normalizasyonu ve deney sonucunun kontrolünü sağlamak amacıyla gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) proteinlerinin homojenitesine bakıldı. Bunun için hedef protein bant görüntülerini elde ettiğimiz membranı GAPDH primer antikoru ile tekrar blotlama işlemi yapıldı. Görüntüleme işlemi bittikten sonra membran 15 dakika TBS-T içerisinde, oda sıcaklığında, 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Yıkama işleminde sonra blokasyon aşaması olan %5'lik BSA solüsyonu ile 1,5 saat inkübasyon aşamasına geçildi. Devamında 3 defa, 10'ar dakika, oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde TBS-T ile yıkama aşamasına geçildi. Yıkama aşamasından sonra GAPDH Rabbit Anti-human primer antikoru 1:1000 oranında %5'lik BSA içeren TBS-T ile dilüe edilerek primer antikor ile inkübasyon aşamasına geçildi (10 µl primer antikor + 10 ml %5'lik BSA içeren TBS-T). Bir gece boyunca +4 °C odada 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde GAPDH primer antikoru ile inkübasyon aşamasından sonra 3 defa, 5'er dakika, oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde PBS-T ile yıkama aşamasına geçildi. Yıkama aşamasından sonra HRP konjuge seconder antikor ile inkübasyon aşamasına geçildi. Oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde 1 saatlik HRP konjuge sekonder antikor ile inkübasyon aşamasından sonra 3 defa, 5'er dakika, oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde TBS-T ile yıkama aşamasına geçildi. Membran son defa TBS-T ile yıkandıktan sonra kemoluminesans görüntüleme aşamasına geçildi. Görüntüleme sonucunda elde edilen GAPDH bantları ve daha önce elde edilen bantların dansitometrik analizi aşamasına geçildi

Dansitometrik Analiz

Image Studio Lite Ver 5.2 (Li-Cor Biotechnology, ABD) adlı görüntü analiz yazılımı kullanılarak, kemoluminesans görüntüleme ile elde edilen bantların dansitometrik yoğunlukları tespit edildi. Elde edilen 3 bağımsız grubun hedef protein

bantları ile kontrol proteini olarak kullanılan GAPDH protein bant yoğunlukları ile normalize edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Kristal viyole assay sonucu elde edilen koloni sayıları verileri ve *Western Blot* deneyleri sonucu elde edilen protein analizi verileri bağımsız gruplar student t testi ile istatistiksel analizi yapıldı. Yapılan testin sonucunda $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, istatistiksel analizler *IBM® SPSS® Statistics Version 22* (IBM Corporation, ABD) istatistik yazılımı kullanılarak yapıldı.

3.8. Etik Onay ve Araştırma Desteği

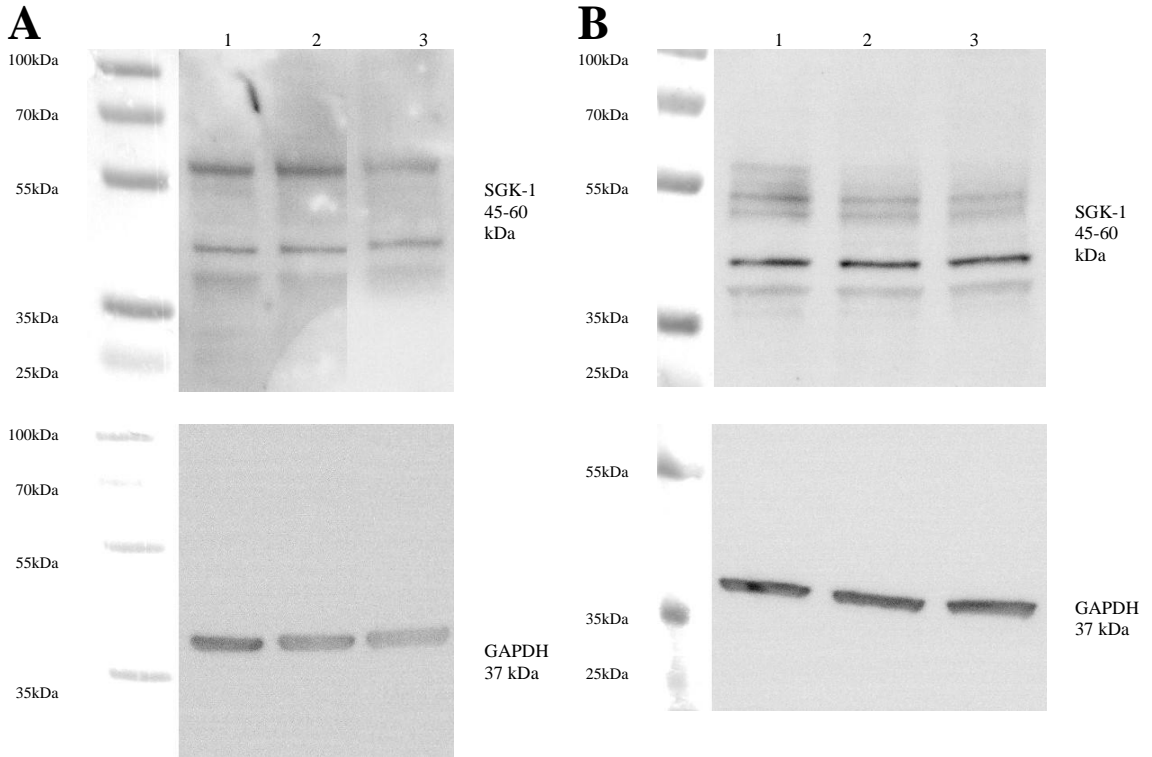
Araştırma protokolü Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından GO 16/753 kayıt numarası ile 06.12.2016 tarihinde değerlendirilerek çalışma materyalinin ticari olarak satın alınmış hücrelerde yapılacağı insandan elde edilen primer kültürlerin kullanılmayacağına görüldüğü, Klinik Araştırmalar Yönetmeliği gereği gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek nitelikte olmayan bu tip çalışmalar Etik Kurulların kapsamı dışında kaldığı değerlendirilmiştir.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: TDK-2016-13331).

4. BULGULAR

4.1. KHDAK Hücrelerinde SGK-1 Ekspresyonunun Gösterilmesi

SGK-1 inhibisyonu deneylerine başlamadan önce kullanılacak olan A549 ve H1299 KHDAK hücre dizilerinde SGK-1 ekspresyonu Western Blot yöntemiyle değerlendirildi (Şekil 4.1, Tablo 4.1 ve Şekil 4.2). İki hücre dizisinde de SGK-1 ekspresyonu gösterildi. SGK-1 ekspresyonunun gösterildiği deneylerde, bantların görüntülenmesi için pozlama süresinin uzun tutulması (5 dakika) gerekti. Görüntülenen bantların 45 kDa civarında tek bant ve 55 kDa civarında birden fazla bantın birleşimi şeklinde olduğu izlendi. A549 hücrelerinde molekül ağırlığı büyük olan bantların; H1299 hücrelerinde ise 45 kDa civarındaki bantların daha belirgin ekprese edildiği izlendi.

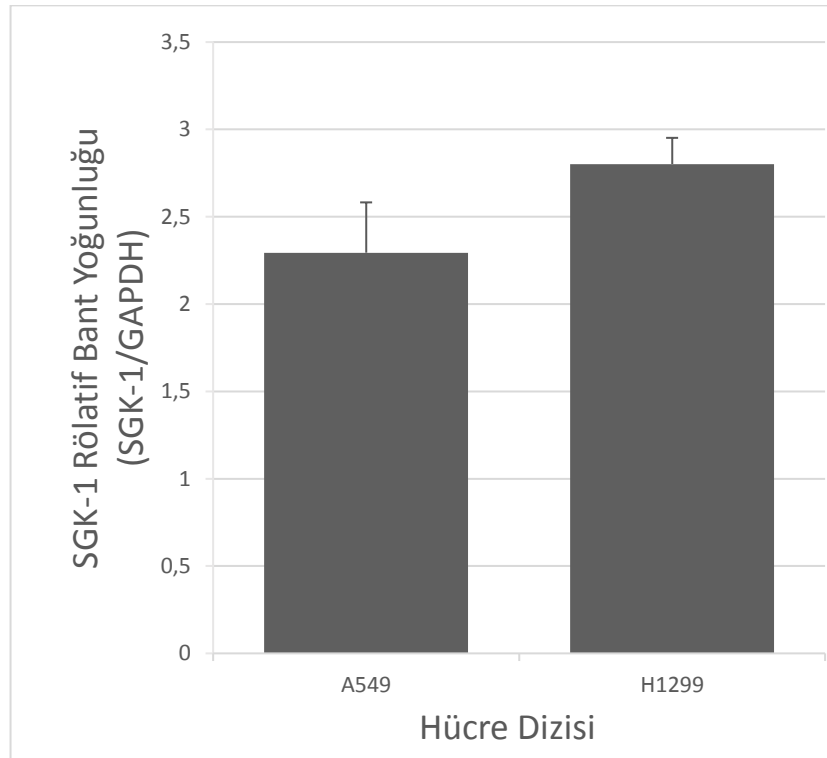


Şekil 4.1. KHDAK hücrelerinde SGK-1 ekspresyonunun 3 bağımsız örnekte gösterilmesi (n=3).

A: A549 hücrelerinde SGK-1 ekspresyonu. **B:** H1299 hücrelerinde SGK-1 ekspresyonu.

Tablo 4.1. A549 ve H1299 hücrelerinde SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunluğu (SGK-1/GAPDH) (n=3).

Hücre dizisi	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH
A549	2,29 \pm 0,29
H1299	2,80 \pm 0,15



Şekil 4.2. A549 ve H1299 hücrelerinde SGK-1 rölatif bant yoğunluğu (SGK-1/GAPDH).

4.2. KHDAK Hücrelerinde GSK650394'ün Subtoksik Dozunun MTT Canlılık Testi ile Belirlenmesi

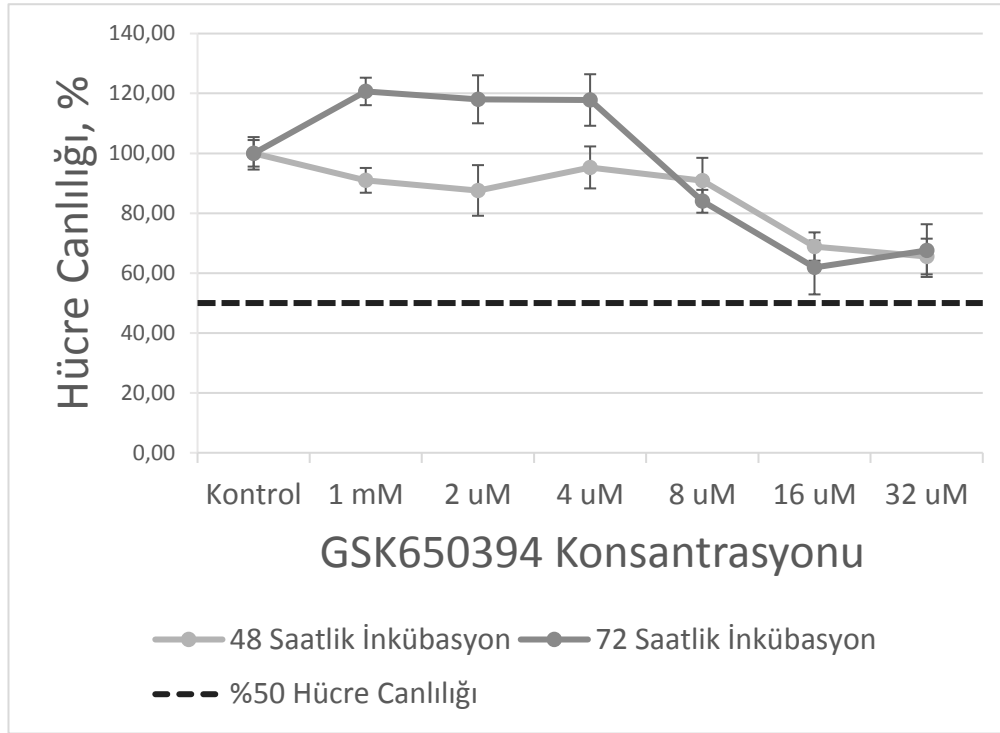
MTT yöntemiyle hücre canlılığının değerlendirilmesinde, 96 kuyuluk plaklarda kuyu başına eklenen hücre sayısı, deney sonunda ölçülen absorbans değerlerini doğrudan etkilemektedir. Deney sonuçlarının doğru yorumlanması için ölçülen optik dansite değerinin 0,7-1 aralığında olması hedeflendiğinden kuyu başına eklenmesi gereken hücre sayısını optimize etmek için farklı sayılarda hücrelerin ekilerek 72 saat süreyle hücre çoğalması beklendikten sonra deneyin sonlandırıldığı MTT deneyleri yapıldı. Bu deneyin sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde A549 hücreleri için 2000 hücre/kuyu, H1299 hücreleri için 3500 hücre/kuyu olacak şekilde MTT deneylerinin planlanmasına karar verildi.

Tablo 4.2. KHDAK hücrelerinde 96 kuyuluk plaklarda kuyu başına farklı sayılarda hücre ekilmesine bağlı olarak saptanan MTT deney sonuçları.

Hücre dizisi	Hücre Sayısı	Optik Dansite \pm SS
A549	1800 hücre/kuyu	0,80 \pm 0,05
	2000 hücre/kuyu	1,03 \pm 0,08
	2200 hücre/kuyu	1,11 \pm 0,03
	2500 hücre/kuyu	1,31 \pm 0,06
H1299	3000 hücre/kuyu	0,96 \pm 0,08
	4000 hücre/kuyu	1,91 \pm 0,28
	5000 hücre/kuyu	2,16 \pm 0,05
	6000 hücre/kuyu	2,70 \pm 0,056

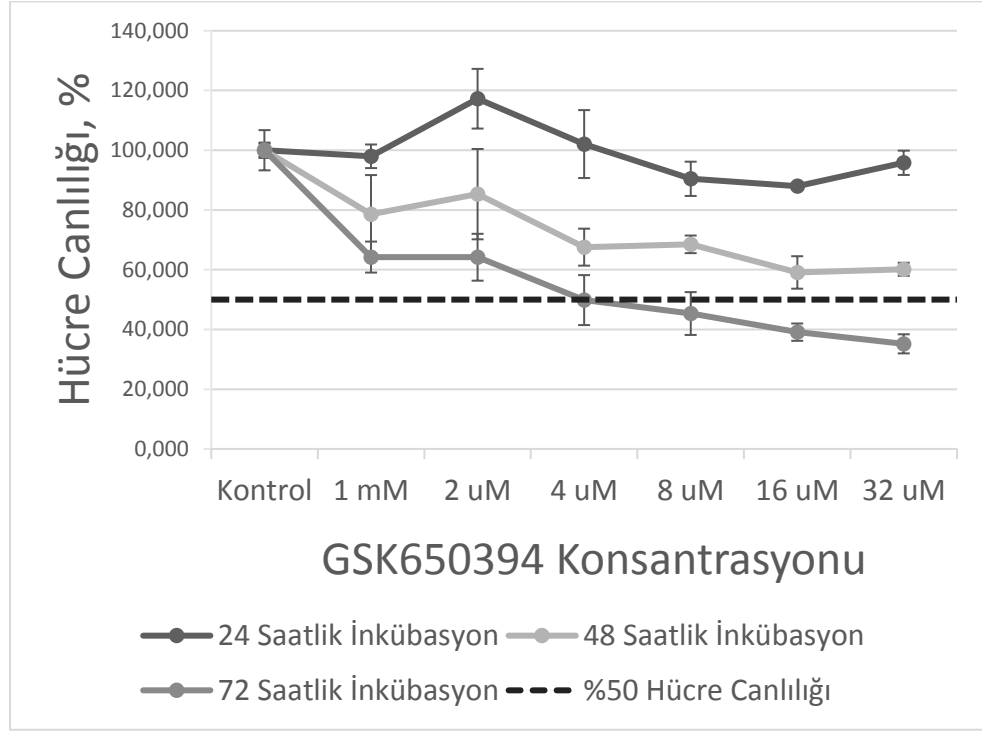
Her kuyuya eşit sayıda olacak şekilde planlanan hücre sayıları ile hücre ekimi yapılarak A549 hücre hattında 48 ve 72 saat; H1299 hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle GSK650394 ile inkübasyon yapılarak MTT yöntemiyle hücre canlılığı değerlendirildi.

GSK650394 inhibitörü 1 ile 32 μM inhibitör doz aralığında inkübasyon sonrasında A549 hücrelerinde hücre canlılığının kontrole göre 72 saat süreyle inkübasyona rağmen kullanılan en yüksek dozlar olan 16 μM ve 32 μM dozlar ile hücre canlılığının %60-%70 aralığında korunduğu görüldü (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. A549 hücrelerinde GSK650394 inhibitörünün zaman ve doza bağlı etkisi.

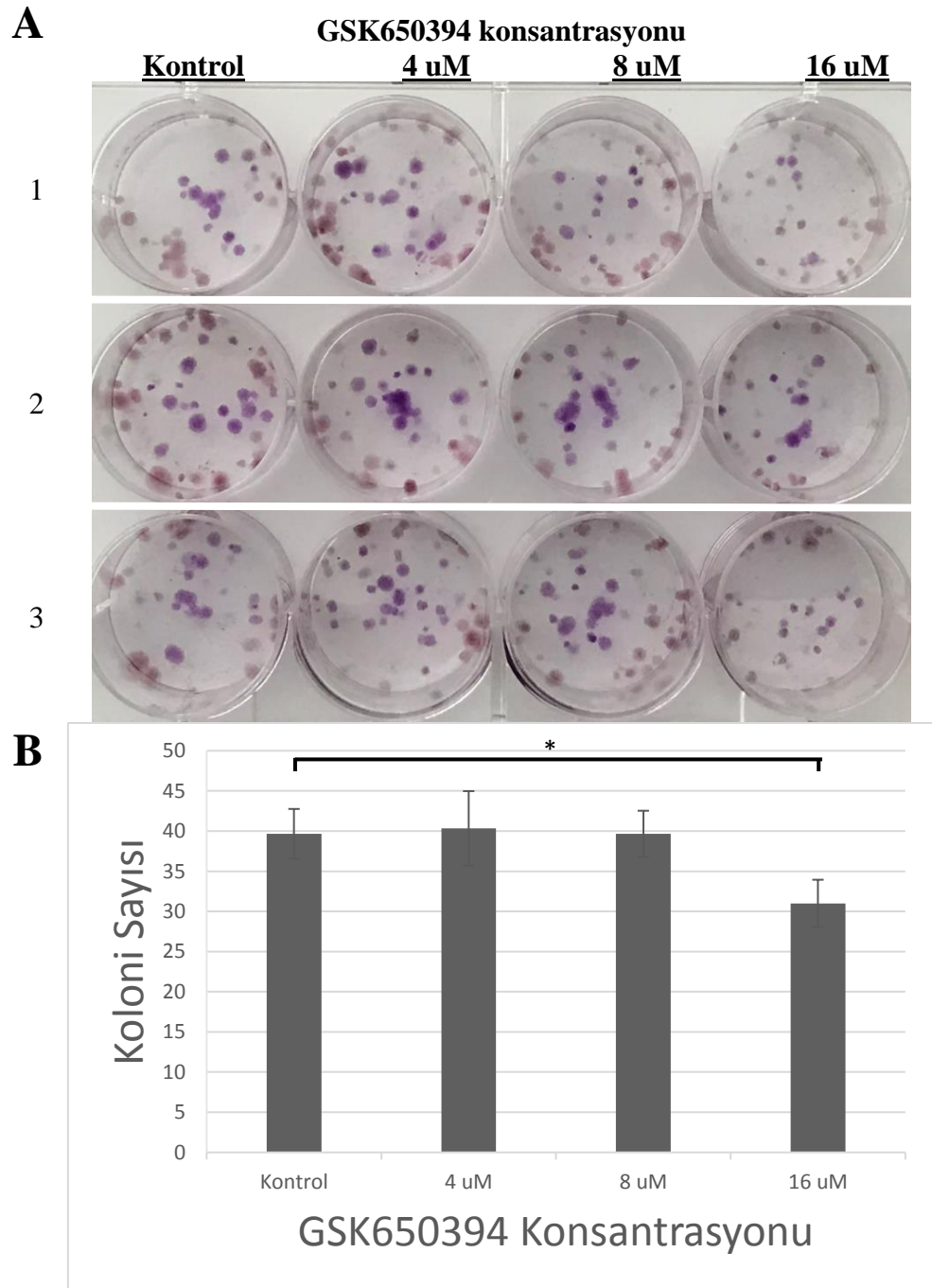
H1299 hücrelerinde 24 ve 48 saat süreyle inkübasyon sonrasında hücre canlılığının %50'nin altına inmediği ve toksik etki oluşmamasına rağmen 72 saat süreli inkübasyonda 4 μ M ve üzeri dozlarda hücre canlılığının %50'nin altına indiği saptandı. Kullanılan en yüksek ilaç dozları olan 16 μ M ve 32 μ M ile 72 saat süreyle inkübasyonla hücre canlılığının sırasıyla %39 ve %35 seviyesine indiği saptandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. H1299 hücrelerinde GSK650394 inhibitörünün zaman ve doza bağlı etkisi.

4.3. GSK650394 'ün KHDAK Hücresinin Çoğalmasına ve Koloni Oluşturmasına Etkisinin Kristal Viyole Yöntemi ile İncelenmesi

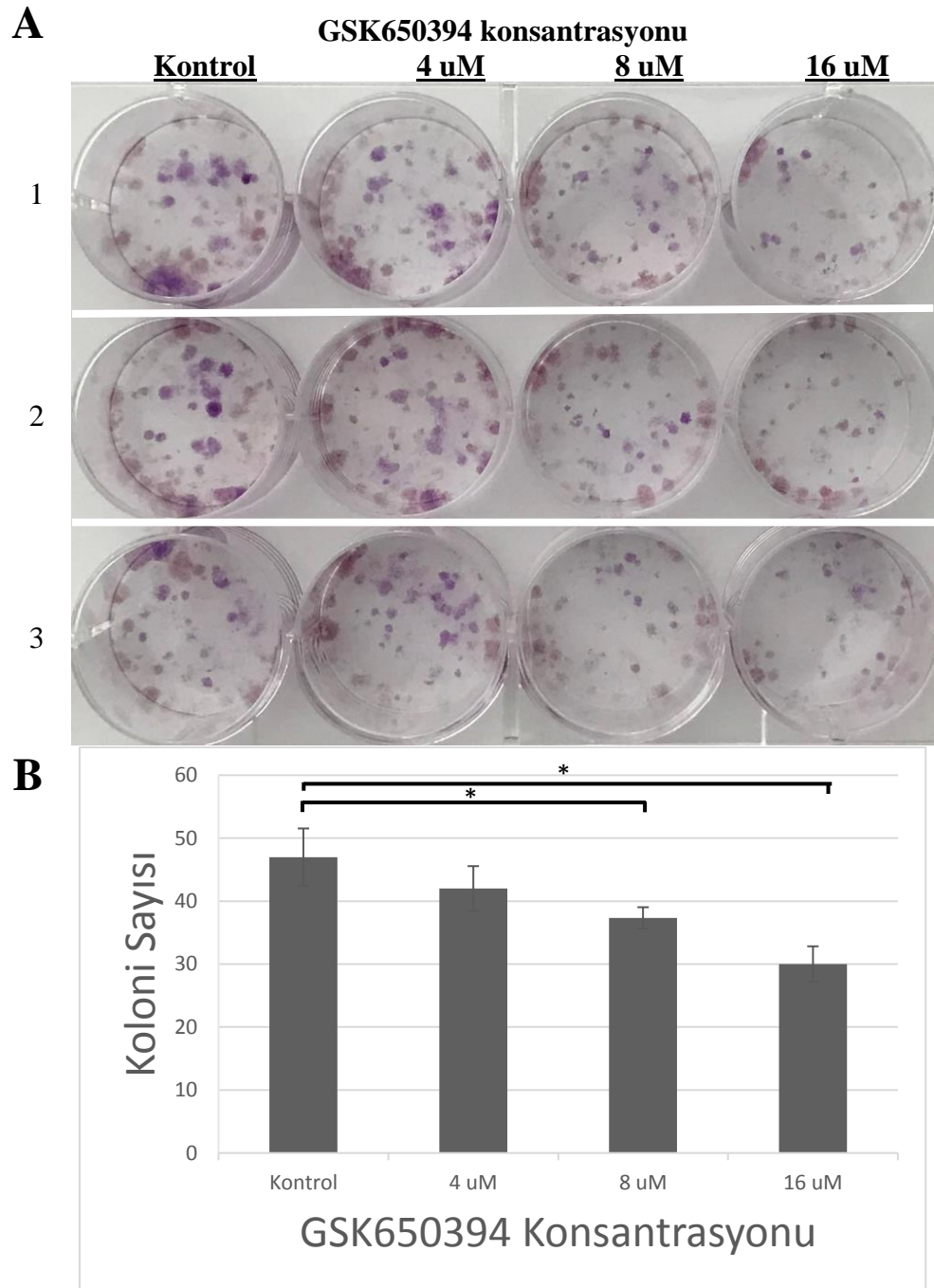
A549 ve H1299 hücrelerinde GSK650394 ile inkübasyon sonrası hücrelerin çoğalması kristal viyole yöntemi ile değerlendirildi. 12 kuyuluk plaklara her kuyuya eşit sayıda hücre ekimi yapılarak kontrol kuyuları ile ilaç inkübasyonu yapılan kuyularda deney sonunda kristal viyole ile boyama sonucu gözlenen hücre çoğalması ve koloni sayıları değerlendirildi (Şekil 4.5 ve 4.6). A549 hücrelerinde kontrole göre 16 μ M inkübasyonla; H1299 hücrelerinde ise kontrole göre 8 μ M ve 16 μ M inkübasyonla istatistiksel anlamlı şekilde koloni sayısında azalma gözlemlendi.



Şekil 4.5. A549 hücrelerinde GSK650394 'ün hücre çoğalmasına etkisi.

A: 12 kuyulu plaklarda kuyu başına 100 hücre ile ekildikten sonra hücrelerin yapışmasını takiben GSK650394 inkübasyonu sonrası koloni oluşumlarının 3 bağımsız örnekte kristal viyole ile gösterilmesi.

B: Koloni sayılarının istatistiksel analizi (*: $p < 0,05$).



Şekil 4.6. H1299 hücrelerinde GSK650394 'ün hücre çoğalmasına etkisi.

A: 12 kuyulu plaklarda kuyu başına 200 hücre ile ekildikten sonra hücrelerin yapışmasını takiben GSK650394 inkübasyonu sonrası koloni oluşumlarının 3 bağımsız örnekte kristal viyole ile gösterilmesi.

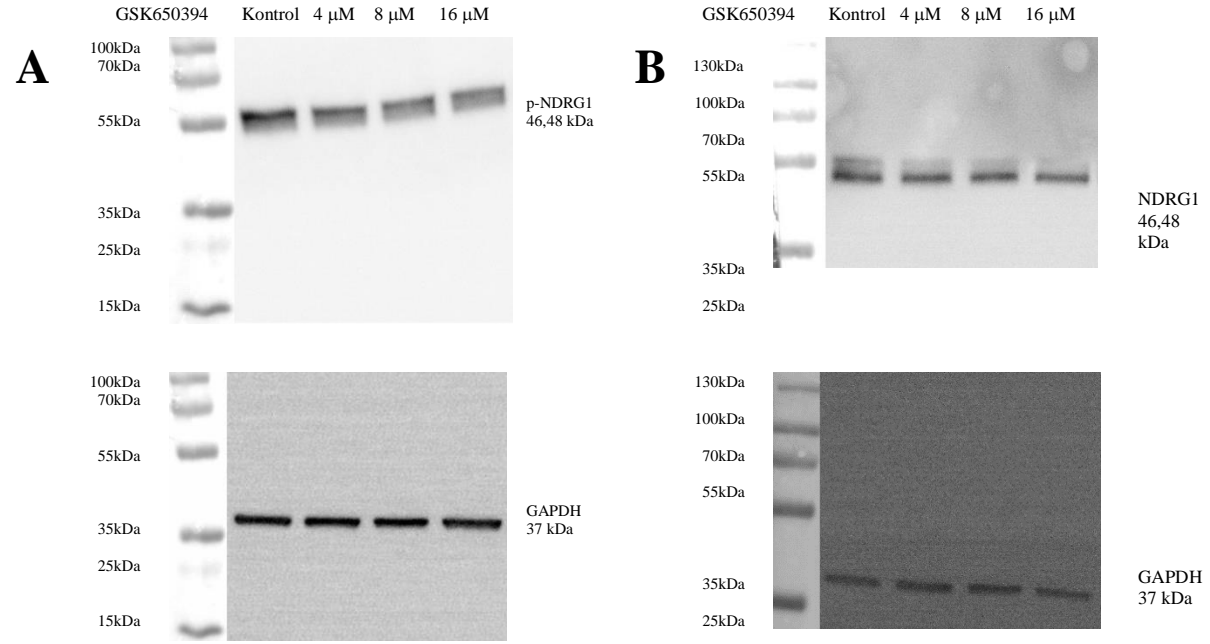
B: Koloni sayılarının istatistiksel analizi (*: $p < 0,05$).

4.4. KHDAK Hücrelerinde SGK-1'in GSK650394 ile Farmakolojik İnhibisyonunun Western Blot Yöntemiyle İncelenmesi

A549 ve H1299 hücrelerinde, SGK-1'in farmakolojik inhibisyonunun değerlendirilmesi için, hücrelerin GSK650394'ün farklı subtoksik dozlarında ve farklı inkübasyon süreleriyle inkübe edilmesi planlandı. 6 kuyulu plaklara her kuyuya eşit sayıda hücre ekimi yapıldı. Kontrol kuyuları ile ilaç inkübasyonu yapılan kuyularda hücrelerden 6 saat ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre lizatları hazırlanarak Western Blot deneyleri yapıldı. Bu deneylerde hücrelerdeki NDRG1, fosforile NDRG1 (p-NDRG1), SGK-1, fosforile GSK3 β (p-GSK3 β) ve EGFR ekspresyonuna bakıldı.

4.4.1. GSK650394'ün NDRG1 ve p-NDRG1 Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi

A549 hücreleri 6 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonlarına bakıldığında 16 μ M GSK650394 ile p-NDRG1 rölatif bant yoğunluğunda azalma eğilimi izlenmesine rağmen p-NDRG1/NDRG1 oranında anlamlı farklılık izlenmedi (Şekil 4.7, Tablo 4.3 ve Şekil 4.8).



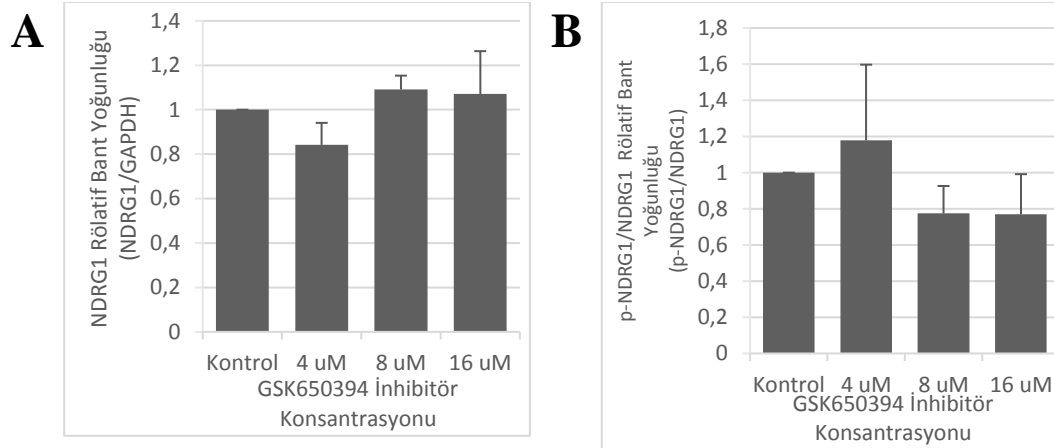
Şekil 4.7. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

A: p-NDRG1.

B: NDRG1.

Tablo 4.3. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (NDRG1/GAPDH ve p-NDRG1/NDRG1), (n=3).

GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH	
	NDRG1/GAPDH	p-NDRG1/NDRG1
Kontrol	1 \pm 0	1 \pm 0
4 μ M	0,84 \pm 0,10	1,18 \pm 0,42
8 μ M	1,09 \pm 0,06	0,77 \pm 0,15
16 μ M	1,07 \pm 0,19	0,77 \pm 0,22

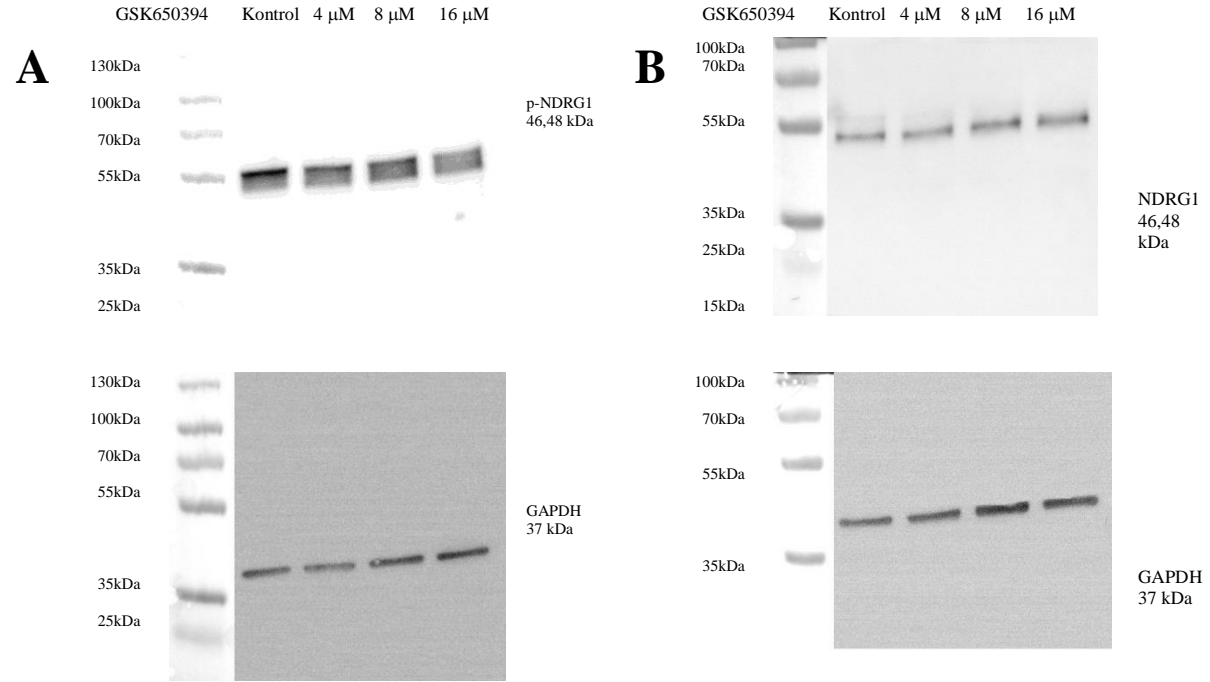


Şekil 4.8. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisi.

A: NDRG1/GAPDH rölatif bant yoğunluğu.

B: p-NDRG1/NDRG1 rölatif bant yoğunluğu.

(Dansitometrik analiz, n=3).



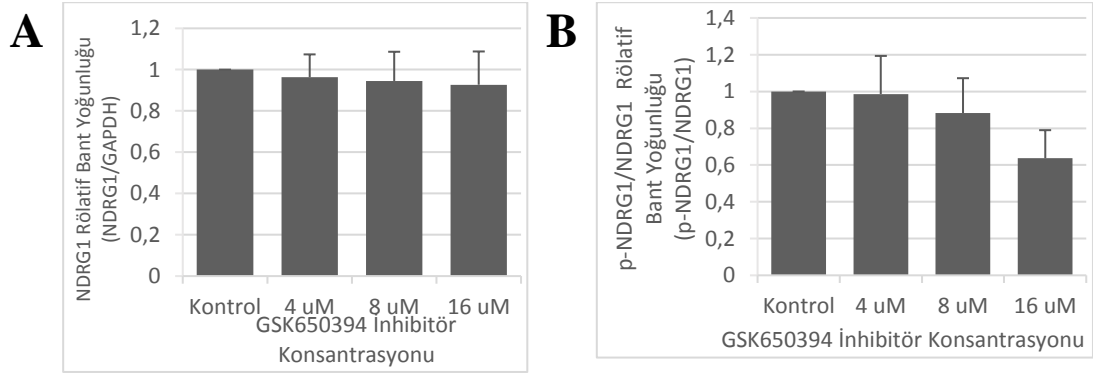
Şekil 4.9. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

A: p-NDRG1.

B: NDRG1.

Tablo 4.4. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (NDRG1/GAPDH ve p-NDRG1/NDRG1), (n=3).

GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH	
	NDRG1/GAPDH	p-NDRG1/NDRG1
Kontrol	1 \pm 0	1 \pm 0
4 μ M	0,96 \pm 0,11	0,99 \pm 0,21
8 μ M	0,94 \pm 0,14	0,88 \pm 0,19
16 μ M	0,93 \pm 0,16	0,64 \pm 0,15



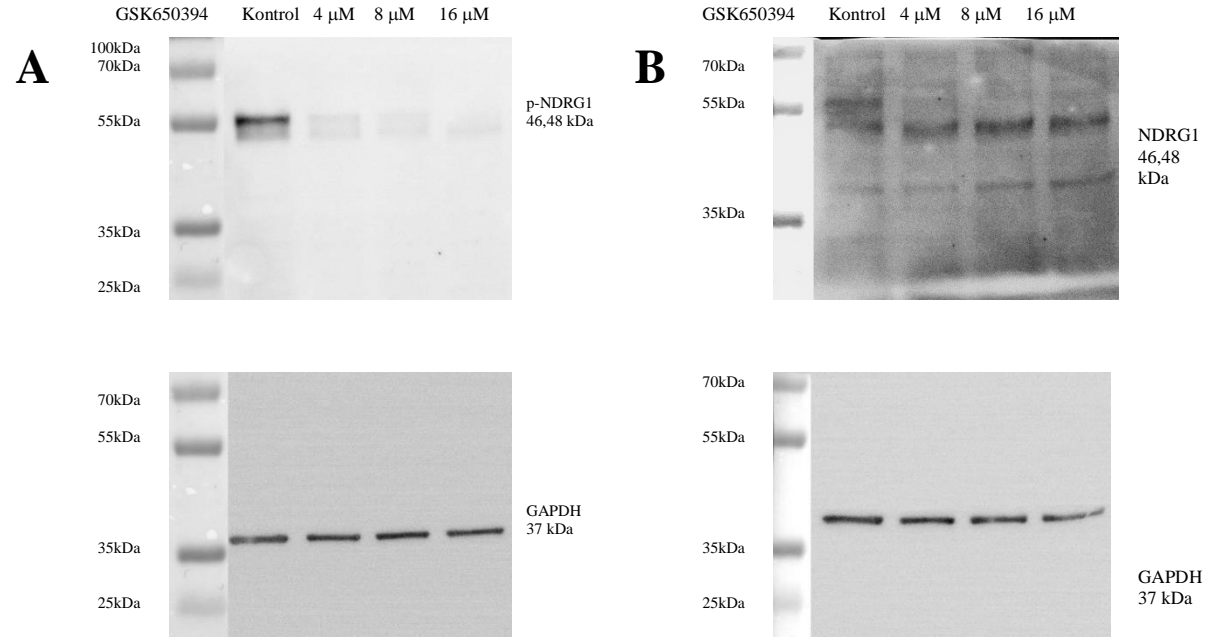
Şekil 4.10. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisi.

A: NDRG1/GAPDH rölatif bant yoğunluğu.

B: p-NDRG1/NDRG1 rölatif bant yoğunluğu.

(Densitometrik analiz, n=3).

H1299 hücreleri 6 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonlarına bakıldığında NDRG1 ekspresyonunda anlamlı değişiklik izlenmedi; 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile p-NDRG1 rölatif bant yoğunluğunda istatistiksel azalma saptandı. 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile p-NDRG1/NDRG1 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı (sırasıyla p<0,05 ve p<0,01) (Şekil 4.11, Tablo 4.5 ve Şekil 4.12).



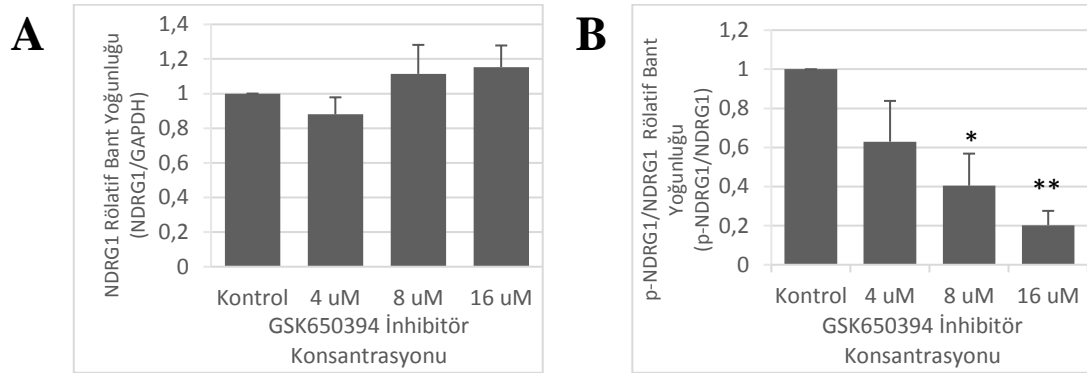
Şekil 4.11. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

A: p-NDRG1.

B: NDRG1.

Tablo 4.5. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (NDRG1/GAPDH ve p-NDRG1/NDRG1), (n=3).

GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH	
	NDRG1/GAPDH	p-NDRG1/NDRG1
Kontrol	1 \pm 0	1 \pm 0
4 μ M	0,88 \pm 0,10	0,63 \pm 0,21
8 μ M	1,11 \pm 0,17	0,40 \pm 0,16
16 μ M	1,15 \pm 0,12	0,20 \pm 0,07



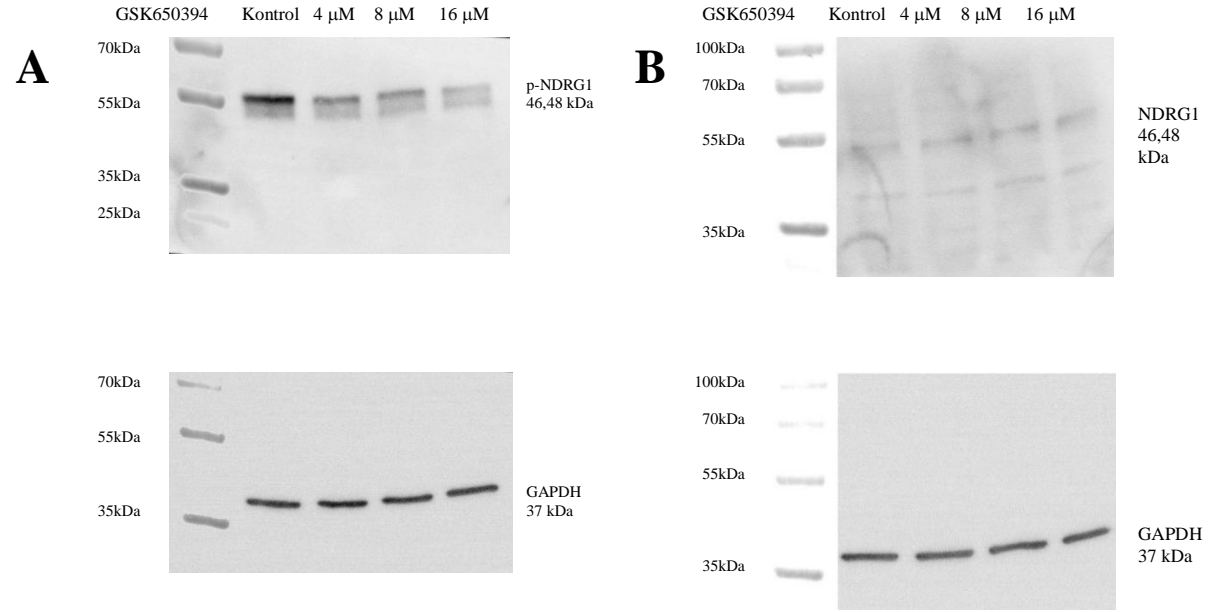
Şekil 4.12. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisi.

A: NDRG1/GAPDH rölatif bant yoğunluğu.

B: p-NDRG1/NDRG1 rölatif bant yoğunluğu.

(Dansitometrik analiz, *p<0,05, **p<0,01, n=3).

H1299 hücreleri 24 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonlarına bakıldığında NDRG1 ekspresyonunda anlamlı değişiklik izlenmedi; 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile p-NDRG1 rölatif bant yoğunluğunda azalma gözlemlendi. Ayrıca 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile p-NDRG1/NDRG1 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı (sırasıyla p<0,05, p<0,01 ve p<0,01) (Şekil 4.13, Tablo 4.6 ve Şekil 4.14). Bu hücrelerde 6 saat süreyle inkübasyon ile karşılaştırıldığında, 24 saat süreyle inkübasyonda p-NDRG1 bant yoğunluklarındaki azalma görece daha azdı; ilaç etkisinin kısmen azalmakla birlikte devam ettiği görüldü.



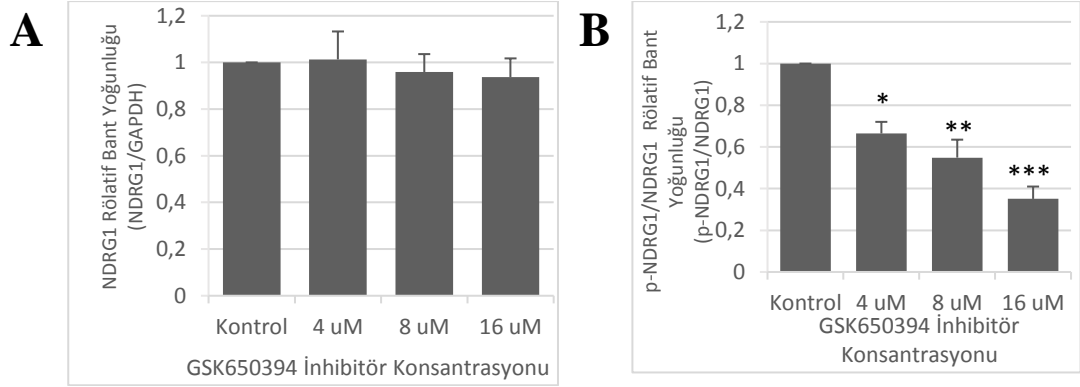
Şekil 4.13. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

A: p-NDRG1.

B: NDRG1.

Tablo 4.6. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (NDRG1/GAPDH ve p-NDRG1/NDRG1), (n=3).

GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH	
	NDRG1/GAPDH	p-NDRG1/NDRG1
Kontrol	1 \pm 0	1 \pm 0
4 μ M	1,01 \pm 0,12	0,66 \pm 0,05
8 μ M	0,96 \pm 0,08	0,55 \pm 0,09
16 μ M	0,94 \pm 0,08	0,35 \pm 0,06



Şekil 4.14. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağılı olarak p-NDRG1 ve NDRG1 ekspresyonuna etkisi.

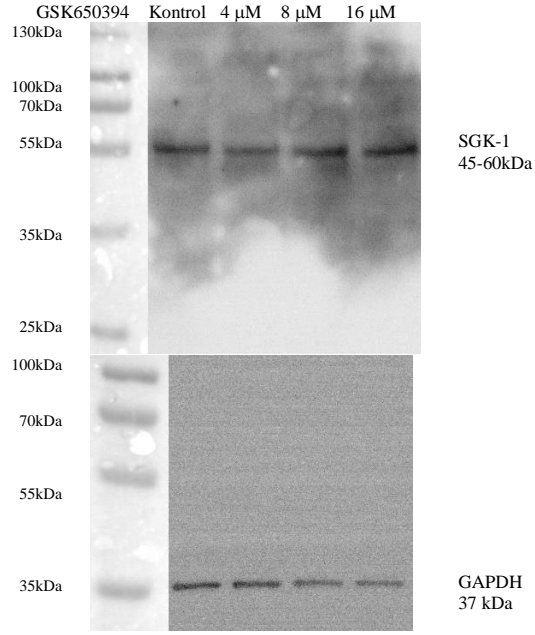
A: NDRG1/GAPDH rölafif bant yoğunluğu.

B: p-NDRG1/NDRG1 rölafif bant yoğunluğu.

(Dansitometrik analiz, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=3).

4.4.2. GSK650394'ün SGK-1 Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi

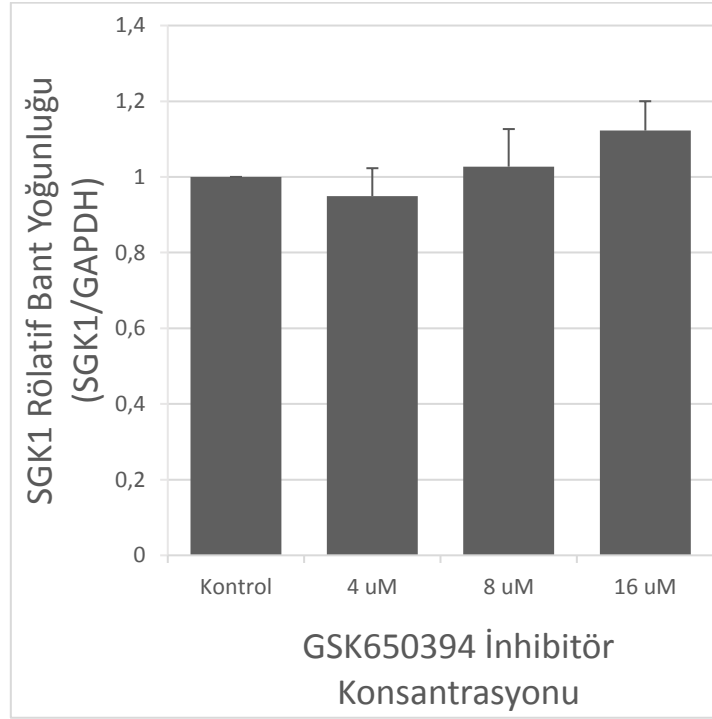
A549 hücreleri 6 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra SGK-1 ekspresyonlarına bakıldığında total SGK-1 rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.15, Tablo 4.7 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.15. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun SGK-1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.7. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (SGK-1/GAPDH), (n=3).

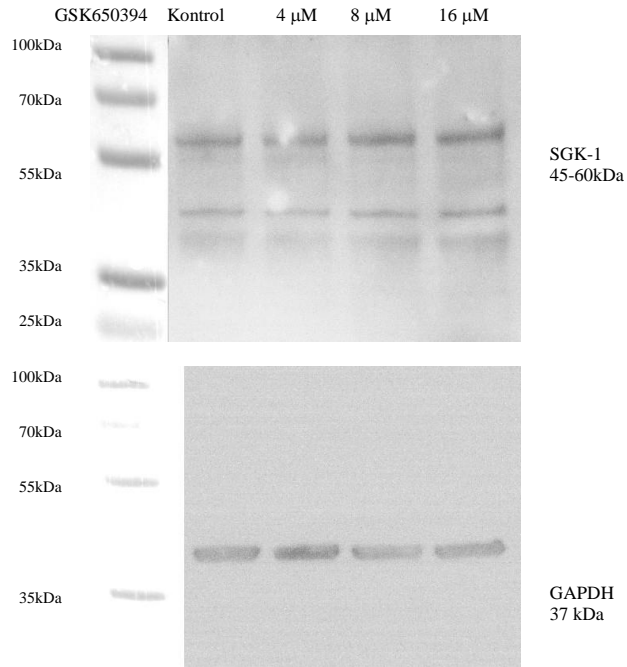
GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH
Kontrol	1 \pm 0
4 μ M	0,95 \pm 0,07
8 μ M	1,03 \pm 0,10
16 μ M	1,12 \pm 0,08



Şekil 4.16. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak SGK-1 ekspresyonuna etkisi.

(Dansitometrik analiz, n=3).

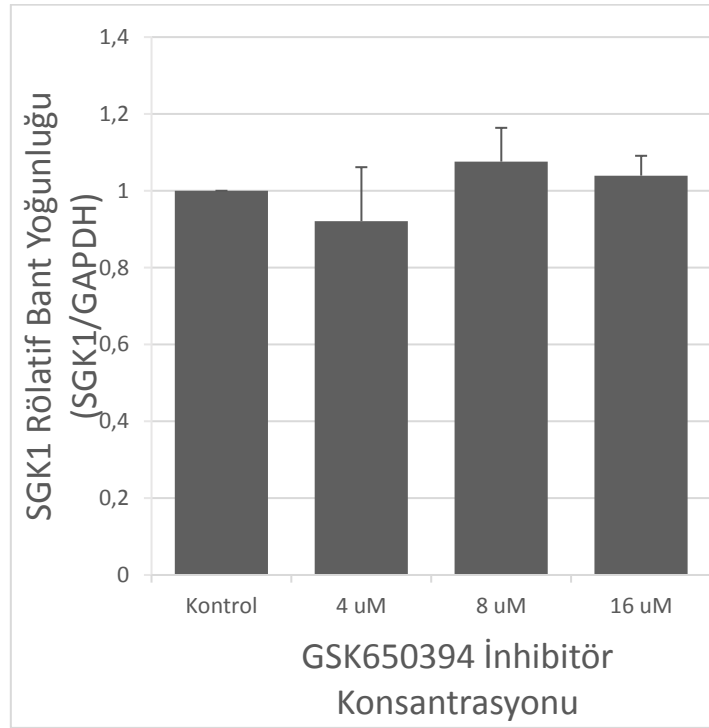
A549 hücreleri 24 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra SGK-1 ekspresyonlarına bakıldığında total SGK-1 rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.17, Tablo 4.8 ve Şekil 4.18).



Şekil 4.17. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun SGK-1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.8. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (SGK-1/GAPDH), (n=3).

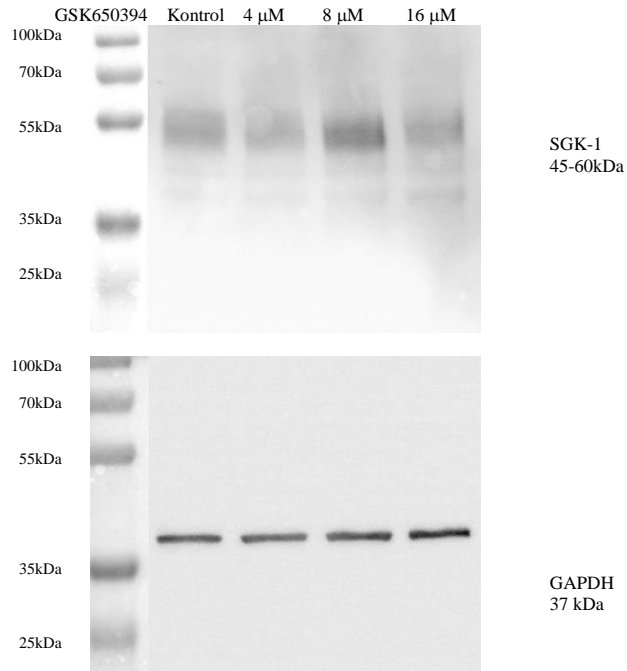
GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH
Kontrol	1 \pm 0
4 μ M	0,92 \pm 0,14
8 μ M	1,07 \pm 0,09
16 μ M	1,04 \pm 0,05



Şekil 4.18. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak SGK-1 ekspresyonuna etkisi.

(Densitometrik analiz, n=3).

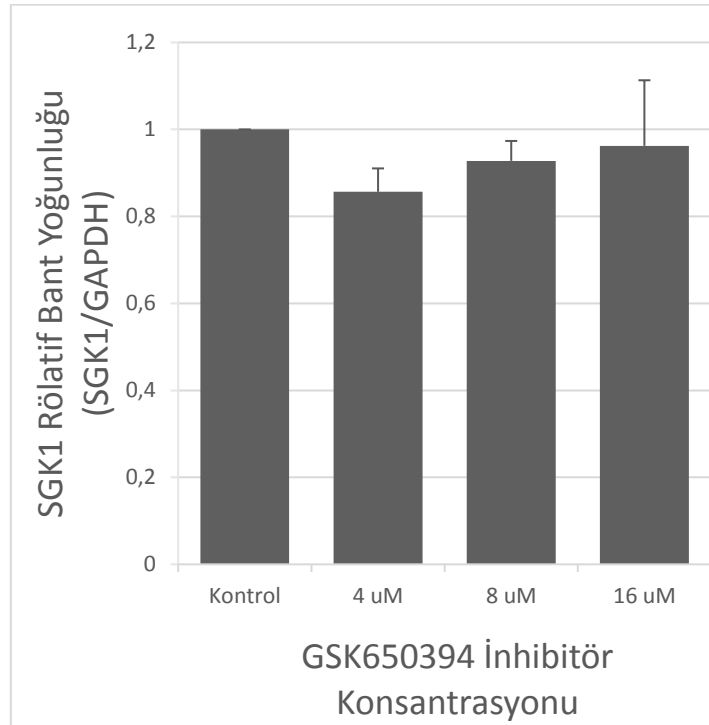
H1299 hücreleri 6 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra SGK-1 ekspresyonlarına bakıldığında total SGK-1 rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.19, Tablo 4.9 ve Şekil 4.20).



Şekil 4.19. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun SGK-1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.9. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (SGK-1/GAPDH), (n=3).

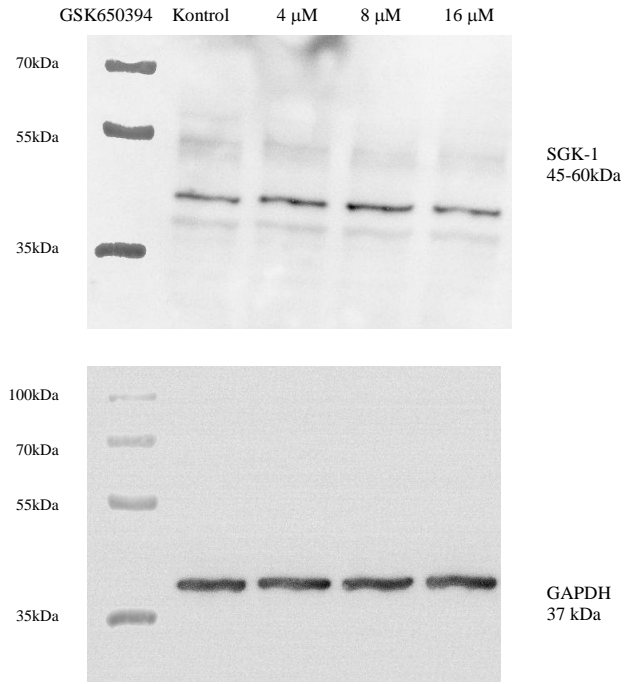
GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH
Kontrol	1 \pm 0
4 μ M	0,86 \pm 0,05
8 μ M	0,93 \pm 0,04
16 μ M	0,96 \pm 0,15



Şekil 4.20. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak SGK-1 ekspresyonuna etkisi.

(Dansitometrik analiz, n=3).

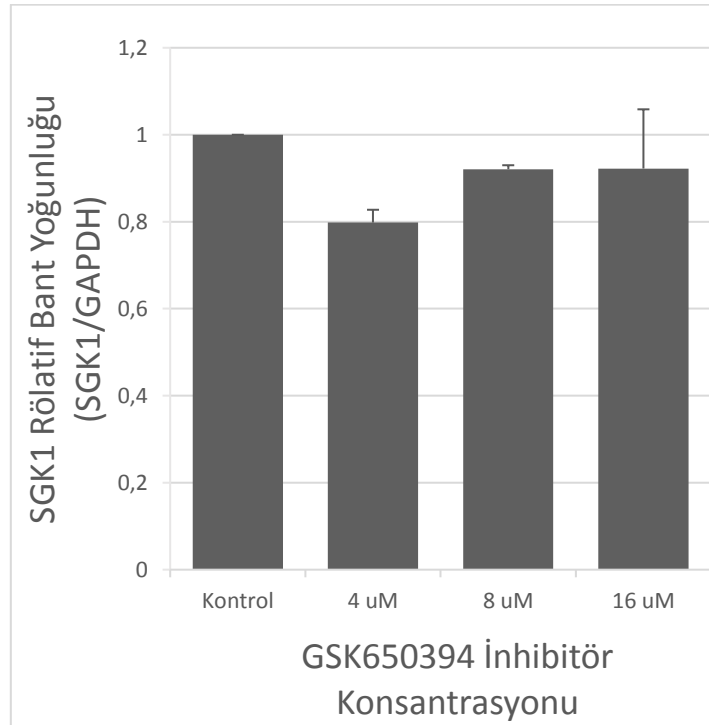
H1299 hücreleri 24 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra SGK-1 ekspresyonlarına bakıldığında total SGK-1 rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.21, Tablo 4.10 ve Şekil 4.22).



Şekil 4.21. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun SGK-1 ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.10. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası SGK-1 ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (SGK-1/GAPDH), (n=3).

GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH
Kontrol	1 ± 0
4 μ M	$0,80 \pm 0,03$
8 μ M	$0,92 \pm 0,01$
16 μ M	$0,92 \pm 0,14$

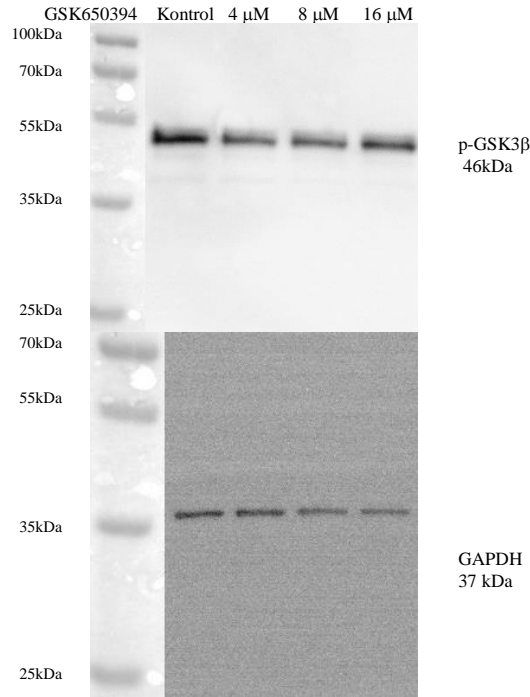


Şekil 4.22. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak SGK-1 ekspresyonuna etkisi.

(Densitometrik analiz, n=3).

4.4.3. GSK650394'ün p-GSK3 β Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi

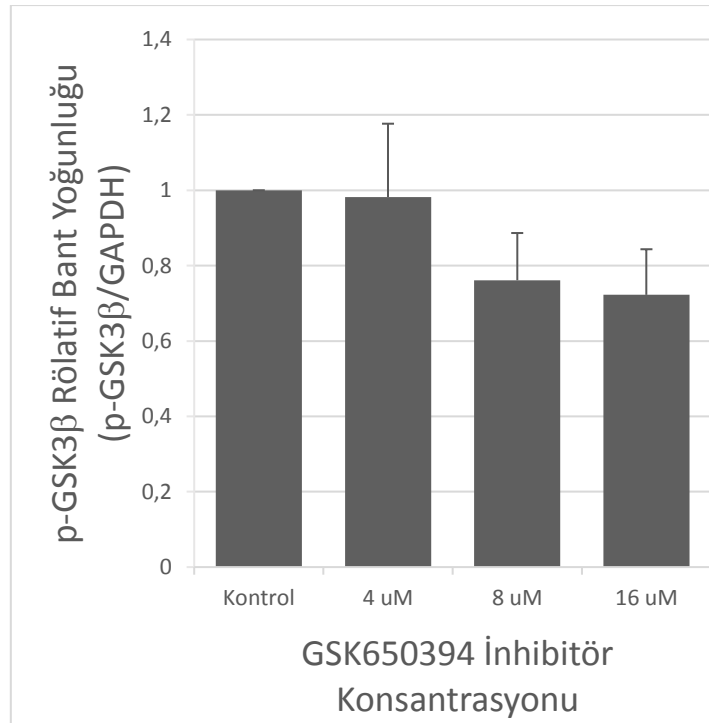
A549 hücreleri 6 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra p-GSK3 β ekspresyonlarına bakıldığında p-GSK3 β rölatif bant yoğunluğunda azalma eğilimi izlendi ancak bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 4.23, Tablo 4.11 ve Şekil 4.24).



Şekil 4.23. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-GSK3 β ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.11. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-GSK3 β ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (p-GSK3 β /GAPDH), (n=3).

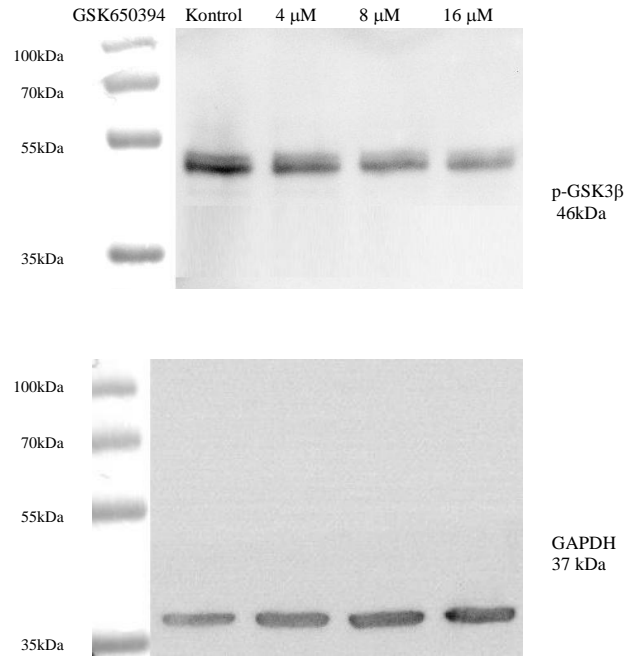
GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH
Kontrol	1 \pm 0
4 μ M	0,98 \pm 0,19
8 μ M	0,76 \pm 0,12
16 μ M	0,72 \pm 0,12



Şekil 4.24. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-GSK3 β ekspresyonuna etkisi.

(Densitometrik analiz, n=3).

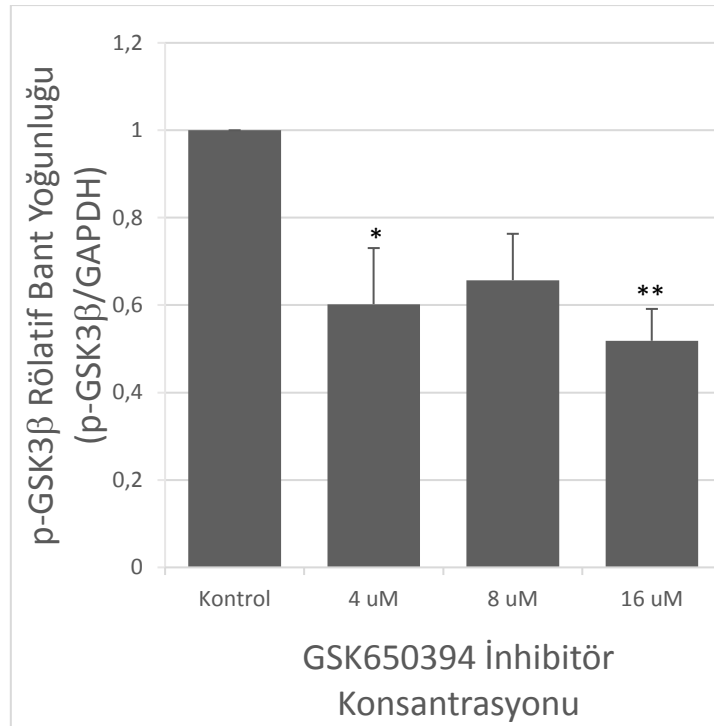
A549 hücreleri 24 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra p-GSK3 β ekspresyonlarına bakıldığında p-GSK3 β ortalama rölatif bant yoğunluğunda GSK650394 inkübasyonu ile azalma izlendi, 4 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile p-GSK3 β rölatif bant yoğunluğunda istatistiksel anlamlı azalma görüldü (sırasıyla $p < 0,05$ ve $p < 0,01$) (Şekil 4.25, Tablo 4.12 ve Şekil 4.26).



Şekil 4.25. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-GSK3 β ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.12. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-GSK3 β ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (p-GSK3 β /GAPDH), (n=3).

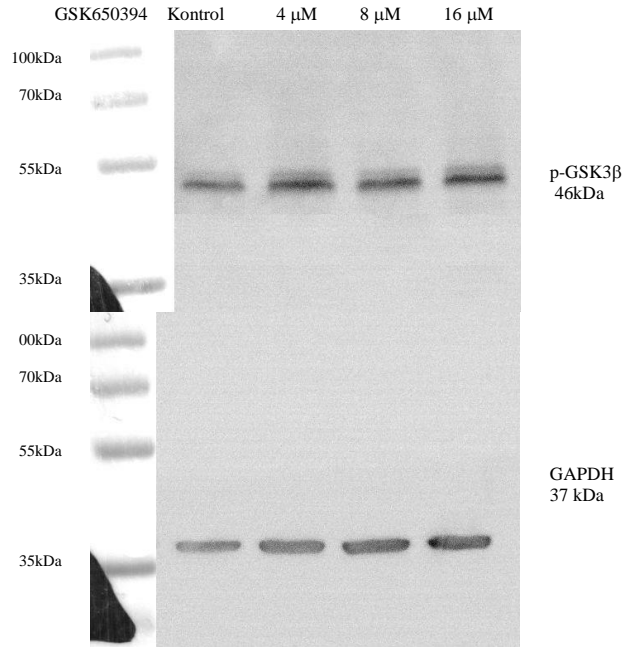
GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH
Kontrol	1 \pm 0
4 μ M	0,60 \pm 0,13
8 μ M	0,66 \pm 0,11
16 μ M	0,52 \pm 0,07



Şekil 4.26. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-GSK3 β ekspresyonuna etkisi.

(Dansitometrik analiz, *p<0,05, **p<0,01, n=3).

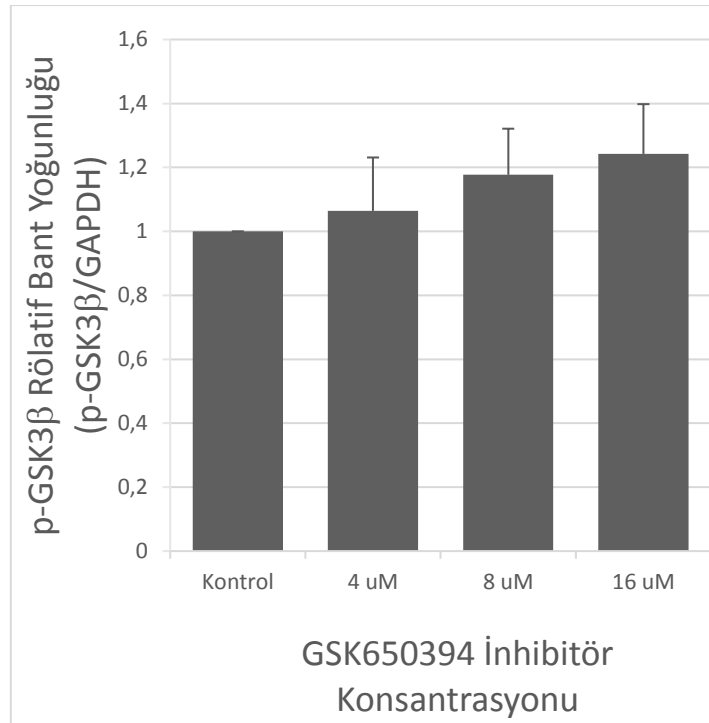
H1299 hücreleri 6 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra p-GSK3 β ekspresyonlarına bakıldığında p-GSK3 β rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.27, Tablo 4.13 ve Şekil 4.28).



Şekil 4.27. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-GSK3 β ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.13. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-GSK3 β ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (p-GSK3 β /GAPDH), (n=3).

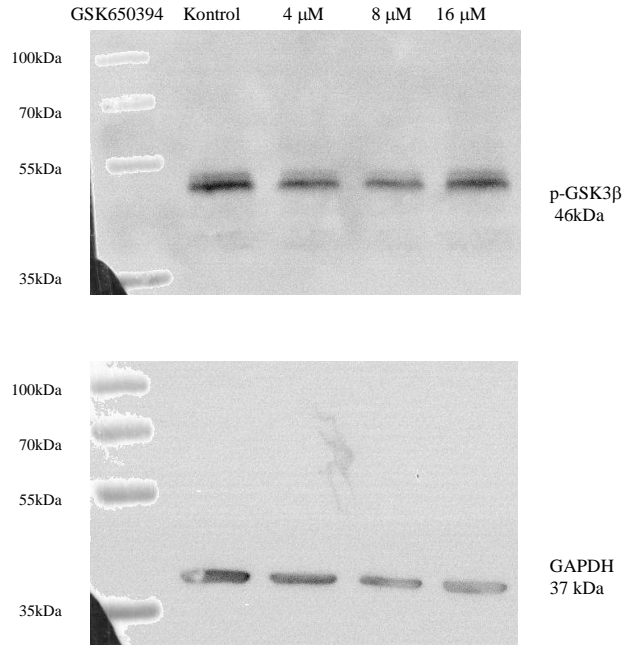
GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH
Kontrol	1 \pm 0
4 μ M	1,06 \pm 0,17
8 μ M	1,18 \pm 0,14
16 μ M	1,24 \pm 0,15



Şekil 4.28. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-GSK3 β ekspresyonuna etkisi.

(Dansitometrik analiz, n=3).

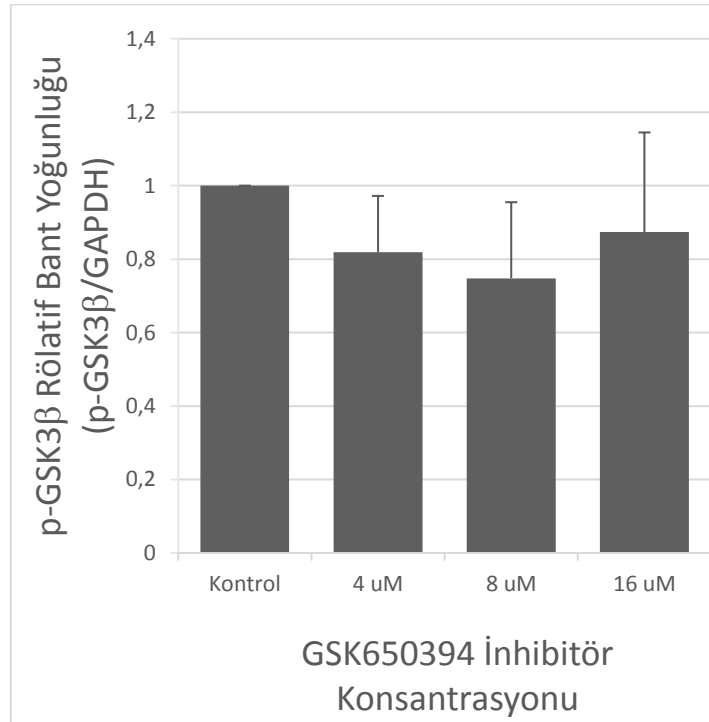
H1299 hücreleri 24 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra p-GSK3 β ekspresyonlarına bakıldığında p-GSK3 β rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.29, Tablo 4.14 ve Şekil 4.30).



Şekil 4.29. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun p-GSK3 β ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.14. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası p-GSK3 β ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (p-GSK3 β /GAPDH), (n=3).

GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH
Kontrol	1 \pm 0
4 μ M	0,82 \pm 0,15
8 μ M	0,75 \pm 0,21
16 μ M	0,87 \pm 0,27

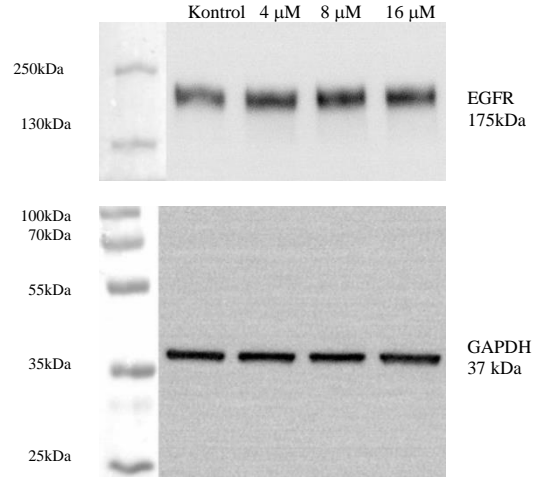


Şekil 4.30. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak p-GSK3 β ekspresyonuna etkisi.

(Dansitometrik analiz, n=3).

4.4.4. GSK650394'ün EGFR Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi

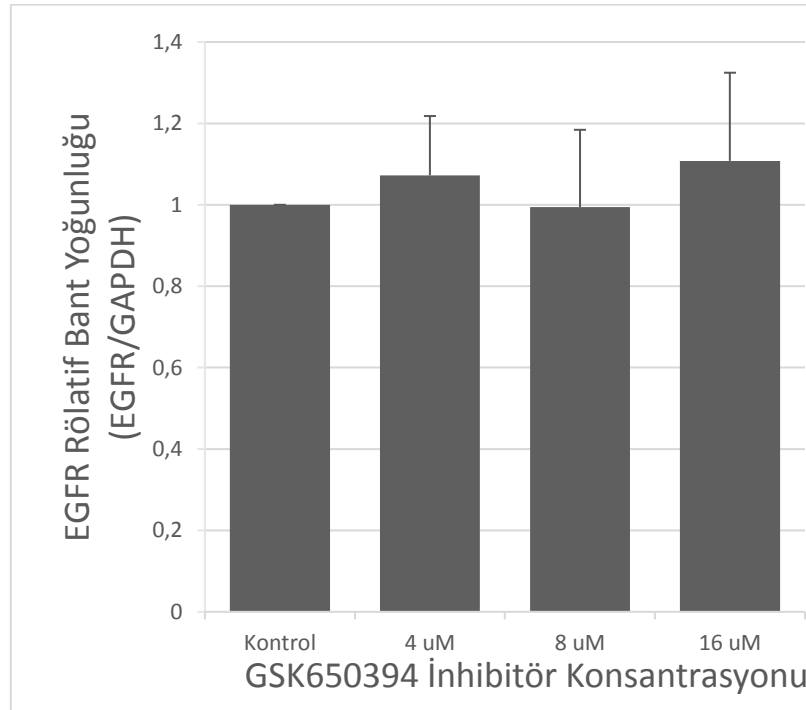
A549 hücreleri 6 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra EGFR ekspresyonlarına bakıldığında EGFR rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.31, Tablo 4.15 ve Şekil 4.32).



Şekil 4.31. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.15. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası EGFR ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (EGFR /GAPDH), (n=3).

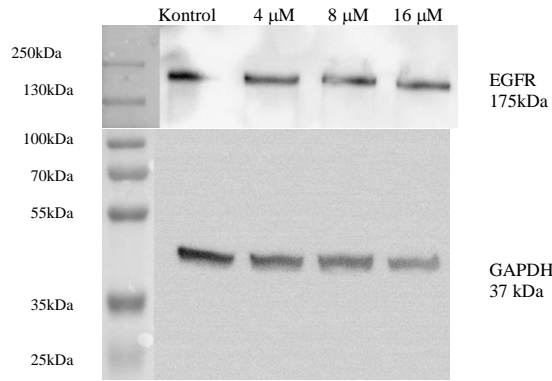
GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SS
Kontrol	1 \pm 0
4 μ M	1,07 \pm 0,14
8 μ M	0,99 \pm 0,19
16 μ M	1,11 \pm 0,22



Şekil 4.32. A549 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi.

(Dansitometrik analiz, n=3).

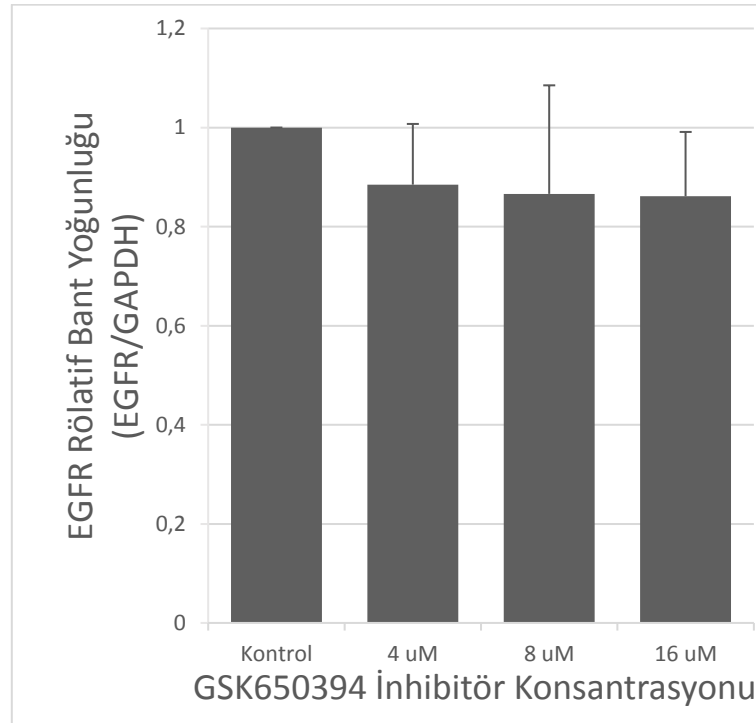
A549 hücreleri 24 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra EGFR ekspresyonlarına bakıldığında EGFR rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.33, Tablo 4.16 ve Şekil 4.34).



Şekil 4.33. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.16. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası EGFR ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (EGFR /GAPDH), (n=3).

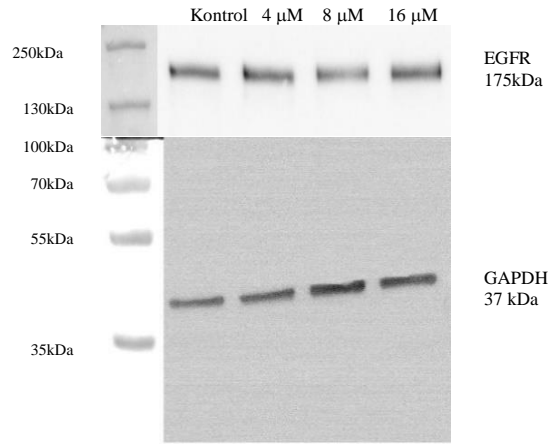
GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SS
Kontrol	1 ± 0
4 μ M	$0,88 \pm 0,12$
8 μ M	$0,87 \pm 0,21$
16 μ M	$0,86 \pm 0,13$



Şekil 4.34. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi.

(Densitometrik analiz, n=3).

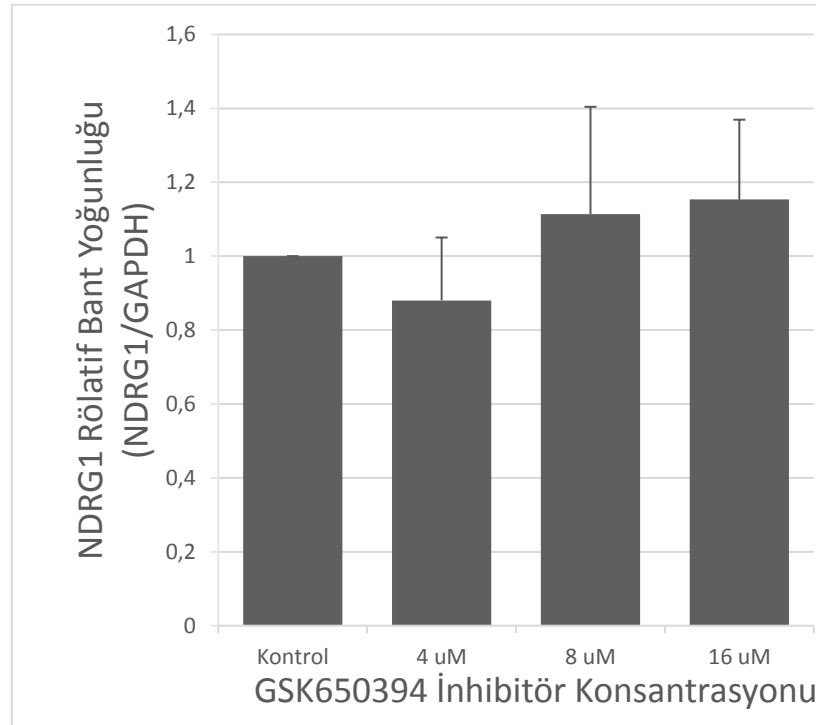
H1299 hücreleri 6 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra EGFR ekspresyonlarına bakıldığında EGFR rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.35, Tablo 4.17 ve Şekil 4.36).



Şekil 4.35. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.17. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası EGFR ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (EGFR /GAPDH), (n=3).

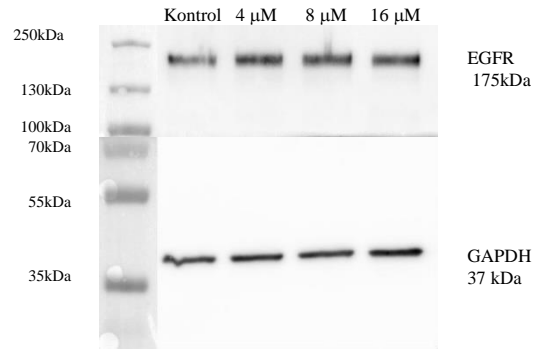
GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SS
Kontrol	1 \pm 0
4 μ M	1,02 \pm 0,21
8 μ M	0,97 \pm 0,30
16 μ M	0,90 \pm 0,11



Şekil 4.36. H1299 hücrelerinde 6 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi.

(Dansitometrik analiz, n=3).

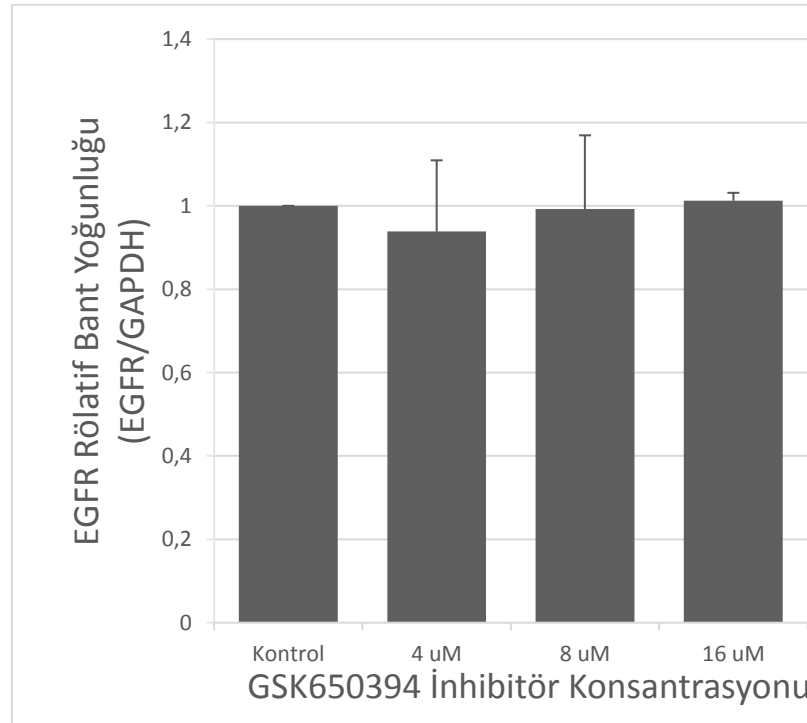
H1299 hücreleri 24 saat süreyle 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra EGFR ekspresyonlarına bakıldığında EGFR rölatif bant yoğunluğunda anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.37, Tablo 4.18 ve Şekil 4.38).



Şekil 4.37. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR ekspresyonuna etkisinin incelenmesi.

Tablo 4.18. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu sonrası EGFR ekspresyonuna ait ortalama rölatif bant yoğunlukları (EGFR /GAPDH), (n=3).

GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SS
Kontrol	1 ± 0
4 μ M	$0,94 \pm 0,17$
8 μ M	$0,99 \pm 0,18$
16 μ M	$1,01 \pm 0,02$



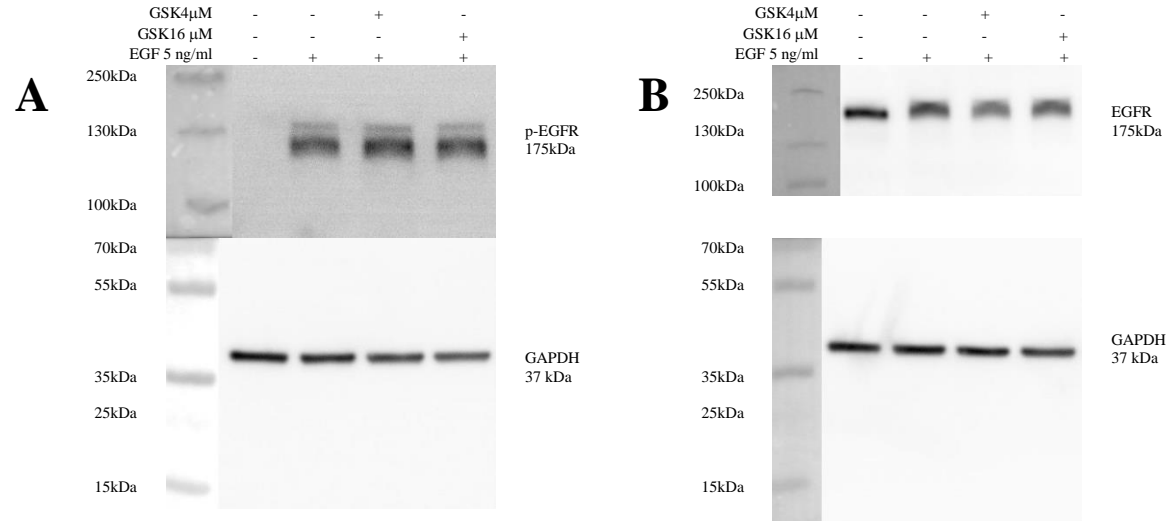
Şekil 4.38. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi.

(Dansitometrik analiz, n=3).

4.4.5. GSK650394'ün EGFR Aktivasyonuna (p-EGFR Ekspresyonuna) Etkisinin İncelenmesi

Araştırmada SGK-1'in farmakolojik inhibisyonunun EGFR aktivasyonuna etkisinin değerlendirilmesi için SGK-1 inhibitörünün düşük ve yüksek dozu olarak 4 μM ve 16 μM konsantrasyonları ve 24 saatlik inkübasyon süresi seçildi. EGFR aktivasyonunun değerlendirilmesi için hücrelere EGF ligand uygulaması gereklidir. İnkübasyon süresinin sonunda EGF 5 ng/ml konsantrasyonda olacak şekilde A549 hücrelerine 10 dakika, H1299 hücrelerine ise 5 dakika uygulandı. Ligand uygulaması sonrasında hazırlanan hücre lizatlarıyla Western Blot deneyleri yapıldı.

A549 hücreleri 24 saat süreyle 4 μM ve 16 μM GSK650394 ile inkübe edildikten sonra p-EGFR ve EGFR ekspresyonlarına bakıldığında p-EGFR ve EGFR rölatif bant yoğunluğu ile p-EGFR/EGFR oranında anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.39, Tablo 4.19 ve Şekil 4.40). EGF uygulaması ile sonuçlara yüksek p-EGFR/EGFR oranı şeklinde yansıyan güçlü EGFR aktivasyonunun hem kontrol hem ilaç inkübasyonu yapılan hücrelerde benzer şekilde olduğu görüldü.



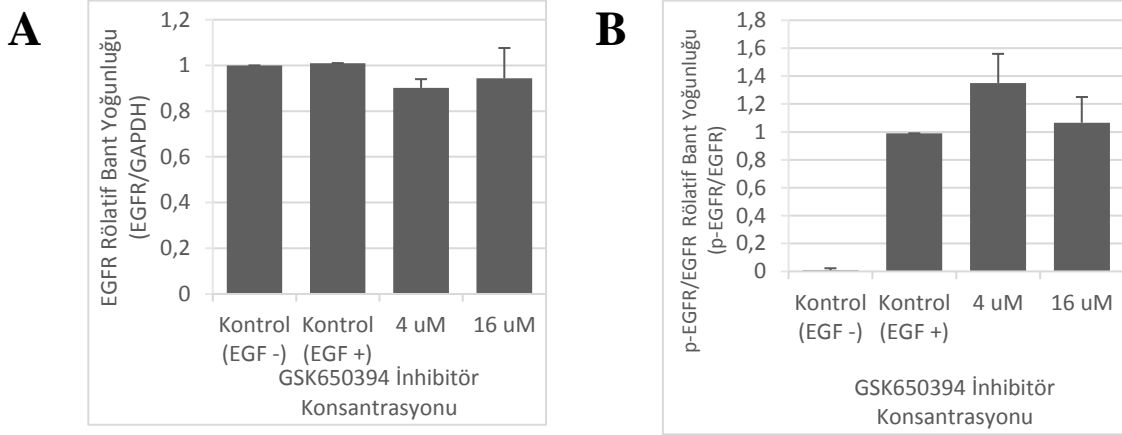
Şekil 4.39. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR aktivasyonuna (fosforilasyonuna) etkisinin incelenmesi.

A: p-EGFR.

B: EGFR.

Tablo 4.19. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu ve EGF ligand uyarısı ile EGFR (EGFR/GAPDH) ve fosforile EGFR (p-EGFR/EGFR) ortalama rölatif bant yoğunlukları (n=3).

GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH	
	EGFR/GAPDH	p-EGFR/EGFR
Kontrol (EGF (-))	1 \pm 0	0,01 \pm 0,01
Kontrol (EGF (+))	1,01 \pm 0	0,99 \pm 0
4 μ M	0,90 \pm 0,04	1,35 \pm 0,21
16 μ M	0,94 \pm 0,13	1,07 \pm 0,18



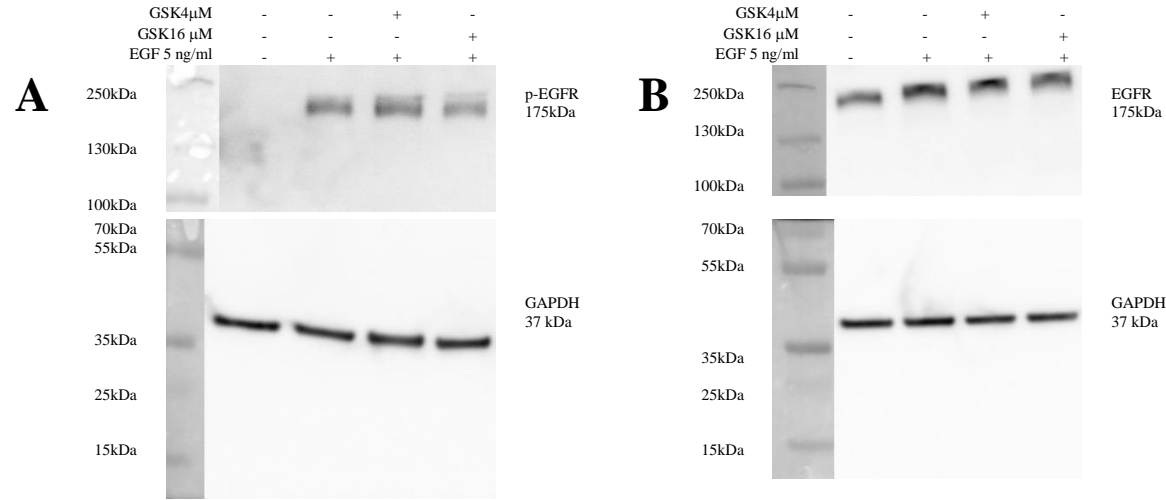
Şekil 4.40. A549 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR aktivasyonuna (p-EGFR ekspresyonuna) etkisi.

A: EGFR/GAPDH rölatif bant yoğunluğu.

B: p-EGFR/EGFR rölatif bant yoğunluğu.

(Densitometrik analiz, n=3).

H1299 hücreleri 24 saat süreyle 4 μ M ve 16 μ M GSK650394 ile inkübe edildikten sonra p-EGFR ve EGFR ekspresyonlarına bakıldığında p-EGFR ve EGFR rölatif bant yoğunluğu ile p-NDRG1/NDRG1 oranında anlamlı değişiklik izlenmedi (Şekil 4.41, Tablo 4.20 ve Şekil 4.42). Bu hücrelerde de EGF uygulaması ile sonuçlara yüksek p-EGFR/EGFR oranı şeklinde yansıyan güçlü EGFR aktivasyonunun hem kontrol hem ilaç inkübasyonu yapılan hücrelerde benzer şekilde olduğu görüldü.



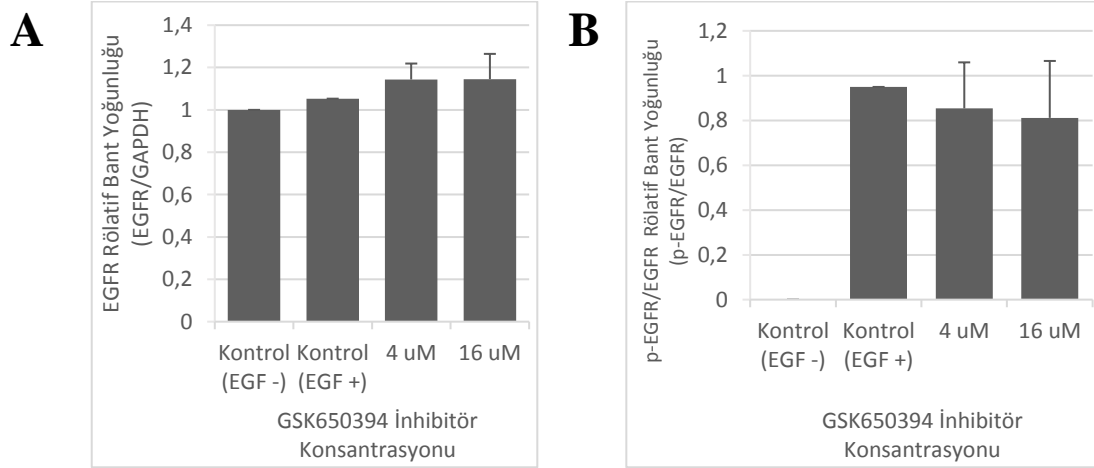
Şekil 4.41. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun EGFR aktivasyonuna (fosforilasyonuna) etkisinin incelenmesi.

A: p-EGFR.

B: EGFR.

Tablo 4.20. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonu ve EGF ligand uyarısı ile EGFR (EGFR/GAPDH) ve fosforile EGFR (p-EGFR/EGFR) ortalama rölatif bant yoğunlukları (n=3).

GSK650394 Dozu	Ortalama Rölatif Bant Yoğunluğu \pm SH	
	EGFR/GAPDH	p-EGFR/EGFR
Kontrol (EGF (-))	1 \pm 0	0 \pm 0
Kontrol (EGF (+))	1,05 \pm 0	0,95 \pm 0
4 μ M	1,14 \pm 0,07	0,85 \pm 0,21
16 μ M	1,14 \pm 0,12	0,81 \pm 0,25



Şekil 4.42. H1299 hücrelerinde 24 saat süreyle GSK650394 inkübasyonunun doza bağlı olarak EGFR aktivasyonuna (p-EGFR ekspresyonuna) etkisi.

A: EGFR/GAPDH rölatif bant yoğunluğu.

B: p-EGFR/EGFR rölatif bant yoğunluğu.

(Dansitometrik analiz, n=3).

5. TARTIŞMA

SGK-1'in tanımlanmasından sonra, akciğer ve solunum yolu epitel hücre biyolojisindeki farklı rollerinden biri olan sodyum iyon kanallarının kontrolü üzerindeki çalışmalara odaklanılmıştır (69, 70). Sodyum kanallarının kontrolünün bozulmasının, kistik fibrozis patofizyolojisinde klor kanallarındaki bozukluğa eşlik edebileceğini ve akut akciğer hasarında akciğerlerde gelişen ödem tablosunda rolü olabileceğini destekleyen bulgulara ulaşılmıştır (71-73). SGK-1'in influenza A virüsünün RNA'sının replikasyonunda ve çeşitli akciğer hastalıklarında izlenen pulmoner dolaşımın yeniden yapılanmasında (*remodeling*) rolü olabileceğini destekleyen bulgular da mevcuttur (74, 75).

Son yıllarda SGK-1'in akciğer kanserindeki rolü de dikkat çekmektedir. 2012 yılında, KHDAK tanısı alan kişilerin akciğer dokularında SGK-1 mRNA ve protein ekspresyonunu saptamayı amaçlamış ve ekspresyon ile tümör özellikleri arasındaki ilişki incelenmiştir. İmmünohistokimyasal boyama ile ortaya konan SGK-1 protein ekspresyon düzeyi ile tümör özellikleri arasında bir korelasyon saptanmamış olsa da SGK-1 mRNA ekspresyonu ile histolojik alt tip arasında (skuamöz hücreli akciğer kanseri) anlamlı ilişki saptanmıştır (76). Matschke ve arkadaşları bir KHDAK hücre dizisi olan H460 hücrelerinde ilk kez SGK-1 ekspresyonu göstermiş ve akut ve kronik hipoksik koşullarda SGK-1 aktivitesi ile hücre canlılığı ve radyoterapi direnci arasındaki ilişkiyi saptamışlardır (77). Xiaobo ve arkadaşları da, hasta örneklerinde tümör dokusu ile komşu normal akciğer dokusunu karşılaştırdıklarında tümör dokusunda SGK-1 mRNA ve protein ekspresyonlarında istatistiksel anlamlı artış saptamışlardır. Aynı araştırmada KHDAK hücre dizileri olan A549 ve H23 hücrelerinde SGK-1 ekspresyonu gösterilmiş ve ekspresyonun susturulmasının etkileri incelenmiştir (10). Son olarak Tang ve arkadaşları ise 2018 yılında yayınladıkları çalışmalarında 30 KHDAK hastasının eşleştirilmiş kanser ve normal dokularında SGK-1 mRNA ekspresyonunda kanserli dokularda normal dokulara kıyasla anlamlı artış saptamışlardır (78). A549 hücrelerinde SGK-1 ekspresyonu literatürde de gösterilmiş olmakla beraber, çalışmamızda farmakolojik inhibisyonun olası etkilerinin incelenmesi planlanan diğer KHDAK hücre dizisi olan H1299 hücrelerinde SGK-1 ekspresyonu ilk kez gösterildi. A549 hücrelerinin adenokarsinom, H1299 hücrelerinin

ise büyük hücreli karsinom yapısında olması iki hücre dizisini birbirinden ayıran histolojik özelliktir (64). Bu aşamadan sonra iki hücre dizisinde de inhibisyonun etkileri karşılaştırmalı olarak incelendi.

Kinaz aktivitesinin farmakolojik inhibisyonu planlanırken hem hücre toksisitesinden kaçınılmalı hem de yüksek konsantrasyonda inhibitör uygulamasının nonspesifik kinaz inhibisyonuna yol açabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu doğrultuda planladığımız ve inhibitörün hücre canlılığı üzerine etkisini değerlendirmeyi amaçladığımız MTT deneylerinde, SGK-1 inhibisyonu için kullanılan GSK650394 ile A549 hücrelerinin 16 μM ve 32 μM konsantrasyonlarda 72 saat süre ile inkübasyon sonrası %60-%70 oranında canlılığını sürdürdüğü dikkat çekti. H1299 hücrelerinde ise 24 ve 48 saat süreli inkübasyonlarda canlılığın %50'nin altına inmediği; ancak 72 saatin sonunda hücre canlılığının özellikle 16 μM ve 32 μM konsantrasyonlarda sırasıyla %39 ve %35 seviyelerine kadar indiği saptandı. SGK-1'in İnfluenza A virüsünün replikasyonuna olan etkilerinin incelendiği araştırmada da A549 hücrelerinde SGK-1 inhibisyonu için GSK650394 kullanılmış ve inhibitörün 50 μM dozunun 72 saatte hücre canlılığını %50'nin altına indirmediği görülmüştür (75). Bu araştırmada ilacın toksik etkisi 100 μM dozda 96 saat süreyle inkübasyonda ortaya çıkmıştır. GSK650394'ün 80-100 μM 'ın üzerindeki dozlarda apoptozisi indüklediği prostat kanseri hücrelerinde gösterilmiştir (79). Çalışmamızda inhibitörün en yüksek dozu 16 μM olarak seçilmiş olup yüksek dozlardaki nonspesifik kinaz inhibisyonu ve hücre ölümünden sakınılmıştır.

Çalışmamızda SGK-1 inhibisyonunun KHDAK hücrelerinin çoğalması ve koloni oluşturması üzerine etkilerinin değerlendirdiği kristal viyole ile boyama deneylerinde, subtoksik dozlarda farmakolojik inhibitör ile inkübasyonun hücre çoğalması ve koloni oluşturmasını istatistiksel anlamlı şekilde azalttığı saptandı. Xiaobo ve arkadaşları, 2016 yılında yayınladıkları araştırmada SGK-1 ekspresyonu transfeksiyon ile artırıldığında KHDAK hücre dizileri A549 ve H23 hücrelerinde hücre çoğalmasının ve koloni oluşumunun arttığını; siRNA uygulaması ile susturulması sonrasında ise hücre çoğalmasının ve koloni oluşumunun azaldığını kristal viyole yöntemi ile göstermişlerdir (10). Çalışmamızda kristal viyole deneylerinde, A549 hücrelerinin proliferasyonu ve koloni oluşumunun 9 gün süre ile

izlemi sonunda inhibitörün proliferasyonu azaltan etkisini destekleyici bulgular elde edildi. Antiproliferatif etki 16 μM dozda anlamlı bulundu ($p<0,05$). H1299 hücrelerinde ise MTT deneylerinde 72 saat süreli inkübasyonda toksik etki gözlenmişti, bu etki ile uyumlu olarak kristal viyole deneylerinde de 8 μM ve 16 μM dozlarda koloni sayılarında da anlamlı azalma görüldü ($p<0,05$). Çalışmamızda antiproliferatif etkinin gözlemlendiği inhibitör dozları literatür ile uyumlu bulundu (79). Bulgularımız, SGK-1 inhibisyonunun KHDAK hücrelerinde hücre tipine özgü farklı etki gücüne sahip olabileceğini göstermekte ve SGK-1'in KHDAK'da hücre proliferasyonunda mutlak rol aldığını doğrulamaktadır.

Çalışmamızda iki KHDAK hücre dizisinde, farmakolojik inhibisyonun SGK-1'in substratlarına etkisinin farklı olduğu saptandı. SGK-1'in özgün substratı olarak bilinen NDRG1'in fosforilasyonuna ilişkin olarak H1299 hücrelerinde p-NDRG1/NDRG1 bant yoğunluğu oranında istatistiksel anlamlı azalma (8 μM için $p<0,01$; 16 μM için $p<0,001$) saptanırken A549 hücrelerinde NDRG1 fosforilasyonunda azalma eğilimi izlendi ancak istatistiksel anlamlı azalma saptanmadı. Araştırmamızın hipotezi, SGK-1'in EGFR sinyal yolağı üzerine etkisinin NDRG1 aracılığıyla gerçekleşebileceğini temel aldığından inhibitöre yanıt farklılığının göz önünde bulundurulması önemlidir. Bununla birlikte, A549 hücrelerinde H1299 hücrelerinden farklı olarak 16 μM GSK650934 ile 24 saat süreyle inkübasyon ile, diğer bir SGK-1 substratı olan GSK3 β fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma izlendi (16 μM için $p<0,01$). Xiaobo ve arkadaşları, KHDAK hücre dizileri olan A549 ve H23 hücrelerinde SGK-1 transfeksiyonu ile p-GSK3 β ekspresyonunun arttığını; SGK-1 siRNA uygulaması ile SGK-1 ekspresyonunun susturulması sonrasında ise p-GSK3 β ekspresyonunun azaldığını saptamışlardır (10). SGK-1 tarafından GSK3 β 'nin fosforile edilerek inhibe edilmesine bağlı olarak beta-katenin ekspresyonunda anlamlı artış saptanmış ve bunun karsinogenezdeki etkisi in vitro migrasyon ve in vivo metastaz deneyleri ile doğrulanmıştır. Çalışmamızda A549 hücrelerinde kullandığımız subtoksik dozlarla sadece GSK3 β fosforilasyonunda anlamlı azalma görüldü. Bu etkinin, migrasyonu azaltıcı etkisinin olup olmadığının araştırılması da önem arz etmektedir.

Çalışmamızda SGK-1 inhibitörü ile inkübasyon sonrası iki hücre hattında da SGK-1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişiklik izlenmedi. Kolorektal kanser hücrelerinde SGK-1 inhibisyonunun etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise hücrelerin 10 µM GSK650394'ün 24 saat süre ile inkübasyonu sonrasında SGK-1 protein ekspresyonlarında anlamlı azalma saptanmıştır (80). GSK650394 inhibitörü ile inkübasyonun doza ve hücre tipine bağlı etkisinin hücre tipine özgü farklılık gösterebilir. Bununla beraber bu ajanın KHDAK hücrelerinde SGK-1 mRNA promotor aktivitesini etkileyip etkilemediği halen bilinmemektedir.

Araştırmamızın hipotezinde SGK-1'in KHDAK karsinogenezinde önemli rolü bulunan ve klinik uygulamada tedavi hedefi olan EGFR sinyal yolağı üzerine olası etkisinin, SGK-1 substratı olan NDRG1'in fosforilasyonunda gözlenecek azalma ile bağlantılı olacağı öngörüldü. Çalışmamızda bu doğrultuda SGK-1'in, EGFR sinyal yolağı üzerine olası etkilerinin değerlendirildiği deneylerde, iki KHDAK hücre hattında da SGK-1 inhibisyonu ile EGFR ekspresyonunda ve EGFR aktivasyonuna yönelik olarak incelenen p-EGFR ekspresyonunda anlamlı değişiklik izlenmedi. Kovacevic ve arkadaşları araştırmalarında, pankreas ve kolon adenokanseri hücre dizilerinde NDRG1 ekspresyonu ile EGFR sinyal yolağı arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Bu çalışmada, NDRG1 transfeksiyonu ile EGFR mRNA düzeylerinde anlamlı değişiklik saptanmamasına rağmen EGFR protein ekspresyonunun istatistiksel anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir. NDRG1 transfekte hücrelere EGF ligand uyarısı yapıldığında p-EGFR/EGFR oranında anlamlı değişiklik olmamıştır. Ancak p-EGFR/GAPDH oranında azalma dikkat çekmektedir. Bu sonuçlarla araştırmacılar NDRG1'in EGFR reseptör aktivasyonundan ziyade total EGFR ekspresyonu üzerine etkisi olduğuna kanaat etmişlerdir (13). Meme kanseri hücrelerinde NDRG1 düzeyinde artışın, ErbB/HER ailesinin bir üyesi olan HER3'ün proteozomal degradasyonuna yol açan ubikitin ligasyonunu uyardığı bildirilmektedir (81). Ubikitin ligasyonunu hızlandırıcı etkinin EGFR için de söz konusu olabileceği öne sürülmektedir (82). NDRG1 fosforilasyondan sonra proteozomal yıkıma gitmektedir (12). Çalışmamızda, NDRG1 fosforilasyonu önlenerek sitozoldeki düzeyinin konrunması hedeflenmiş ve total EGFR düzeyinde değişiklik yapıp yapmadığı sorgulanmıştır. Deneylerimizde NDRG1 fosforilasyonunda istatistiksel anlamlı azalmanın gösterilmiş olduğu H1299 hücre hattında, NDRG1'in proteozomal

yıkılma olasılığı inhibitörle engellendiği halde EGFR ekspresyonu ve aktivasyonunun (p-EGFR ekspresyonunun) değişmediği saptandı. KHDAK hücrelerinde olası etkinin NDRG1 transfeksiyonu ile incelenmesi, NDRG1-EGFR ilişkisini açıklamak için gereklidir.

Araştırma hipotezinde SGK-1 aktivitesi ile EGFR sinyal yolağı arasındaki bağlantıda aracı olan NDRG1 proteininin hücre biyolojisindeki rolü, son dönemde dikkat çeken bir araştırma konusudur. NDRG1 metastaz baskılayıcı olarak adlandırılmakta ve meme, serviks, prostat, kolorektal kanserler gibi bazı kanser tiplerinde düşük; akciğer, endometriyum, karaciğer kanserleri gibi bazı kanserlerde yüksek ekspresyon saptandığı belirtilmektedir (62). NDRG1'in farklı kanser tiplerinde tümör gelişimini destekleyici fonksiyon gösterebilecek şekilde dokuya özgün değişkenlik gösteren etkilerinden de bahsedilmektedir (62). NDRG1 ekspresyonu, KHDAK ve özellikle akciğer adenokarsinomu hücrelerinde daha ileri tümör evreleri, kanser kök hücresi benzeri özellikler ve akciğer adenokarsinomu olguları için daha kötü prognozla ilişkili saptanmıştır (62, 63, 83, 84).

NDRG1'in biyolojik rollerinde posttranslasyonel modifikasyonların önemi halen araştırılmaktadır. SGK-1'in NDRG1'i fosforilasyonu prostat kanseri hücrelerinde NF- κ B sinyal yolağını ve CXC kemokin ekspresyonunu baskılayıcı etki yapmaktadır (60). Meme kanseri hücrelerinde ise p-NDRG1'in inaktive edilip proteozomal yıkıma gittiği bildirilmektedir (12). Prostat kanseri hücre dizilerinde NDRG1 aminoasit dizisinin karboksi ucunu tanıyan primer antikora molekül ağırlığı olarak 41 ve 46 kDa'a karşılık gelecek şekilde iki bant görülmektedir. Ancak amino ucunu tanıyan primer antikoru kullanıldığında ise 46 kDa'a karşılık gelecek şekilde tek bant görüntüsü elde edilmiştir. Çift bant görünümünün alternatif *splicing*, fosforilasyonla ve glikozilasyonla ilişkili olmadığı doğrulanmıştır (85). Araştırmacılar elde ettikleri bulgularla, NDRG1'in hücre içinde parçalanarak kırılmış formunun oluştuğu sonucuna ulaşmışlardır. Çalışmamızda kullanılan NDRG1 primer antikoru, proteinin karboksi ucunu tanıyan bir antikordur (86). Bununla birlikte çalışmamızda iki hücre dizisinde de NDRG1 tek bant şeklinde görüntülenmiştir.

2018 yılında Park ve arkadaşları yayınladıkları araştırmalarında, NDRG1 izoformları ile fosforilasyonunun biyolojik etkilerini kolon, prostat ve hepatoselüler karsinom hücre dizilerinde değerlendirmişler ve NDRG1'in izoformlarına ve fosforile edildiği aminoasit rezidüsüne bağlı olarak proteinin hücresel lokalizasyonunda farklılık saptamışlardır (87). Bu araştırmada, NDRG1'in tam boyutlu formunun ve Serin330 rezidüsünden fosforile formunun ağırlıklı olarak nükleusta; kırılmış formu ile bizim araştırmamızda da NDRG1 fosforilasyonunu göstermek için incelenen, Treonin346 rezidüsünden fosforile formunun ağırlıklı olarak sitozolde yerleşim gösterdiği saptanmıştır. Son olarak araştırmacılar PTEN susturulmasının prostat kanseri hücrelerinde p-NDRG1 (Treonin346) ekspresyonunda anlamlı artışa yol açtığını göstermişler; ancak benzer etkiyi hepatoselüler karsinom hücrelerinde izlememişlerdir. PTEN ekspresyonu ile NDRG1 fosforilasyonu arasındaki bu ilişkinin KHDAK hücrelerinde mevcut olup olmadığı bilinmemektedir. A549 hücrelerinde güçlü PTEN ekspresyonu mevcutken, H1299 hücrelerinde PTEN ekspresyonu zayıftır (88). Hücrede NDRG1 fosforilasyonuna bağlı olarak görülen biyolojik etkinin; NDRG1'in hücredeki diğer proteinlerle etkileşimine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. KHDAK hücrelerinde de protein-protein etkileşimlerinin incelenmesi önemli görünmektedir.

Araştırmamızda, SGK-1 inhibisyonunun KHDAK hücrelerinde EGFR sinyal yolağı üzerine anlamlı etkisi saptanmamasına rağmen hücre çoğalması ve koloni oluşturmalarını azalttığı izlendi. Prostat kanseri hücrelerinde SGK-1'in GSK650394 ile inhibisyonu, SGK-1'in diğer bir substratı olan ubiquitin ligaz NEDD4-2 fosforilasyonunda azalma ile ilişkilendirmiştir (56). PI3K α inhibisyonuna dirençli meme kanseri hücrelerinde; bu dirençle ilişkili olan rezidüel mTORC1 aktivitesinin SGK-1 aktivitesi ile ilişkili olduğunu saptanmıştır (53). Kolon kanseri hücrelerinde SGK-1'in GSK650394 ile inhibisyonunun bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p27 ekspresyonunda artışa bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığı izlenmiştir (80). Prostat kanseri hücrelerinde GSK650394 ile SGK-1 inhibisyonu veya shRNA ile susturulmasının hücre siklusunun G2/M geçişinde durması ve apoptozisin uyarılmasıyla ilişkili olduğu; bu ilişkinin bir transkripsiyon faktörü olan Foxo3a ve p27 yolağına bağlı olduğu gösterilmiştir (79). 2018 yılında prostat kanseri hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ise GSK650394 ile SGK-1 inhibisyonunun hücrelerde,

Epitelyal Mezenkimal Dönüşümde rolü olan bir transkripsiyon faktörü olan Snail mRNA ekspresyonunda azalmaya sebep olarak *in vivo* ve *in vitro* olarak progresyon ve metastazda azalma ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (89). Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde SGK-1'in doğrudan substratı olarak veya substratı olan ubiquitin ligazların aktiviteleri üzerindeki etkileri nedeniyle hücre içerisinde hücre döngüsünün kontrolü ve apoptozis üzerinde etkilerinin olduğu dikkat çekmektedir. Araştırmamızda, SGK-1 inhibisyonunun KHDAK hücre çoğalması ve koloni oluşturması üzerine etkilerinin benzer mekanizmalara bağlı olup olmadığının araştırılması için ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Sonuç olarak, çalışmamızda SGK-1'in GSK650394 ile farmakolojik inhibisyonun KHDAK hücrelerinde doza ve süreye bağlı olarak EGFR sinyal yolağı üzerine etkisi ilk kez incelendi;

1. SGK-1 inhibitörü GSK650394'ün KHDAK hücre dizileri olan A549 ve H1299 hücrelerinde hücre çoğalması ve koloni oluşturmasını anlamlı şekilde azalttığı saptandı.
2. GSK650394 ile SGK-1 inhibisyonu ile, A549 hücrelerinde p-GSK3 β ; H1299 hücrelerinde ise p-NDRG1 ekspresyonlarında anlamlı azalma saptandı.
3. SGK-1 farmakolojik inhibisyonu ile farklı iki KHDAK hücre dizisinde EGFR sinyal yolağına ilişkin EGFR ekspresyonu ve EGF ligand uyarısı ile EGFR aktivasyonu (p-EGFR ekspresyonu)'nda anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

KHDAK tedavi stratejilerinden hedefe yönelik tedavilerin etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve mevcut tedavilere yeni alternatifler geliştirilmesi önem arz etmektedir. KHDAK ile SGK-1 aktivitesi ve/veya ekspresyonu ilişkisini ortaya koyan bulgular ve bizim verilerimiz SGK-1'in akciğer kanserinde önemli bir moleküler hedef olduğuna işaret etmektedir (10, 76). KHDAK tedavisinde

kullanımda olan EGFR, ALK, ROS inhibitörleri gibi hedefe yönelik tedaviler, belirli bir hasta grupları için endikedir. Çalışmamızda SGK-1 inhibisyonunun, KHDAK'de hücre çoğalması üzerine olan etkisi nedeniyle, SGK-1 inhibitörleri olası kombinasyon tedavileri için önemli bir seçenek olarak değerlendirilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. A549 hücrelerinde literatür bulguları ile uyumlu olarak SGK-1'in eksprese edildiği saptandı. H1299 hücrelerinde ise SGK-1 ekspresyonu ilk kez gösterildi.
2. SGK-1 inhibitörü GSK650394'ün A549 ve H1299 hücrelerinde subtoksik dozları 4 μ M, 8 μ M ve 16 μ M olarak belirlendi ve farmakolojik inhibisyon deneyleri planlandı.
3. Kristal viyole yöntemi ile GSK650394 ile inkübasyonun, A549 ve H1299 hücrelerinde hücre çoğalması ve koloni oluşumunu anlamlı olarak azalttığı belirlendi. H1299 hücrelerinin, A549 hücrelerine kıyasla antiproliferatif etkiye daha duyarlı cevap verdiği dikkat çekti. KHDAK'de hücrelerin proliferasyon için SGK-1 aktivitesine ihtiyaç duyduğuna kanaat edildi.
4. KHDAK'de SGK-1'in GSK650394 ile inhibisyona duyarlı olduğu; ancak A549 hücrelerinde GSK3 β , H1299 hücrelerinde ise NDRG1 substratının fosforilasyonunun inhibe olduğu saptandı. GSK3 β üzerindeki inhibitör etkinin KHDAK'de SGK-1 ile migrasyon/metastaz arasındaki ilişki açısından önemli olabileceği düşünüldü.
5. SGK-1 inhibitörü her iki hücre dizisinde de SGK-1 ekspresyonunu anlamlı olarak değiştirmedii.
6. H1299 hücrelerinde NDRG1 fosforilasyonu azalmasına rağmen kullandığımız inhibitör NDRG1 ile EGFR ekspresyonu arasındaki olası etkileşimi ortaya koyamadı. Bu nedenle NDRG1 düzeyi ile EGFR'nin ubiquitinasyonu arasındaki ilişkinin moleküler yöntemlerle incelenmesi yararlı bir yaklaşım olabilir. KHDAK hücrelerine NDRG1 transfeksiyonunun EGFR sinyal yolağı üzerine etkilerinin değerlendirilmesi bu ilişkiye ışık tutabilir.

7. KHDAK hücrelerinde, SGK-1'in inhibisyonunun Foxo3 ve p27 molekülleri ile ilişkisinin aydınlatılması, antiproliferatif etkinin mekanizmasının açıklanmasında yararlı olabilir.
8. SGK-1 inhibisyonunun, tedavi amaçlı da kullanımı olan tirozin kinaz inhibitörlerine duyarlı veya dirençli EGFR mutasyonu taşıyan KHDAK hücre dizilerinde tek başına veya tirozin kinaz inhibitörüyle kombine edildiğinde etkileri incelenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2017. Atlanta: American Cancer Society; 2017.
2. Nana-Sinkam SP, Powell CA. Molecular Biology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 2013;143(5 Suppl):e30S-e9S.
3. Horn L, Lovly CM, Johnson DH. Neoplasms of the Lung. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 19th Edition ed. New York: McGraw-Hill Education; 2015. p. 506-23.
4. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic. 2008;83(5):584-94.
5. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Jr., Wu YL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. Lancet. 2017;389(10066):299-311.
6. Tsiambas E, Lefas AY, Georgiannos SN, Ragos V, Fotiades PP, Grapsa D, et al. EGFR gene deregulation mechanisms in lung adenocarcinoma: A molecular review. Pathology - Research and Practice. 2016;212(8):672-7.
7. Castel P, Scaltriti M. The emerging role of serum/glucocorticoid-regulated kinases in cancer. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2017;16(1):5-6.
8. Talarico C, Dattilo V, D'Antona L, Menniti M, Bianco C, Ortuso F, et al. SGK1, the New Player in the Game of Resistance: Chemo-Radio Molecular Target and Strategy for Inhibition. Cellular Physiology and Biochemistry. 2016;39(5):1863-76.
9. Berdel HO, Yin H, Liu JY, Grochowska K, Middleton C, Yanasak N, et al. Targeting serum glucocorticoid-regulated kinase-1 in squamous cell carcinoma of the head and neck: a novel modality of local control. PLoS One. 2014;9(12):e113795.
10. Xiaobo Y, Qiang L, Xiong Q, Zheng R, Jianhua Z, Zhifeng L, et al. Serum and glucocorticoid kinase 1 promoted the growth and migration of non-small cell lung cancer cells. Gene. 2016;576(1 Pt 2):339-46.
11. Bae DH, Jansson PJ, Huang ML, Kovacevic Z, Kalinowski D, Lee CS, et al. The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers. J Clin Pathol. 2013;66(11):911-7.
12. Gasser JA. Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase Signaling in Breast Cancer [Doctoral dissertation]: Harvard University; 2014.

13. Kovacevic Z, Menezes SV, Sahni S, Kalinowski DS, Bae DH, Lane DJ, et al. The Metastasis Suppressor, N-MYC Downstream-regulated Gene-1 (NDRG1), Down-regulates the ErbB Family of Receptors to Inhibit Downstream Oncogenic Signaling Pathways. *J Biol Chem.* 2016;291(3):1029-52.
14. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı. Türkiye Kanser İstatistikleri. Ankara: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı; 2017.
15. Swanton C, Govindan R. Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;374(19):1864-73.
16. IARC. List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, Volumes 1 to 120 Lyon: IARC; 2017 [25.12.2017]. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Table4.pdf>.
17. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(3):288-300.
18. Wu K, House L, Liu W, Cho WCS. Personalized Targeted Therapy for Lung Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2012;13(9):11471.
19. Cooper WA, Lam DCL, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *Journal of Thoracic Disease.* 2013;5(Suppl 5):S479-S90.
20. Downward J. Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2003;3(1):11-22.
21. Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2008;9(7):517-31.
22. Linardou H, Dahabreh IJ, Kanaloupiti D, Siannis F, Bafaloukos D, Kosmidis P, et al. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncology.* 2008;9(10):962-72.
23. Tomizawa K, Suda K, Onozato R, Kosaka T, Endoh H, Sekido Y, et al. Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer.* 2011;74(1):139-44.
24. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2001;2(2):127-37.
25. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2002;2(7):489-501.
26. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer.* 2006;6(3):184-92.

27. Papadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibitors and Their Application in Personalized Therapy for Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2012;7(8):1315-26.
28. Solomon B, Varella-Garcia M, Camidge DR. ALK Gene Rearrangements A New Therapeutic Target in a Molecularly Defined Subset of Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2009;4(12):1450-4.
29. Krishnaswamy S, Kanteti R, Duke-Cohan JS, Loganathan S, Liu W, Ma PC, et al. Ethnic differences and functional analysis of MET mutations in lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(18):5714-23.
30. Chin LP, Soo RA, Soong R, Ou S-HI. Targeting ROS1 with Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibitors A Promising Therapeutic Strategy for a Newly Defined Molecular Subset of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2012;7(11):1625-30.
31. Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(8):863-70.
32. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nature Medicine*. 2012;18(3):382-4.
33. Dutt A, Ramos AH, Hammerman PS, Mermel C, Cho J, Sharifnia T, et al. Inhibitor-Sensitive FGFR1 Amplification in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Plos One*. 2011;6(6).
34. Knudson AG. ANTIONCOGENES AND HUMAN CANCER. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(23):10914-21.
35. Larsen JE, Minna JD. Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. *Clinics in Chest Medicine*. 2011;32(4):703-+.
36. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008;455(7216):1069-75.
37. Raso MG, Wistuba II. Molecular pathogenesis of early-stage non-small cell lung cancer and a proposal for tissue banking to facilitate identification of new biomarkers. *Journal of Thoracic Oncology*. 2007;2(7):S128-S35.
38. Mogi A, Kuwano H. TP53 Mutations in Nonsmall Cell Lung Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011.

39. Wistuba, II, Berry J, Behrens C, Maitra A, Shivapurkar N, Milchgrub S, et al. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(7):2604-10.
40. Steels E, Paesmans B, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *European Respiratory Journal*. 2001;18(4):705-19.
41. Jin G, Kim MJ, Jeon H-S, Choi JE, Kim DS, Lee EB, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*. 2010;69(3):279-83.
42. Marsit CJ, Zheng SC, Aldape K, Hinds PW, Nelson HH, Wiencke JK, et al. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Human Pathology*. 2005;36(7):768-76.
43. Larsen JE, Minna JD. *Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications*. *Clinics in Chest Medicine*. 2011;32(4):703-40.
44. Hammerman PS, Lawrence MS, Voet D, Jing R, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*. 2012;489(7417):519-25.
45. Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *Journal of Pathology*. 1999;188(4):351-60.
46. Balak MN, Gong Y, Riely GJ, Somwar R, Li AR, Zakowski MF, et al. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(21):6494-501.
47. Di Cristofano A. SGK1: The Dark Side of PI3K Signaling. *Current topics in developmental biology*. 2017;123:49-71.
48. Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol*. 1993;13(4):2031-40.
49. Garcia-Martinez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*. 2008;416(3):375-85.
50. Kobayashi T, Cohen P. Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochemical Journal*. 1999;339(Pt 2):319-28.

51. Murray JT, Campbell DG, Morrice N, Auld GC, Shpiro N, Marquez R, et al. Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem J.* 2004;384(Pt 3):477-88.
52. Sommer EM, Dry H, Cross D, Guichard S, Davies BR, Alessi DR. Elevated SGK1 predicts resistance of breast cancer cells to Akt inhibitors. *Biochem J.* 2013;452(3):499-508.
53. Castel P, Ellis H, Bago R, Toska E, Razavi P, Carmona FJ, et al. PDK1-SGK1 Signaling Sustains AKT-Independent mTORC1 Activation and Confers Resistance to PI3Kalpha Inhibition. *Cancer Cell.* 2016;30(2):229-42.
54. Weiler M, Blaes J, Pusch S, Sahm F, Czabanka M, Luger S, et al. mTOR target NDRG1 confers MGMT-dependent resistance to alkylating chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(1):409-14.
55. Nelson DL, Cox MM. Enzymes. In: Nelson DL, Cox MM, editors. *Lehninger Principles of Biochemistry: 6th Edition*: Macmillan Learning; 2013. p. 189-242.
56. Sherk AB, Frigo DE, Schnackenberg CG, Bray JD, Laping NJ, Trizna W, et al. Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. *Cancer Res.* 2008;68(18):7475-83.
57. Ortuso F, Amato R, Artese A, D'Antona L, Costa G, Talarico C, et al. In silico identification and biological evaluation of novel selective serum/glucocorticoid-inducible kinase 1 inhibitors based on the pyrazolo-pyrimidine scaffold. *Journal of chemical information and modeling.* 2014;54(7):1828-32.
58. Melotte V, Qu X, Ongenaert M, van Criekinge W, de Bruine AP, Baldwin HS, et al. The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: diverse functions, multiple applications. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2010;24(11):4153-66.
59. Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem.* 1996;271(47):29659-65.
60. Murakami Y, Hosoi F, Izumi H, Maruyama Y, Ureshino H, Watari K, et al. Identification of sites subjected to serine/threonine phosphorylation by SGK1 affecting N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1)/Cap43-dependent suppression of angiogenic CXC chemokine expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(2):376-81.
61. Sun J, Zhang D, Bae DH, Sahni S, Jansson P, Zheng Y, et al. Metastasis suppressor, NDRG1, mediates its activity through signaling pathways and molecular motors. *Carcinogenesis.* 2013;34(9):1943-54.
62. Fang BA, Kovacevic Z, Park KC, Kalinowski DS, Jansson PJ, Lane DJ, et al. Molecular functions of the iron-regulated metastasis suppressor, NDRG1, and its

potential as a molecular target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845(1):1-19.

63. Fan C, Yu J, Liu Y, Xu H, Wang E. Increased NDRG1 expression is associated with advanced T stages and poor vascularization in non-small cell lung cancer. *Pathol Oncol Res*. 2012;18(3):549-56.

64. Amann J, Kalyankrishna S, Massion PP, Ohm JE, Girard L, Shigematsu H, et al. Aberrant Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and Enhanced Sensitivity to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Research*. 2005;65(1):226.

65. Cowley GS, Weir BA, Vazquez F, Tamayo P, Scott JA, Rusin S, et al. Parallel genome-scale loss of function screens in 216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. *Scientific data*. 2014;1:140035.

66. Kovacevic Z, Sivagurunathan S, Mangs H, Chikhani S, Zhang D, Richardson DR. The metastasis suppressor, N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), upregulates p21 via p53-independent mechanisms. *Carcinogenesis*. 2011;32(5):732-40.

67. Crystal Violet Staining: OpenWetWare; 2008 [updated 22 August 2008; cited 2018 2 Aug]. Available from: https://openwetware.org/wiki/Crystal_Violet_Staining.

68. Okabe T, Okamoto I, Tamura K, Terashima M, Yoshida T, Satoh T, et al. Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. *Cancer Research*. 2007;67(5):2046-53.

69. Itani OA, Auerbach SD, Husted RF, Volk KA, Ageloff S, Knepper MA, et al. Glucocorticoid-stimulated lung epithelial Na(+) transport is associated with regulated ENaC and sgk1 expression. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;282(4):L631-41.

70. Inglis SK, Gallacher M, Brown SG, McTavish N, Getty J, Husband EM, et al. SGK1 activity in Na⁺ absorbing airway epithelial cells monitored by assaying NDRG1-Thr346/356/366 phosphorylation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2009;457(6):1287-301.

71. Wagner CA, Ott M, Klingel K, Beck S, Melzig J, Friedrich B, et al. Effects of the serine/threonine kinase SGK1 on the epithelial Na(+) channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2001;11(4):209-18.

72. He J, Qi D, Wang DX, Deng W, Ye Y, Feng LH, et al. Insulin upregulates the expression of epithelial sodium channel in vitro and in a mouse model of acute lung injury: role of mTORC2/SGK1 pathway. *Experimental cell research*. 2015;331(1):164-75.

73. Watt GB, Ismail NA, Caballero AG, Land SC, Wilson SM. Epithelial Na(+) channel activity in human airway epithelial cells: the role of serum and glucocorticoid-inducible kinase 1. *British journal of pharmacology*. 2012;166(4):1272-89.
74. BelAiba RS, Djordjevic T, Bonello S, Artunc F, Lang F, Hess J, et al. The serum- and glucocorticoid-inducible kinase Sgk-1 is involved in pulmonary vascular remodeling: role in redox-sensitive regulation of tissue factor by thrombin. *Circulation research*. 2006;98(6):828-36.
75. Alamares-Sapuay JG, Martinez-Gil L, Stertz S, Miller MS, Shaw ML, Palese P. Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 Is Required for Nuclear Export of the Ribonucleoprotein of Influenza A Virus. *Journal of Virology*. 2013;87(10):6020-6.
76. Abbruzzese C, Mattarocci S, Pizzuti L, Mileo AM, Visca P, Antoniani B, et al. Determination of SGK1 mRNA in non-small cell lung cancer samples underlines high expression in squamous cell carcinomas. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2012;31:4.
77. Matschke J, Wiebeck E, Hurst S, Rudner J, Jendrossek V. Role of SGK1 for fatty acid uptake, cell survival and radioresistance of NCI-H460 lung cancer cells exposed to acute or chronic cycling severe hypoxia. *Radiation oncology (London, England)*. 2016;11:75.
78. Tang Z, Shen Q, Xie H, Zhou Z, Shi G, Zhang C, et al. Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) is a predictor of poor prognosis in non-small cell lung cancer, and its dynamic pattern following treatment with SGK1 inhibitor and gamma-ray irradiation was elucidated. *Oncology reports*. 2018;39(3):1505-15.
79. Liu W, Wang X, Liu Z, Wang Y, Yin B, Yu P, et al. SGK1 inhibition induces autophagy-dependent apoptosis via the mTOR-Foxo3a pathway. *Br J Cancer*. 2017;117(8):1139-53.
80. Liang X, Lan C, Jiao G, Fu W, Long X, An Y, et al. Therapeutic inhibition of SGK1 suppresses colorectal cancer. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017;49:e399.
81. Verma N, Müller A-K, Kothari C, Panayotopoulou E, Kedan A, Selitrennik M, et al. Targeting of PYK2 Synergizes with EGFR Antagonists in Basal-like TNBC and Circumvents HER3-Associated Resistance via the NEDD4–NDRG1 Axis. *Cancer Research*. 2017;77(1):86-99.
82. Menezes SV, Sahni S, Kovacevic Z, Richardson DR. Interplay of the iron-regulated metastasis suppressor NDRG1 with epidermal growth factor receptor (EGFR) and oncogenic signaling. *J Biol Chem*. 2017;292(31):12772-82.
83. Wang Y, Zhou Y, Tao F, Chai S, Xu X, Yang Y, et al. N-myc downstream regulated gene 1(NDRG1) promotes the stem-like properties of lung cancer cells through stabilized c-Myc. *Cancer letters*. 2017;401:53-62.

84. Dai T, Dai Y, Murata Y, Husni RE, Nakano N, Sakashita S, et al. The prognostic significance of N-myc downregulated gene 1 in lung adenocarcinoma. *Pathology international*. 2018;68(4):224-31.
85. Ghalayini Mohammad K, Dong Q, Richardson Des R, Assinder Stephen J. Proteolytic cleavage and truncation of NDRG1 in human prostate cancer cells, but not normal prostate epithelial cells. *Bioscience Reports*. 2013;33(3).
86. Cell Signaling Technology. NDRG1 (D8G9) XP® Rabbit mAb Datasheet USA: Cell Signaling Technology; 2016 [
87. Park KC, Menezes SV, Kalinowski DS, Sahni S, Jansson PJ, Kovacevic Z, et al. Identification of differential phosphorylation and sub-cellular localization of the metastasis suppressor, NDRG1. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1864(8):2644-63.
88. Soria JC, Lee HY, Lee JI, Wang L, Issa JP, Kemp BL, et al. Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(5):1178-84.
89. Liu W, Wang X, Wang Y, Dai Y, Xie Y, Ping Y, et al. SGK1 inhibition-induced autophagy impairs prostate cancer metastasis by reversing EMT. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2018;37(1):73.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-1178

Konu :

06.12.2016

Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN
Tıp Fakültesi
Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Prof. Dr. DOĞAN,

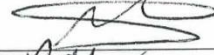
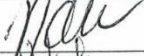




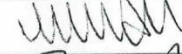
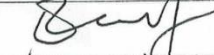
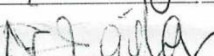
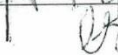


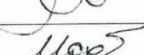


Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz GO 16/753 kayıt numaralı ve **“Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Serum ve Glukokortikoid ile İndüklenebilen Kinaz 1 (SGK-1) İnhibisyonunun Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) Aracılı Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisi”** başlıklı proje Kurulumuzun 06.12.2016 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, projenin çalışma materyalinin ticari olarak satın alınmış hücrelerde yapılacağı insandan elde edilen primer kültürlerin kullanılmayacağı görülmüştür Klinik Araştırmalar Yönetmeliği gereği gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek nitelikte olmayan bu tıp çalışmalar Etik Kurulların kapsamı dışında kalmaktadır.

Bu yazı Etik Kurul kararı yerine geçmek üzere hazırlanmıştır.



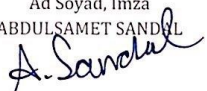

Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU
Başkan

Eki: Toplantı katılım tutanağı.

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06/12/2016 tarih ve 24 no'lu toplantı
KATILIM DURUMU

Prof. Dr. Sevda MÜFTÜOĞLU	
Prof. Dr. A.Nurten AKARSU	
Prof. Dr. Yıldırım SARA	
Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ	
Prof.Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU	
Prof. Dr. R.Köksal ÖZGÜL	İZİNLİ
Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	İZİNLİ
Prof.Dr.Mintaze Kerem GÜNEL	
Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	
Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN	
Prof. Dr. Necdet SAĞLAM	
Doç. Dr. Gözde GİRGİN	
Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	İZİNLİ
Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	
Yrd. Doç. Dr. Can Ebru KURT	
Öğr. Gör. Dr.Müge DEMİR	
Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN	
Av. Meltem ONURLU	

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

	T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	FORM: 
Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne		Tarih: 03/10/2018
Adı Soyadı:	ABDULSAMET SANDAL	
Öğrenci No:	N09143642	
Anabilim Dalı:	Temel Onkoloji	
Programı:	Tümör Biyolojisi Ve İmmünolojisi - Doktora	
Statüsü:	<input type="checkbox"/> Y.Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/> Bütünleşik Dr.	
Tez Başlığı / Konusu:	KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE SERUM VE GLUKOKORTİKÖİD İLE İNDÜKLENEBİLEN KİNAZ 1 (SGK-1) İNHİBİSYONUNUN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFR) ARACILI SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	
<p>Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 96 sayfalık kısmına ilişkin, 03/10/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından <i>Turnitin</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'olarak tespit edilmiştir.</p> <p>Uygulanan filtrelemeler:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1- Kaynakça hariç 2- Alıntılar hariç / dahil 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç <p>Hacettepe Üniversitesi "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları"nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.</p> <p>Gereğini saygılarımla arz ederim.</p>		
		Ad Soyad, İmza ABDULSAMET SANDAL 
<p>Ek: 1 Adet, tezin tam başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve dosyanın toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra alınacak ekran görüntüsü Örnek: Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları Madde 5 (4) Ek 1</p>		
DANIŞMAN ONAYI		UYGUNDUR.
		03/10/2018 (Ünvan, Ad Soyad, Tarih İmza) Prof. Dr. AYŞE LALE DOĞAN 
<p>Detaylı Bilgi: http://www.saglikbilimleri.hacettepe.edu.tr Telefon: (312) 305 10 90 – 91 Fax: (312) 309 31 90 E-Posta: sbe@hacettepe.edu.tr</p>		

EK-3: Turnitin Programı Ekran Görüntüsü Çıktısı

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Serum ve Glukokortikoid İle İndüklenebilen Kinaz 1 (SGK-1) İnhibisyonunun Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) Aracılı Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisi

ORIGINALITY REPORT

5%	3%	3%	1%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	katalog.hacettepe.edu.tr Internet Source	<1%
2	Yueqing Gong, Kun Wang, Sheng-Ping Xiao, Panying Mi, Wanjie Li, Yu Shang, Fei Dou. "Overexpressed TTC3 Protein Tends to be Cleaved into Fragments and Form Aggregates in the Nucleus", NeuroMolecular Medicine, 2018 Publication	<1%
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Student Paper	<1%
4	Yu, Fu-Xiang, Yin-Yan Teng, Qian-Dong Zhu, Qi-Yu Zhang, and Yin-He Tang. "Inhibitory effects of capsaicin on hepatic stellate cells and liver fibrosis", Biochemistry and Cell Biology, 2014. Publication	<1%

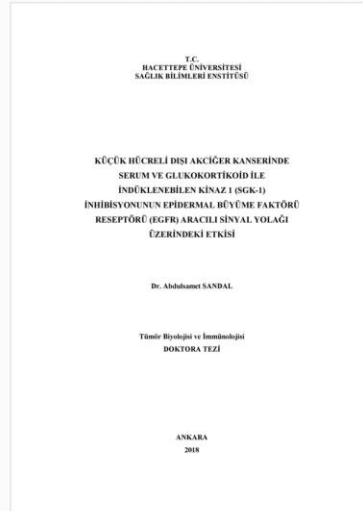


Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Abdulsamet Sandal
Assignment title: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserin..
Submission title: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserin..
File name: tez_duzeltmeler_sonrasi_abdulsam..
File size: 2.2M
Page count: 96
Word count: 17,000
Character count: 107,069
Submission date: 03-Oct-2018 08:03AM (UTC+0300)
Submission ID: 1012866783



9. ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Abdulsamet SANDAL

Doğum yeri ve tarihi: Elazığ, 28.03.1989

Uyruğu: T.C.

İletişim adresi ve telefonu: Kültür Mah. Yüksel Cad. 41/4 Kolej Çankaya/Ankara
05425821550

II-Eğitim

Tıpta Yan Dal Uzmanlık - İş ve Meslek Hastalıkları (2016 – Halen)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İş ve Meslek Hastalıkları Bilim Dalı

Doktora - Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi (2009 – 2018)

Hacettepe Üniversitesi, Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık - Göğüs Hastalıkları (2011 – 2015)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

Lisans - Tıp (2005 – 2011)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp (İngilizce)

III-Mesleki Deneyim

Araştırma Görevlisi (2011 – Halen)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

III-Bilimsel Faaliyetler

Yayınlar

1. Sandal A, Köksal D, Aksu F, Maden E. Endobronchial Metastasis from an Osteosarcoma Case. Respir Case Rep 2015;4(1):34-37.
2. Ozturk O, Sandal A, Karahan S, Er B, Onder S, Koksak D, Maden E, Emri S. Diagnostic yield of conventional transbronchial needle aspiration biopsy (C-TBNA) without an on-site cytopathologist: Experience of 363 procedures in 219 patients. Tuberk Toraks 2016;64(2):137-143.

3. Sandal A, Kilickap S, Yildiz AN. Overview of Occupational Cancer. Turkish Journal of Occupational Health and Safety 2017;65:41-7.
4. Nuraydın, A., Bilek, Ö., Kenziman, A. K., Korkusuz, M. A., Atagün, A. İ., Özpolat-Çakar, N., Özer, N., Deniz, S., Başaralı, M. K., Özlü, A., Sandal, A., van der Laan, G., Yıldız, A. N. (2018). The Mersin Greenhouse Workers Study. Surveillance of Work-related Skin, Respiratory, and Musculoskeletal Diseases. Annals of Global Health. 84(3), pp.504–511.

Bildiriler

1. Yonar D, Sandal A, Emri S, Severcan F. A Novel Method for Early Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma from Human Serum Samples: ATR-FTIR Spectroscopy, Biophysical Society 59th Annual Meeting. Biophysical Journal , Volume 108 , Issue 2 , 626a. Poster presentation 3156-Pos.
2. Ozturk O, Sandal A, Karahan S, Er B, Onder S, Koksall D, Maden E, Emri S. Diagnostic value of conventional transbronchial needle aspiration without an on-site cytopathologist: Experience of 363 procedures. ERS International Congress 2015. Eur Respir J 2015; 46: Suppl. 59, Poster presentation PA313.
3. Kutukcu E, Arikan H, Saglam M, Yagli N, Ince D, Oksuz C, Savci S, Duger T, Coplu L, Sandal A. Relationship between multidimensional disease severity and activities of daily living in patients with chronic obstructive pulmonary disease. ERS International Congress 2015. Eur Respir J 2015; 46: Suppl. 59, Poster presentation PA3293.
4. Sandal A, Yazıcı E, Aksu F, Köksal D, Maden E, Emri S. Erişkin Primer İmmün Yetmezlikli Hastalarımızın Klinik ve Radyolojik Özellikleri. 1st Clinical Immunology Congress, 09-12 April 2015, Antalya. Poster presentation.
5. Emri S, Yonar D, Sandal A, Yilmaz U, Severcan F. Differentiation of Mesothelioma from Lung Cancer and Healthy Individuals Using Human Serum by ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometrics, IASLC WCLC 2015. Journal of Thoracic Oncology , Volume 10 , Issue 9 , S407 - S760. Poster presentation P2.08-012.
6. Sandal A, Aksu F, Önder S, Maden E, Köksal D, Emri S. Trakeaobronşiyal tutulum ile seyreden nazofaringeal NK/T-Hücreli lenfoma olgusu. TUSAD 37th National Congress SOLUNUM 2015, 17-21 October 2015, İzmir. Poster presentation EP-022.
7. Sandal A, Korkmaz E, Aksu F, Koksall D, Selcuk ZT, Demir A, Emri S, Coplu L. Akut pulmoner tromboemboli tanılı 414 olguda erken ve geç dönem mortalite ile mortalite belirleyicilerinin retrospektif değerlendirmesi. Turkish Thoracic Society 19th Annual Congress, 06-10 April 2016, Antalya, Poster presentation SS-051.
8. Koyuncu A, Sandal A, Ecin SM, Yıldız AN. Meslek Hastalıkları İçinde Pnömkonyozun Dağılımı (2006 – 2015). TUSAD 39th National Congress SOLUNUM 2015, 17-21 October 2015, İzmir. Oral presentation.
9. Sandal A, Ecin SM, Koyuncu A, Yıldız AN. Pnömkonyoz Olgularında Pozitron Emisyon Tomografi Temelli Görüntülem Yöntemlerinin Uygulanması: Literatür Derlemesi. TUSAD 39th National Congress SOLUNUM 2015, 17-21 October 2015, İzmir. Oral presentation.

10. Ecin SM, Koyuncu A, Sandal A, Yıldız AN. Pnömokonyoz Ve Sigara Kullanımı İlişkisi. TUSAD 39th National Congress SOLUNUM 2015, 17-21 October 2015, İzmir. Poster presentation.
11. Sandal A, Ecin SM, Koyuncu A, Yıldız AN. Application of positron emission tomography based imaging in the management of pneumoconiosis cases: a literature review. *Occup Environ Med* 2018;75:A385, ICOH Dublin 2018 Congress Poster presentation 732.
12. Koyuncu A, Sandal A, Ecin SM, Yıldız AN. Evaluation of pneumoconiosis in turkey's annual statistics of occupational diseases between 2006 and 2015. *Occup Environ Med* 2018;75:A385-A390, ICOH Dublin 2018 Congress Poster presentation 746.
13. Ecin SM, Koyuncu A, Sandal A, Yıldız AN. Evaluation of the relationship between smoking and pneumoconiosis: a review of the literature. *Occup Environ Med* 2018;75:A386, ICOH Dublin 2018 Congress Poster presentation 741.
14. Sandal A, Ecin SM, Koyuncu A, Yıldız AN. Evaluation of Occupational Medicine Sub-Specialty Education Programs in Turkey. The Ministry of Labour and Social Security 9th International Congress on Occupational Safety and Health 2018, Poster presentation PS-164.
15. Sandal A, Yıldız AN. Evaluation of Occupational Medicine Sub-specialty Education Program of Hacettepe University Faculty of Medicine. The Ministry of Labour and Social Security 9th International Congress on Occupational Safety and Health 2018, Poster presentation PS-163.
16. Sandal A, Yıldız AN. Work-related Inequalities and Their Health Effects. The Ministry of Labour and Social Security 9th International Congress on Occupational Safety and Health 2018, Oral presentation SS-088.

