

**ABT-737 ve RAD-001(Everolimus) İlaç
Kombinasyonunun Böbrek Kanseri Üzerinde
Kemoteropatik Özelliğinin RenCa Hücre Modeli ile
Balb-c Fareleri Üzerinde İncelenmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 114S332

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Dilek Telci

Araştırmacı(lar):

Prof. Dr. Asif Yıldırım

Danışman(lar):

Prof. Dr. Faruk Yencilek

Bursiyer(ler):

Halime İlhan

Bürge Ulukan

KASIM 2017

İSTANBUL

ÖNSÖZ

“ABT-737 ve RAD-001(Everolimus) İlaç Kombinasyonunun Böbrek Kanseri Üzerinde Kemoteropatik Özelliğinin RenCA Hücre Modeli ile Balb-c Fareleri Üzerinde İncelenmesi” başlıklı projemizde Bcl-2 ifadesi gösteren ve Everolimus direncine sahip primer A-498 ve metastatik Caki-1 BHK hatları kullanılmıştır. BHK kanseri tedavisi; PI3K (fosfotidilinositol-3-kinaz)-AKT-mTOR (memelilerin rapamisin hedefi) yolağının Everolimus gibi rapalog ilaçlarla inhibasyonuna yöneliktir. Ancak bu ilaçlarla yapılan kemoterapötik tedaviler gelişen ilaç direnci yüzünden başarıya ulaşamamaktadır. Proje kapsamında BHK’da gelişen Everolimus direncinin Bcl-2 sağkalım yolağının aktif olarak sağlandığı hipotezimizi kurulmuş ve BHK tedavisinde Everolimus ile ABT-737 Bcl-2 inhibitörü kombinasyonunun daha etkili olabileceği öne sürülmüştür. Elde edilen sonuçların ışığında Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun BHK hücre hatları üzerinde etkin olduğu ve oluşturulan Everolimus dirençli RenCa (erRenCa) Balb-c fare böbrek kanseri modelinde başarılı olduğu tespit edilmiştir. Moleküler yolak çalışmaları Everolimus direncinde Bcl-2 sağkalım yolağının FKBP38 proteinin üzerinden aktive edildiği ve ABT-737’nin bu birlikteliğe ket vurarak etkinliğini sağladığını öne sürmüştür. Projemiz (114S332) Tübitak Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından desteklenmiş ve çalışmalarımız T.C. Yeditepe Üniversitesi Laboratuvarları’nda sürdürülmüştür.

İçindekiler

1. Giriş.....	1
2. Literatür özeti.....	1
3. Gereç ve yöntem	9
3.1 Hücre Kültürü	9
3.2 Antikor ve Materyaller	9
3.3 WST-1 Hücre Canlılığı Testi	10
3.4 Hücre Döngüsünün Belirlenmesi	10
3.5 Annexin-V Hücre Ölümü Testi	10
3.6 Western Emdirimi	11
3.7 İmmün çökeltme Metodu	11
3.8 shRNA Aktarımı	12
3.9 İlaç Dirençli RenCa Hücrelerinin Geliştirilmesi	12
3.10 erRenCa Hücreleri ile Balb-c Farelerde Böbrek Kanseri Modeli Oluşturulması	13
4. BULGULAR	14
4.1 Primer ve metastatik böbrek hücreli karsinoma (BHK) hücre hatlarında Bcl-2 ve Bcl-xL ifade tespiti	14
4.2 A-498 ve Caki-1 BHK'de mTOR aktivasyonu karakterizasyonu	16
4.3 Everolimus ve ABT-737 kemoterapötik ilaçlarının A-498 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	22
4.4 Everolimus ve ABT-737 kemoterapötik ilaçlarının Caki-1 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	25
4.5 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun A-498 BHK hücre döngüsü üzerine etkisinin belirlenmesi	29
4.6 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun A-498 ve Caki-1 hücre döngüsü üzerindeki etkisinin detaylı olarak incelenmesi	33
4.7 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTOR yolağı üzerindeki etkisinin tespit edilmesi	36
4.8 Caki-1 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTOR sağkalım yolağına etkisinin tespit edilmesi	40
4.9 Everolimus ve ABT-737'nin hücre ölümüne etkisinin A-498 hücrelerinde tespit edilmesi	42
4.10 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun metastatik Caki-1 hücre ölümü üzerine etkisi	44
4.11 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun A-498 ve Caki-1 apoptoz moleküler mekanizmasına etkisinin tespit edilmesi	47

4.12	Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun Bcl-2 güdümlü apoptoz yolağı üzerindeki etkisinin analiz edilmesi	49
4.13	Everolimus ve ABT-737 kemoterapötik ilaçlarının RenCa hücre canlılığı üzerindeki etkileri	53
4.14	Everolimus'a dirençli RenCa hücrelerinin geliştirilmesi	54
4.15	Everolimus ve ABT-737 kemoterapötik ilaçlarının erRenCa hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi	55
4.16	RenCa ve erRenCa hücre modellerinde mTOR yolağının incelenmesi	57
4.17	RenCa ve erRenCa hücre modellerinde anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin incelenmesi	59
4.18	Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun BHK hücre hattı üzerindeki etkisinin in-vivo deneyler ile doğrulanması	59
4.19	FKBP38 proteini ile Bcl-2 proteininin etkileşiminin incelenmesi	63
4.20	İlaç uygulanan A-498 hücrelerinde FKBP38 proteinin Bcl-2 ve mTOR proteinleri ile etkileşiminin incelenmesi	65
4.21	A-498 hücrelerinde FKBP38 proteininin susturulması	66
4.22	Susturulmuş FKBP38 proteininin Everolimus muamelesi sonucunda hücre canlılığına etkisinin incelenmesi	66
5.	Tartışma/Sonuç	68
6.	Kaynaklar	73

Tablo ve Şekil Listeleri

Şekil 1. Böbrek kanseri hücre hatlarında Bcl-2 ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespit edilmesi.	14
Şekil 2. Böbrek kanseri hücre hatlarında Bcl-xL ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespit edilmesi.	15
Şekil 3. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde AKT aktivasyonunun Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	17
Şekil 4. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde Rheb protein ifadesinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	17
Şekil 5. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde mTOR'un S2448'de fosfatlanmış türevinin ifadesinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	18
Şekil 6. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde 4E-BP1 ve fosfatlanmış türevlerinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	19
Şekil 7. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde p70S6K ve fosfatlanmış türevlerinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	19
Şekil 8. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde S6 ve fosfatlanmış türevlerinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	20
Şekil 9. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde Rictor ve fosfatlanmış türevinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	21
Şekil 10. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde AKT aktivasyonunun Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	21
Şekil 11. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde mTOR'un S2481'de türevlerinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	22
Şekil 12. A-489 BHK'da farklı dozlardaki Everolimus'un hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.	23
Şekil 13. A-489 BHK'da farklı dozlardaki ABT-737'nin hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.	24
Şekil 14. A-498 BHK'da Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile tespit edilmesi.	25
Şekil 15. Caki-1 BHK'da farklı dozlardaki Everolimus'un hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.	26
Şekil 16. Caki-1 BHK'da farklı dozlardaki ABT-737'nin hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.	26
Şekil 17. Erken pasajlı Caki-1 BHK'da farklı dozlardaki Everolimus'un hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.	27

Şekil 18. Erken pasaj Caki-1 BHK'da farklı dozlardaki ABT-737'nin hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.	28
Şekil 19. Caki-1 BHK'da Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile tespit edilmesi.	29
Şekil 20. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre siklüsü üzerine etkisinin Akış Sitometresi yöntemi ile tespit edilmesi.	30
Şekil 21. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu uygulanan A-498 BHK hücrelerinde Siklin D1 ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespit edilmesi.	31
Şekil 22. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu uygulanan A-498 BHK hücrelerinde Siklin D3 ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespit edilmesi.	32
Şekil 23. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu uygulanan A-498 BHK hücrelerinde p27/Kip1 ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespit edilmesi.	33
Şekil 25. Caki-1 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre döngüsünde rol oynayan proteinlerin üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	35
Şekil 26. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun AKT ve mTORC1 kompleksinde bulunan mTOR kinazı aktivasyonu üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	36
Şekil 27. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun protein sentezinden sorumlu p70S6 kinazı ile alt yolak S6 proteini üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	37
Şekil 28. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun protein sentezi regülatör proteini 4E-BP1 ifadesi üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	38
Şekil 29. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTORC2 kompleksi üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	39
Şekil 30. Caki-1 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTOR yolağı üzerindeki etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	41
Şekil 31. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi.	42
Şekil 32. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi.	43
Şekil 33. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi.	44
Şekil 34. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi.	45

Şekil 35. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi.	46
Şekil 37. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun kaspaz yolağı üzerindeki etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	48
Şekil 38. Caki-1 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun kaspaz yolağı üzerindeki etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	49
Şekil 39. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun Bcl-2 protein ailesi üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	50
Şekil 40. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	51
Şekil 41. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun p53, Puma ve Noxa proteinleri üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	52
Şekil 42. RenCa hücre modelindeki farklı dozlardaki Everolimus'un hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.	53
Şekil 43. RenCa hücre modelindeki farklı dozlardaki ABT-737'nin hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.	54
Şekil 44. erRenCa hücrelerin Everolimus'a direnç kazanmasının WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.	55
Şekil 45. erRenCa hücrelerin ABT-737 muamelesi sonucunda hücre canlılığının WST-1 testi ile belirlenmesi.	56
Şekil 46. erRenCa hücrelerin yüksek konsantrasyonlarda ABT-737 muamelesi sonucunda hücre canlılığının WST-1 testi ile belirlenmesi.	57
Şekil 47. RenCa ve erRenCa hücrelerinde mTOR yolağında görev alan protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	58
Şekil 48. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin ifade düzeylerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.	59
Şekil 50. Hayvanlardan elde edilen tümör dokularının histopatolojik olarak incelenmesi.	63
Şekil 51. A-498 hücrelerinde immün çöktürme yöntemi kullanılarak proteinlerinin (a) FKBP38 antikoru ya da (b) Bcl-2 antikoru ile çöktürülmesi sonrasında FKBP38-Bcl-2 protein-protein etkileşiminin Western Emdirimi yöntemi kullanılarak belirlenmesi.	64
Şekil 52. A-498 hücrelerinde immün çöktürme yöntemi kullanılarak proteinlerinin (a) FKBP38 antikoru ya da (b) mTOR antikoru ile çöktürülmesi sonrasında FKBP38-mTOR protein-protein etkileşiminin Western Emdirimi yöntemi kullanılarak belirlenmesi.	64
Şekil 53. A-498 hücrelerinin ilaç muamelesi sonrasında proteinlerinin Bcl-2 antikoru ile çöktürülmesi sonrasında FKBP38 ile olan ilişkisinin Western Emdirimi yöntemi kullanılarak belirlenmesi.	65

Şekil 55. A-498 hücrelerinde shFKBP38 aktarımı sonrasında FKBP38 protein ifadesinin Western Emdirimi ile tespit edilmesi. 66

Şekil 56. Farklı dozlardaki Everolimus'un 24 saat boyunca muamelesinin, (a) kontrol shRNA ve (b) shFKBP38 aktarımı yapılmış A-498 hücre canlılığına etkisinin WST-1 testi ile belirlenmesi. 67

ÖZET

Böbrek hücreli karsinoma (BHK) yetişkinlerdeki malignant tümörlerin %2-3'ünü oluşturmaktadır. BHK tümörlerinin %90'nında von Hippel–Lindau (VHL) tümör baskılayıcı geninde mutasyon bulunması bu tümörlerin hipoksik ortam koşullarını taklit ederek yoğun damarlaşma, hızlı büyüme ve yüksek invaziv potansiyel göstermesine sebebiyet vermektedir. VHL fonksiyon bozukluğu sonrası HIF- α transkripsiyon faktörlerinin aktive olarak PI3K (fosfotidilinositol-3-kinaz)-AKT-mTOR (memelilerin rapamisin hedefi) yolağı sağkalım mekanizmasını harekete geçirdiği ve hücre transformasyonunu sağlayan mutasyon birikmesine sebebiyet verdiği bildirilmiştir. Metastatik BHK tedavisinde kullanılan ilaçlar bu kinaz yolağını durdurarak hücre büyüme/sağkalımını inhibe etmeye yöneliktir.

BHK tedavisinde mTOR serin/treonin kinazının baskılanması hedef alınarak Temsirolimus, Everolimus ve Deferolimus gibi rapamisin analoglarının kullanımı yoluna gidilmiştir. Ancak bu ilaçlarla yapılan kemoterapötik tedaviler ileri evre yada metastatik BHK sahip hastaların ömürlerini sadece uzatabilmekte hastalığı tedavi ederek ölüm oranını azaltamamaktadır. Proje kapsamında BHK'da gelişen Everolimus direncinin Bcl-2 sağkalım yolağının aktif olarak sağlandığı hipotezimizi kurulmuş ve BHK tedavisinde Everolimus ile ABT-737 Bcl-2 inhibitörü kombinasyonunun daha etkili olabileceği öne sürülmüştür. Deney düzeneğimizde Bcl-2 ifadesi gösteren ve Everolimus direncine sahip primer A498 ve metastatik Caki-1 BHK hatları ile Everolimus'a dirençli hale getirilmiş fare BHK hattı erRenCa kullanılmıştır. WST-1, Western Emdirimi ve Annexin V deney sonuçlarımız, A498, Caki-1 ve erRenCa BHK hatlarında Everolimus ile ABT-737 kombinasyonunun 24 saat içerisinde mTOR yolağını durdurarak hücre büyümesine ket vurduğunu, hücre siklusunu G1 fazında tutarak hücre bölünmesini engellediğini gösterirken ilerleyen saat inkübasyonlarında bu hücrelerde apoptotik yolağın Kaspaz 9 ve 3'ün aktive ederek apoptotik hücre ölümünün tetiklendiği gösterilmiştir. erRenCa hücreleri kullanılarak oluşturulan xenograf kanser modelinde monoterapilerin tümör gelişimini baskılamada 100'de 100 başarı göstermezken Everolimus-ABT-737 ilaç kombinasyonunun in-vivo tümör gelişimini tamamıyla engellediği ortaya konmuştur. Literatürde FKBP38 proteininin Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerine bağlanarak aktivasyonunda rol aldığı gösterilmiştir. Everolimus-ABT-737 ilaç kombinasyonu etkinliğinin moleküler mekanizmasını açığa kavuşturmak için yaptığımız eş-immün çökeltme (co-IP), WST-1 ve Western Emdirimi deneyleri Everolimus direncinde FKBP38 proteininin rol oynadığını ileri sürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Memelilerin rapamisin hedefi (mTOR), Bcl-2, Böbrek Hücreli Karsinoma (BHK), FKBP38

ABSTRACT

The renal cell carcinoma (RCC) is the most common kidney cancer observed in adults (85%) and 20-30% of patients were diagnosed with RCC at locally advanced or metastatic stage. One out of 10 RCC tumors contain mutated von Hippel–Lindau (VHL) tumor suppressor protein resulting in mimicry of hypoxic conditions nurturing enhanced angiogenesis, cell proliferation and high metastatic potential. Primary consequence of a defect in VHL is the constitutive activation of the transcription factor HIF- α which leads to the dysregulation of phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/AKT/ mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway.

The PI3K/AKT/mTOR pathway plays the major role in the tumorigenesis and has been targeted by rapalogs Temsirolimus, Everolimus ve Deferolimus. However, tumors acquire resistance to rapalogs that target the mTOR kinase activity. The overexpression of Bcl-2 protein is suggested to be responsible for the drug-resistance. In this regard, we aim in our study to overcome the drug resistance by a combination therapy of everolimus with ABT-737, a Bcl-2 inhibitor. In this study, ABT-737 was used either alone or in combination with everolimus on primary site (A-498) and metastatic site (Caki-1) RCC cell lines. The use of ABT-737 and its combination with everolimus led to a dramatic decrease cell viability by inducing apoptotic cell death. The combination therapy further led to cell cycle arrest concomitant with the abrogation of AKT/mTOR signaling. Administration of everolimus and ABT-737 combination to BALB/c mice subcutaneously inoculated with the established everolimus-resistant RenCa cell line (RenCares) resulted in complete suppression of tumor growth without any notable toxicity. Given that FK506 protein family member FKBP38 protein activates Bcl-2 and Bcl-XL through protein-protein interaction, molecular mechanism of action for the combination therapy was investigated by considering FKBP38 at the centre stage. Co-immunoprecipitation (co-IP), WST-1 and Western Blot experiments suggested that the FKBP38 protein plays a role in Everolimus resistance.

Keywords: Mammalian target of rapamycin (mTOR), Bcl-2, Renal Cell Carcinoma (RCC), FKBP38

1. GİRİŞ

Türkiye’de Halk Sağlığı Kurumu, Kansere Daire Başkanlığı’nın 2009 verilerine göre ölümlerin %20,7’si kansere bağlıdır. Erkeklerde görülen kanserlerin %5,1’ini de böbrek kanseri oluşturmaktadır. Avrupa Birliği ülkelerinde böbrek kanseri görülme sıklığı erkeklerde 100.000’de 15,8 kadınlarda 100.000’de 7,1 olarak hesaplanmaktadır. Aynı veriler mortalite hızının erkeklerde 100.000’de 6,5 kadınlarda 100.000’de 2,7 olduğunu göstermektedir (Ferlay vd. 2008). Yetişkinlerde böbreklerde en yaygın görülen kanser Böbrek hücreli karsinom (BHK)’dur. BHK’nın radyoterapiye ve kemoterapiye dirençli olması nedeni ile metastatik BHK’de 5-yıllık sağkalım %10’un altındadır (Yamamoto vd. 2014). Günümüzde metastatik BHK’de lisans almış 7 ilaç bulunmaktadır. Bunlar Bevacizumab (anti-endotelin büyüme faktörü monoklonal antikoru, interferon ile kombine olarak kullanılır), tirozin kinaz inhibitörleri olan Sunitinib, Pazopanib, Axitinib, Sorafenib ve mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitörleri olan Everolimus ve Temsirolimustur (Calvo vd. 2014). Faz III klinik çalışmada Everolimus placebo ile karşılaştırıldığında progresyonsuz sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı şekilde uzattığı (4,9 ay vs 1,87 ay) saptanmıştır. Buna karşın genel sağkalım avantajı saptanmamıştır. Metastatik BHK’de bahsi geçen 7 ilaç tedavisine rağmen tüm hastalarda bu ilaçlara direnç gelişmektedir. Şu ana kadar Everolimus ile yapılan klinik çalışmalarda birinci sonlanım noktası olarak progresyonsuz sağkalım ele alınmıştır ve progresyonsuz sağkalım 1,1 ay ile 8,3 ay arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Calvo vd. 2014). Metastatik BHK’de istatistiksel olarak genel sağkalımda fark oluşturacak ve hayat kurtarıcı bir ilaç henüz bulunmamaktadır. Literatürde BHK’da görülen kemoterapi ilaç direnci anti-apoptotik protein Bcl-2 anlatımının yüksek olması ile ilişkilendirilmesine (Maruyama vd. 2006) rağmen Bcl-2 inhibitörleri ile kombine ilaç denemelerinin Everolimus direnci üzerindeki etkisi incelenmemiştir. Promeizde BHK tedavisinde bu açığı kapayarak Everolimus ilaç direnci geliştiren BHK tümörlerinde Bcl-2 anti-apoptotik inhibitörü ABT-737 ile kombine tedavinin BHK tedavisinde başarısı test edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Böbrek hücreli karsinoma (BHK) yetişkinlerdeki malignant tümörlerin %2-3’ünü oluşturmaktadır. Her yıl 200.000 kişi böbrek kanserine yakalanırken 102.000 kişi ise hayatını kaybetmektedir (Gupta vd. 2008). Böbrek hücreli karsinoma böbrekte en sık rastlanan (%85) malignant tümörlerdendir (Ljungberg vd. 2010). Yapılan çalışmalarda VHL (Von Hippel-Lindau) genindeki mutasyon, delesyon ve gen sessizleşmesinin böbrek hücreli karsinomanın %90’ına neden olduğu belirlenmiştir (Kaelin 2009). VHL gen ürünündeki azalma HIF (hipoksi-indüklenir faktör) anlatımında artışa neden olmaktadır (Semenza vd. 2009, Hickey ve Simon

2006). HIF tarafından indüklenen VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü) ve diğer büyüme faktörleri yalnızca tümör anjiyogenezini desteklemekle kalmaz aynı zamanda sentezlendikleri hücrelerde otokrin olarak tirozin kinaz sinyal yolağını harekete geçirerek PI3K (fosfotidilinositol-3-kinaz)-AKT-mTOR (memelilerin rapamisin hedefi) kinaz yolağını aktive eder (Laptante vd. 2012). mTOR; hücre büyümesini, hücrenin çoğalmasını regüle eden kanserde anahtar rol oynayan bir serin/treonin kinazdır (Corradetti vd. 2006, Faivre vd. 2006). Klinik çalışmalarda bu sinyal yolağının hedef alınarak baskılanması için Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib gibi VEGF reseptör kinaz blokörleri ile Temsirolimus, Everolimus, Deferolimus gibi rapamisin analoglarının kullanımı yoluna gidilmiştir (Banumathy vd. 2010). Ancak bu ilaçlarla yapılan kemoterapötik tedaviler ileri yada metastatik BHK sahip hastaların ömürlerini sadece uzatabilmekte hastalığı tamamen eradike edememektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ileri BHK'da görülen kemoterapötik ilaç direnci anti-apoptotik protein Bcl-2 anlatımının yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (Maruyama vd. 2006). Günümüzde prelinik ve faz çalışmalarında kullanılmakta olan Bcl-2 inhibitörleri bulunmakla beraber bu inhibitörlerin henüz BHK tedavisinde denemesi yapılmamıştır. Bu bağlamda proje kapsamında; Bcl-2 inhibitör bileşikleriyle Bcl-2 proteinini ve Everolimus ile mTOR yolağını birlikte inhibe ederek metastatik böbrek kanserine karşı etkin bir tedavi yöntemi geliştirmek amaçlanmıştır. Elde edilecek bilgiler, kombine ilaç denemelerinin BHK hücre hatları ve geliştirilen BHK hayvan modeli üzerindeki etkisini ilk defa gösterecek olup, BHK tedavisinde alternatif tedavi yöntemi geliştirilmesi için gerekli prelinik çalışmayı tamamlayıcı nitelikte olacaktır.

BHK erkeklerde en çok görülen 7. kanser ve kadınlarda ise en çok görülen 9. kanser olarak belirlenmiştir (Gupta vd. 2008). Avrupa Birliği ülkelerinde böbrek kanseri mortalite hızının erkeklerde 100.000'de 6,5 kadınlarda 100.000'de 2,7 olduğunu göstermektedir (Ferlay vd. 2008). Yetişkinlerde böbreklerde en yaygın görülen kanser BHK'dir. Radyoterapiye ve kemoterapiye dirençli olması nedeni ile metastatik BHK'de 5-yıllık sağkalım %10'un altındadır. BHK tedavisi için geliştirilen moleküler yolak hedefli kemoterapötik ilaçlar bulunmasına karşın metastatik BHK'de istatistiksel olarak genel sağkalımda fark oluşturacak ve yan etkileri az olan ilaç henüz bulunmamaktadır (Calvo vd. 2014). Günümüzde metastatik BHK'de lisans almış 7 ilaç bulunmaktadır. Bunlar Bevacizumab (anti-endotelin büyüme faktörü monoklonal antikoru, interferon ile kombine olarak kullanılır), tirozin kinaz inhibitörleri olan Sunitinib, Pazopanib, Axitinib, Sorafenib ve mTOR inhibitörleri olan Everolimus, Temsirolimustur (Calvo vd. 2014). BHK tümörlerinin %90'ında VHL geninde mutasyon bulunması bu tümörlerin hipoksik ortam koşullarını taklit ederek yoğun damarlaşma, hızlı büyüme ve yüksek invaziv potansiyel göstermesine sebebiyet vermektedir. VHL Elongin B-C ve Cullin ile übikitin ligaz kompleksi oluşturarak oksijen varlığında prolil hidroksilaz tarafından hidroksillenen HIF- α transkripsiyon faktörlerinin übikitinlenerek proteazomlarda parçalanmasından sorumludur. Hipoksik şartlarda

aktivitesini kayıp eden prolil hidroksilaz enzimi sayesinde hidroksilasyona uğramayan HIF- α , VHL übikitinlenmesine uğramaz ve çekirdeğe girerek HIF- β proteiniyle heterodimerini oluşturarak aralarında VEGF, PDGF (trombosit kökenli büyüme faktörü) ve EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptör) gibi anjiyogenez ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan 200 kadar genin aktivasyonunda yer alır. BHK'da VHL geninde görülen mutasyon üretilen proteinin yapısını bozarak HIF proteinin modifikasyonunu önlemekte ve artışına sebep olmaktadır (Semenza vd. 2000; Hickey ve Simon 2006). HIF protein ifadesinin artması ile aktive olan VEGF, PDGF ve EGF büyüme faktörü sinyal yolları PI3K-AKT-mTOR yolağını harekete geçirir (Laplane vd. 2012). Buna tekabül mTOR yollarının aktif olması HIF transkripsiyon faktörlerinin üzerinde geri bildirim yolağını harekete geçirerek PI3K-AKT-mTOR sinyal iletimi sonrası bu transkripsiyon faktörlerinin ifadelerinde artışa neden olur (Banumathy ve Cairns 2010). mTOR yolağı PI3K-AKT-mTOR ayağında bulunan, hücre büyüme faktörleri tarafından indüklenen ve hücre büyümesi, çoğalması, migrasyonu, yaşaması ve anjiyogenez gibi hücre için önem arz eden olayların merkezinde yer alan bir hücre-içi sinyal yolağıdır (Gnarra vd. 1994, Sato vd. 2008). mTOR, hücre büyümesini ve çoğalmasını regüle eden ve ayrıca kanserde de anahtar rol oynayan bir serin/treonin kinazdır (Corradetti vd. 2006, Mamane vd. 2006, Faivre vd. 2006). mTOR serin/ treonin kinazı iki tane ayrı kompleks olan ve mTORC1 ve mTORC2 olarak adlandırılan komplekslerin kalatizator görevini görmektedir. mTORC1 kompleksi mTOR serin/ treonin kinazı, raptor, pras40, mLST8, deptor ve Tti1/Tel2 proteinlerinden oluşurken mTORC2 ise mTOR serin/ treonin kinazı, rictor, mSin1, protor1/2, deptor, deptor ve Tti1/Tel2 proteinlerinin oluşturduğu bir komplekstir (Laplane vd. 2012). mTORC1 kompleksinin aktivasyonu için GTP yüklü Rheb GTPazının mTORC1 kompleksine bağlanarak mTOR kinaz aktivitesini uyarması gerekir (Şekil 1). GTPaz-aktive edici protein kompleksi TSC1/2 (tüberöz sklerosis 1/2 kompleksi) Rheb üzerindeki GTP'yi GDP'ye çevirerek mTORC1 inaktivasyonunda yer alır (Inoki vd. 2003, Tee vd. 2003). mTORC2 aktivasyonu ile ilgili literatürde daha az açıklama olmasına karşın mTORC2'nin de mTORC1 gibi büyüme faktörlerinin aktive ettiği PI3K yolağı altında aktive edildiği gösterilmiştir (Figlin vd. 2013). Bu nedenle mTOR'un uyarılma prensibini anlamak için öncelikle mTOR'un regülasyonunda görev alan PI3K/AKT yolağını anlamak gerekir. Büyüme hormonlarının indüklemesi sonucu PI3K hücre zarında bulunan PIP2'yi (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat) PIP3'e (tidilinositol 3,4,5-tirifosfat) çevirir. PIP3 oluşumu PDK1 (fosfatidilinositol bağımlı kinaz 1) ve AKT kinazlarının sahip olduğu ve plektirin homologu olan PH bölgesinin bağlanması için bir alan oluşturur ve her iki kinazda hücre çeperindeki yerini alır. Aktif hale gelmiş olan PDK1 kinazı AKT kinazını treonin 308'de fosforlayarak onun aktif hale gelmesini sağlar. T308'de aktive olan AKT kinazı TSC1/2'yi fosfatlayarak inhibe eder ve böylelikle mTORC1'in GTP yüklü Rheb tarafından aktive olmasına sebebiyet verir (Inoki vd. 2003). mTORC1 aktivasyonu sonucu mTOR

kinazının serin 2448'de otofosforilasyonu gerçekleşir (Ma vd. 2010). mTORC2 aktivasyonu için PI3K yolağının aktivasyonu ile Rictor ve SIN1'in mTORC2 ile etkileşime girerek mTORC2 kompleksi oluşumuna katılımlarının gerekli olduğu ve GTP-Rac1'in plazma membranına mTORC2 kompleksini yönelttiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Saci vd. 2011, Oh vd. 2011). Aktif mTORC1 ökaryotik translasyon inşatör faktör 4E (eIF4E)'ye bağlanan protein-1 (4E-BP1)'nin 4 amino asit bölgesinde (T36, T45, T70, S65) fosfatlanmasına neden olarak bu proteinin eIF4E üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırır. mTORC1 kompleksinin protein sentenizi uyarıcı bir diğer etkisi de p70 ribosomal S6 kinase 1 (S6K1)'i T389'da fosfatlayarak aktive etmesine dayanır (Ma vd. 2010). mTORC1 hücre büyümesini sterol regülatörüne bağlanan protein 1/2 (SREBP1/2) transkripsiyon faktörü aktivasyonu sonucu lipogenez ve pentoz fosfat yolağını çalıştırarak da indükler (Li vd. 2010). Ayrıca mTORC1 otofajiyi indükleyici kinaz kompleksi "ULK1/Atg13/FIP200"yi fosfatlayarak otofajiyi süprese eder ve böylelikle hücre büyümesini destekler (Ganley vd. 2009). mTORC1 kompleksinin regülasyonu geri bildirim yolları ile mTORC1'in kendi aktivitesini inhibe etmesi ile gerçekleşir. mTORC1 öncelikle glikojen sentez kinazı (GSK3)'ü aktive ederek adaptör protein Grb10'un aktive olmasını sağlar. Aktive olan Grb10 ise kinaz inhibitörü olarak davranır ve PI3K-AKT sinyalini durdurur (Hsu vd. 2011, Yu vd. 2011). İkinci mekanizmada ise mTORC1 tarafından aktive olan S6K1 kinazı insülin reseptörü substratı 1(IRS1)'i fosfatlayarak degradasyonuna neden olur ki böylelikle insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) reseptöründen kaynaklanan PI3K-AKT sinyali durur (Harrington vd. 2004). En son olarak da mTORC1 indüklü S6K1 kinazı mTORC2 represör proteini Rictor'u fosfatlayarak (T1135) Rictor'un mTORC2 yolağı üzerindeki inhibitör etkisini artırır ve böylelikle mTORC2 indüklü AKT kinaz aktivasyonunu inhibe eder (Dibble vd. 2009, Julien vd. 2010). mTORC2 yolağı hücre sağkalım/metabolizma ve sitoskeleti organizasyonunu AGC kinazları AKT, SGK1 ve PKC α aktivasyonunu kontrol ederek gerçekleştirir (Oh vd. 2011). mTORC2 aktivasyonu sonrası kompleksde bulunan mTOR kinazı S2481'de otofosforilize olur ve AKT kinazı S473'de fosfatlayarak aktive eder (Copp vd. 2009). S473'de fosfatlanan AKT maksimal aktivasyona ulaşarak apoptozu teşvik eden prokaspaz-9, BAD ve ASK1 (apoptoz sinyali regülasyon kinazı 1) gibi pro-apoptotik proteinlerin fosfatlanarak inhibe olmasını sağlar ve böylelikle sağkalım yolağını harekete geçirir. mTORC2 tarafından aktive edilen AKT (S473) ve SGK1 (S422) kinazlarının sağkalım yolağını indüklemelerinin bir diğer yolu da hücre döngüsünü durduran ve apoptozu indükleyen genlerin ifadesinden sorumlu FoxO transkripsiyon faktörünü fosfatlayarak etkisiz hale getirmesidir (Guertin vd. 2006, Garcia-Martinez vd. 2006). Sitoskelet regülasyonunda ise PKC α ve Rac GTPazların mTORC2 tarafından aktive edilmesinin aktin dinamiğini artırarak hücre migrasyon potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir (Oh vd. 2011, Laplante vd. 2012).

mTOR yollarının hücre sağkalım/büyüme ve protein sentezinin uyarımındaki önemli görevleri gözönüne alınarak mTOR yolağına bağımlı BHK, over ve kemik kanseri tedavilerinde rapamisin veya Everolimus, Temsirolimus gibi diğer rapamisin analogları (rapalog), mTOR yolağına inhibisyonunda kemoteröpatik ilaçlar olarak kullanılmaktadırlar. Rapaloglar 12 kilodaltonluk FK506'ya bağlanan protein FKBP12'ye bağlanarak sadece mTORC1 kompleksi içerisindeki mTOR kinazını inhibe eder (Brown vd. 1994). Bu ilaçlara karşı tümörlerin direnç kazanmasında mTORC2 yolağına aktif kalması sebep olarak gösterilse de sonraki çalışmalarda uzun süreli rapalog tedavisinin mTORC2 kompleksi ve bu komplekse bağımlı AKT sinyal yollarını inhibe edebildiği belirtilmiştir (Oh vd. 2011, Laplante vd. 2012). Bu durumda rapalog direnci gösteren tümörlerde mTORC1 tarafından inhibe edilen PI3K, MAPK ve IGKF kinaz geri bildirim yollarının rapalog uygulaması ile tekrar aktive olması ile açıklanabilir (Santoni vd. 2014, Şekil1). Bir diğer hipotez de rapalog direnci gösteren kanserlerde Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerinin aktive olması ile bu tümörlerin apoptoz ismi verilen programlı hücre ölümünü baskılayıp, sağkalım mekanizmalarını çalıştırması olarak öne sürülebilir.

İlk kez 1964 yılında tanımlanan programlı hücre ölümü (diğer adıyla apoptoz), çok hücreli organizmalarda normal gelişimin ve dokular arası dengenin sağlanmasında iş gören bir hücre içi sinyal yolağıdır (Israels vd. 1999, Danial vd. 2007, Chipuk, 2008). Doku ve organlarda fonksiyonel olmayan, eski hücreler ile yenilerinin oluşumu arasındaki denge için önemli olan hücre ölümü mekanizmasının kanser ile ilgili bağlantısının anlaşılması, kanser gelişimini önlemek için bu mekanizmanın kemoterapide kullanılan ilaçlar tarafından hedef alındığını göstermiştir (Bratton vd. 2001, Danial vd. 2004). Diğer hücre içi mekanizmaları gibi bir sinyal yolağı olan apoptoz, DNA hasarı, büyüme faktörlerinin eksikliği ve viral enfeksiyonlar aracılığıyla indüklenebilmektedir (Danial vd. 2007, Chipuk vd. 2008, Billen vd. 2008, Kinnally vd. 2007). İç etkenler tarafından indüklenen apoptoz kontrolünü Bcl-2 protein ailesi sağlarken, mekanizmanın esas amacı olan hücre ölümünü hücre içi sistin proteazları olarak bilinen kaspaz proteinleri gerçekleştirir (Takeda vd. 2011). Kaspazlar pro-enzim olarak salgılanmakla beraber bir araya geldiklerinde kendilerini sistin amino asitlerinden parçalayarak aktive edebilirler (Fan vd. 2005). Bcl-2 proteini ilk olarak 14. ve 18. kromozomlar arasındaki karşılıklı translokasyon sonucu oluşan B hücreli foliküler lenfomada (BCL) üretimi artan 2. protein olarak tanımlanmış ve isimlendirilmiştir (Tsujiimoto vd. 1984). Bugüne kadar tanımlı yaklaşık 20 tane Bcl-2 üyesi bulunur ve (Oltvai vd. 1993) bu üyelerden anti-apoptotik proteinler olarak olarak adlandırılanlar apoptozun başlamasını engellerken, pro-apoptotik olarak adlandırılanlar ise apoptozu teşvik etmektedirler. Böylelikle Bcl-2 protein ailesi üyeleri arasındaki denge; mitokondrinin sağlamlığını ve geçirgenliğini belirleyerek apoptotik yolağın başlangıcına neden olan proteinlerin mitokondriden salınmasını engellemektedir (Korsmeyer vd. 1993, Oltvai vd.

1993). Bcl-2 protein ailesinden apoptozu engelleyici özellik gösteren anti-apoptotik üyeleri “Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1” 4 tane BH (Bcl-2 homolog bölgesi) protein bölgesine sahiptirler (Takeda vd. 2011). Bu aileden apoptozu teşvik eden pro-apoptotik üyeler sahip oldukları BH protein bölgesine göre kendi aralarında 2 gruba ayrılırlar. Birden fazla BH protein bölgesine sahip olan pro-apoptotik proteinler Bax, Bak, Bok’dan oluşur ve bu proteinler bir araya gelerek mitokondri çeperinde kanal oluşturarak apoptozun başlamasına neden olurlar. Bu durumda Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerinin başlıca görevi Bax/Bak proteinleri ile etkileşime girerek onların oligomerize olup kanal kurmasını engellemektir (Cory vd. 2002). Tek bir BH3 kısmına sahip olanlar Bcl-2 pro-apoptotik proteinleri “Bad, Bid, Bik/Nbk, Bim, Noxa ve Puma”dan oluşmaktadırlar (Chittenden vd. 1995, Kelekar vd. 1998, Letai vd. 2002, O’Connor vd. 2000). Bad, Bik, Noxa, Puma proteinleri anti-apoptotik Bcl-2 protein üyelerine bağlanarak onların Bax/Bak ile kompleks kurmalarına engel olurlar (Ghiotto vd. 2010, Bouillet vd. 2002). Bid/ Bim proteinleri ise Bax/Bak efektör proteinlerine bağlanarak onların aktive olup mitokondri üzerinde kanal kurmalarını mümkün kılarlar (Strasser vd. 2000, Billen vd. 2008). Hücreden gelen apoptotic sinyale cevaben Bad ve Bik proteinleri ifadelerinde gerçekleşen artış ile Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerine bağlanarak onları bloke ederler. Bid/Bim ise efektör Bax/Bak protein kompleksine bağlanarak onları mitokondri çeperinde konuşlandırarak aktif hale getirirler (Cory vd. 2002, Letai vd. 2002). Bax/Bak protein kompleksinin aktif hale gelerek mitokondri çeperinde kanal oluşturması elektron transport zinciri üyesi sitokrom c proteinin sitoplazmaya salınımına yol açar (Westphal vd. 2011). Hücre ölümü esnasında salgılanan sitokrom c diğer hücre ölümü proteinlerinden olan APAF1 (Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör 1) ve prokaspaz-9 ile “apoptozom” ismi verilen bir kompleks kurarak pro-kaspaz 9’un aktive olmasını sağlar. Aktif kaspaz-9 cellat kaspazlarını (pro-kaspaz-3, -6, 7) aktive eder ve apoptozun hücre cevabı olan sitoskeletin parçalanması, DNA’nın Dnase enzimi tarafından kırılması, çekirdek içi lamin proteinlerinin parçalanması gibi olayların gerçekleşmesini sağlarlar (Corrano vd. 2003, Bratton vd. 2010).

İleri evre BHK tedavisinde Everolimus’un 2009’da FDA tarafından VEGF terapi başarısızlığı sonrası onay alarak Faz III klinik çalışmalarında sağkalımı sadece 4.9 ay uzattığı tespit edilmiştir (Motzer vd. 2008). Yapılan in-vitro deneylerde de rapalog muamelesinin Caki-1, KTC-26 ve A-498 BHK hücre hatlarında %33-%57 oranında hücre büyümesini azalttığı ancak hücre ölümüne sebebiyet vermediği gözlemlenmiştir (Juengel vd. 2009). Literatürde yapılan pek çok çalışmada kanser hücrelerinde anti-apoptotik Bcl-2 proteininin ifade düzeyinde artış olduğu ve bu artışın kemoterapi ve radyoterapide direnç gelişmesine sebebiyet verdiği gösterilmiştir (Cory vd. 2005, Bajwa vd. 2012, Adams vd. 2007). Anti-apoptotik Bcl-2 proteininin ifadesindeki artışın apoptoz direncine sebep olduğu göz önüne alınarak bu proteinlerin etkisini bloke etmek için TW-37, obatoclast, ABT-737 gibi ilaçlar geliştirilmiştir. Bu

ilaçların amacı Bcl-2 proteinlerinin BH3 bölgesine bağlanarak onların pro-apoptotik proteinlerle etkileşime girmesini önlemektir (Azmi vd. 2009, Labi vd. 2008). Başka bir deyişle, anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üyelerinin sahip oldukları BH3 bölgesinin oluşturduğu hidrofobik oyuğa bağlanan bu inhibitör ilaçlar pro-apoptotik proteinlerin Bcl-2 anti-apoptotik proteinlerine bağlanarak inaktif olmasına mani olurlar (Muchmore vd. 1996, Cory vd. 2002). ABT-737, Abbott Laboratuvarları tarafından geliştirilmiş olan bir Bcl-2 inhibitörüdür ve anti-apoptotik proteinlerden Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'nin BH3 bölgesine bağlanarak pro-apoptotik proteinlerin bu bölgeye bağlanmasını önler (Konopleva vd. 2006, Pellecchia vd. 2004, Vogler vd. 2009). Anti-apoptotik Bcl-2 proteinin ifadesindeki artışın BHK da gözlemlenmiş olması ve bu hücrelerin kemoterapi tedavisine karşı direnç kazanması (Tomita vd. 1996, Zheng vd. 2011) literatürde çeşitli çalışmalarda kullanılan ABT-737'in bu hücreler üzerinde de denenebileceğini önermiştir. Hipotezimizi destekleyici bir çalışmada RCC-21, RCC-26A, RCC-30, Caki-2 gibi BHK hücre hatlarında ABT-737 ile Taksol grubu ilaç kombinasyonunun bu hücrelerin Taksol-indüklü apoptoza karşı direncini düşürdüğü gösterilmiştir (Zall vd. 2010). ABT-737 prelinik deneylerde lenfoma, multipl miyelom, göğüs kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, skuamöz hücreli baş ve boyun kanseri ve çeşitli lösemi kanseri modellerinde denenmiş ve başarılı olmuştur (Zheng vd. 2011) ancak ABT-737'nin BHK tedavisi için kullanıldığı herhangi bir prelinik yada in-vitro bir çalışma bulunmamaktadır.

Literatürde FKBP38 proteini ile Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerinin etkileşiminin kemoresistant sağladığı yönünde çalışmalar olmasına karşın (Choi vd. 2011) rapalog-direnç mekanizmasında Bcl-2 ve Bcl-XL önemi henüz gösterilmemiştir ve önerilen projede bu bağlantı araştırılacaktır. FK506 protein ailesinin bir üyesi olan FKBP38 proteini FKBP12-rapamisin kompleksine benzer bir şekilde mTORC1 kompleksine bağlanarak mTORC1'in kinaz aktivitesini baskılar (Bai vd. 2007). Ancak ve Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerini çokça ifade eden hücrelerde FKBP38'in mTORC1 üzerindeki bu baskıcı etkisinin ortadan kalkması FKBP38'in aynı zamanda Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerine de rekabetçi bir şekilde bağlandığı ihtimalini doğurmuştur (Ma vd. 2010). Nitekim yapılan takipçi çalışmalarda mTORC1 ve Bcl-2/Bcl-XL proteinlerinin FKBP38 proteinine bağlanmak için rekabet ettikleri gösterilmiştir (Zou vd. 2013). FKBP38 mTORC1'in aktivitesini bloke ederken Bcl-2/Bcl-XL proteinlerinin mitokondriyel membranda koşullanmalarına yardımcı olur (Ma vd. 2010). Bcl-2/Bcl-XL proteinlerinin öncelikle FKBP38'e bağlanarak mitokondriye lokalize olduğu ve FKBP38 bağlı Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerinin daha sonrasında Rheb GTPaz tarafından serbest bırakılarak Bax ve Bak pro-apoptotik proteinlerine bağlandıkları gösterilmiştir (Ma vd. 2010). Hipotezimizi destekler şekilde Rheb GTPaz'ının Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerinin Bax/Bak pro-apoptotik proteinlerine bağlanmalarını etkinleştirmesinin rapamisin tarafından bloke edilmediği gösterilmiştir (Ma vd. 2010). **Bu durumda rapalog uygulaması mTORC1'in FK506**

bağlanarak FKBP38'i serbest bırakmasına neden olacak ve serbest kalan FKBP38 ise Bcl-2/Bcl-XL proteinlerini mitokondriye yönlendirerek apoptozun engellenmesini tetikleyecektir. Bu bilgilerin ışığında Everolimus ve diğer rapalog-direnci gösteren BHK tümörlerinin eradikasyonunda Everolimus ve ABT-737 kombine tedavisinin hayat kurtarıcı olması mümkündür. Projemiz bu noktalardan yola çıkarak Bcl-2 inhibitörü ABT-737 ve Everolimus'un böbrek hücreli karsinoma üzerindeki etkisini in-vitro düzeyde apoptoz ve hücre sağkalım mekanizması üzerindeki etkilerine bakarak açıklamayı hedef edinmiştir. *In vitro* sonuçlarımız ABT-737 ve Everolimus ilaç kombinasyonunun tümör baskılayıcı etkisinin in vivo deneylerle konfirme edilmesi ile preklinik platforma taşınmıştır. Literatürde ABT-737 ya da Everolimus-ABT-737 kombine ilaç denemeleri yapılan bir çalışma bulunmaması projemizi literatürde bu konuda araştırma yapan ilk proje konumuna koymuş ve ABT-737 ve Everolimus ilaç kombinasyonunun BHK tedavisinde kullanılması için patent başvurusu yapmamıza olanak vermiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürü

Projemiz bünyesinde kullanılan hücre modelleri olan A-498 ve Caki-2 primer böbrek kanseri hücre hatları, Caki-1 ve ACHN metastatik böbrek kanseri hücre hatları ile fare böbrek kanseri hücre hattı olan RenCa hücreleri American Type Culture Collection (ATCC, USA)'den ısmarlanmışlardır. Doku kültürü kaplarına ekilen A-498 ve ACHN hücreleri %10 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin, %1 MEM non essential amino asit içeren DMEM, Caki-1 ve Caki-2 hücreleri ise %10 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin, %1 MEM non essential amino asit içeren McCoy's, RenCa ve erRenCa hücreleri %10 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin, %1 MEM non essential amino asit içeren RPMI-1640 kültür ortamında 37°C derecede %5 CO₂'li nemlendirilmiş memeli hücre kültürü etüvünde büyütülmüşlerdir. Hücreler plastik yüzey alanının %80 ini doldurana kadar inkübe edilmiş ve %0.05 (hacim/hacim) 5 mM EDTA içeren tripsin enzimi solüsyonu ile pasajlanmıştır. Hücreler yaklaşık 300.000 hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde %10 (hacim/hacim) Dimetil Sülfoksit içeren fetal sığır serumu ile toplanarak kriyotüplere konulmuş ve sıvı nitrojende stoklanmıştır.

3.2 Antikor ve Materyaller

Everolimus ve ABT-737 ilaçları Selleck Chemicals firmasından; Aphidicolin Calbiochem firmasından; hücre çoğalma belirteci WST-1 ve Annexin V-Fluos boyama kiti Roche firmasından temin edilmiştir. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, PARP, kaspaz 9, parçalanmış kaspaz 3, Bcl-2-S70-P, Puma, Noxa, Bax, Bim, BAD, BAD-S136-P, CDK4, Siklin D1, Siklin D3, CDK2, Siklin E1, p27^{Kip1}, AKT, AKT-S473P, AKT-T308P, mTOR-S2448-P, mTOR-S2481-P, mTOR, Rictor, Rictor-T1135-P, p70S6K, p70S6K-T389-P, S6, S6-S240/244-P, S6-S235/236-P, 4E-BP1, 4E-BP1-T37/45-P, 4E-BP1-S65-P, 4E-BP1-T70-P ve and pan-Aktin antikorları Cell Signaling Technology firmasından satın alınmıştır. β-Aktin, Anti-tavşan IgG- Peroxidase, Anti-fare IgG- Peroxidase antikorları ile anti-tavşan ve anti-fare IgG'leri Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Western Emdirimi materyalleri olan Nitroselülöz membranı GE Healthcare, PVDF membranı BioRad firmasında ve ECL-HRP substratı Advansta firmasından satın alınmıştır. p53 antikor, Protein A veya G ile kaplı Sefaroz bilyeleri, kontrol shRNA lentiviral partikülleri ile FKBP38'i hedefleyen shRNA lentiviral partikülleri Santa Cruz firmasından temin edilmiştir. Western Emdirimi ve İmmün-çökeltme protokollerinde kullanılmak üzere FKBP38 proteini için NovaBiotek ve Abcam firmalarından antikorlar alınmıştır.

3.3 WST-1 Hücre Canlılığı Testi

A-498, Caki-1, RenCa ve erRenCa hücreleri 3.1'de belirtilen büyüme ortamlarında büyütüldükten sonra A-498 hücreleri kuyucuk başına 2.000 hücre olacak şekilde, Caki-1 hücreleri kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde ve RenCa hücreleri kuyucuk başına 5.000 olacak şekilde 96 kuyucuklu tabaklara ekilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresinden sonra hücreler farklı konsantrasyonlarındaki Everolimus veya ABT-737 ilaçları veya bu ilaçların kombinasyonları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmişlerdir. İnkübasyon sürelerini takiben hücreler, WST-1 (Cell Proliferation kit) hücre canlılık testine tabii tutulmuşlardır.

3.4 Hücre Döngüsünün Belirlenmesi

Hücre döngüsü (siklüsü) deneyleri için A-498 hücreleri %10 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin, %1 MEM non essential amino asit içeren DMEM kültür ortamında 37°C derecede %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda büyütüldükten sonra kuyucuk başına 500.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu tabaklara ekilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresinden sonra hücreler, 5µM Aphidicolin, 1µM Everolimus, 5µM ABT-737 veya Everolimus ve ABT-737 kombinasyonu ile 24 saat boyunca muamele edilmişlerdir. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreler tabaklardan toplanmış ve %70 etanol muamelesi yardımıyla geçirgenleştirilmişlerdir. Hücreler daha sonra 250 µl içerisinde 10µl propidiyum iyodit (1mg/ml) ile boyanmış ve akış sitometresinde hücre siklusları tespit edilmiştir. 24 saat Aphidicolin ile muamele görmüş hücreler G0/G1 fazlarını gösteren referans olarak kullanılmışlardır.

3.5 Annexin-V Hücre Ölümü Testi

A-498 hücreleri %10 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin, %1 MEM non essential amino asit içeren kültür ortamında 37°C derecede %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda büyütüldükten sonra kuyucuk başına 300.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu tabaklara ekilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresinden sonra hücreler, 1µM Everolimus, 5µM ABT-737 veya iki ilacın kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmişlerdir.

Caki-1 hücreleri %10 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin içeren kültür ortamında 37°C derecede %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda büyütüldükten sonra kuyucuk başına 350.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu tabaklara ekilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresinden sonra hücreler, 1µM Everolimus, 10µM ABT-737 veya iki ilacın kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmişlerdir.

İnkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerin büyüdüğü kültür ortamı ve tripsine edilmiş hücreler santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Çöktürülen hücreler sayılmış ve deney için 100.000 hücre

hazırlanmıştır. Hücre ölümü Annexin-V-propidiyum iyodit içeren kit yardımı ile akış sitometrisinde 30.000 hücre baz alınarak analiz edilmiştir.

3.6 Western Emdirimi

A-498, Caki-2, Caki-1, ACHN ve RenCa hücrelerindeki hücre döngüsü yolağında, mTOR yolağında, ve Bcl-2 güdümlü apoptotik hücre ölümü yolağında rol alan proteinlerin seviyeleri Western Emdirimi metodu ile tespit edilmiştir. Bu amaçla 4 saat serum deprivasyonuna tabii tutulan A-498, Caki-2 ve RenCa hücreleri kuyucuk başına 300.000 hücre olacak şekilde, Caki-1 ve ACHN hücreleri ise kuyucuk başına 350.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu tabaklara ekilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresinden sonra hücreler deney düzeneğine bağlı olarak 24 saat boyunca ilaç muamelesine tabi tutulmuşlardır. 24 saat inkübasyon süresini takiben hücrelerin üzerine 30µl RIPA buffer (1mM PMSF, 0.5% Non-idet, 0.1% SDS, 1mMNaF, 1mM Na3VO4 ve proteaz inhibitör kokteyli) eklenerek hücrelerin membranları parçalanarak hücre lizatları elde edilmiş ve protein miktarı Lowry yöntemi ile belirlenmiştir. Hücre homojenatında bulunan proteinler (50µg/kuyucuk) sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği ile yoğunluğu %6 ila %15 arasında değişen jellerde ayrıştırılmışlardır. Moleküler ağırlığı ufak olan proteinler ıslak transfer (wet-transfer) adı verilen yöntemle 250mA akımda 1 saat boyunca nitroselüloz veya PVDF membrana aktarılmışlardır. Moleküler ağırlığı büyük olan proteinler ise yarı kuru denilen (Semi-dry) transfer yöntemiyle 2,5A akımında 15 dakika boyunca PVDF membranına aktarılmışlardır. Transfer sonrasında membranlar 1 saat boyunca %5 süt tozu içeren Tris-Tween (100mM Tris-HCl, 0.9% (ağırlık/hacim) NaCl ve 0.05% (ağırlık/hacim), pH 7.4) solüsyonunda bekletilmiş ve 16 saat boyunca 4°C derecede uygun antikorlar (bkzn. 3.2) ile inkübe edilmişlerdir. Western Emdiriminde kullanılan antikorların konsantrasyonları satın alınan firmanın önerisine göre ya %5 süt tozu içeren Tris-Tween ya da %5 sığır serumu albümini içeren Tris-Tween solüsyonu hazırlanmışlardır. 16 saat inkübasyon süresini takiben membranlar üçer kez 5 dakika Tris-Tween solüsyonu ile yıkanmışlar ve %5 süt tozu içeren Tris-Tween solüsyonunda 1:5000 oranında seyreltilmiş olan HRP ile etiketlenmiş anti-fare veya anti-tavşan antikoruna oda sıcaklığında 2 saat boyunca işaretlenmişlerdir. 2 saat sonunda üçer kez 5 dakika Tris-Tween solüsyonu ile yıkanan membranlar ECL-HRP substrat solüsyonunda bekletildikten sonra ChemiDoc XRS+ (BioRad) cihazında fotoğraflanmışlardır.

3.7 İmmün çökeltme Metodu

6 kuyucuklu tabaklara ekilen A-498 hücreleri (300.000 hücre/ kuyucuk) 24 saat inkübasyon süresinden sonra 1µM Everolimus, 5µM ABT-737 veya iki ilacın kombinasyonu ile 24 saat boyunca muamele edilmişlerdir. 2 saat inkübasyondan sonra, hücrelerin tabaklardan immuno-çökeltme tampon çözeltisi içerisinde (%0,25 (a/h) sodyum deoksikolat, 150 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, %1 (h/h) proteaz önleyici koktey ve 50 mM Tri-HCl, pH 7.4) sıyrılarak patlatılmasıyla

protein lizatları elde edilmiştir. Protein konsantrasyonu Lowry yöntemiyle belirlenmiş ve immuno-çökeltme için 200 ile 300µg protein kullanılmıştır. Örnekler 1 saat boyunca 4°C'de spesifik olmayan Mouse antikoru (0,5µg/ml) ile inkübe edilmişler ve daha sonra 3 kez immuno-çökeltme solüsyonu ile yıkanmış çökeltme metodu için özel hazırlanmış protein A veya G ile kaplı Sefaroz bilyeleri ile 90 dakika boyunca 4°C'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında sefaroze bilyeler 600 x g'de 1 dakika süresince çöktürülmüş ve sıvı fazda kalan örnekler anti-FKBP38, anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL veya anti-mTOR antikolarıyla 90 dakika süresince 4°C'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda örnekler, 3 kez immuno-çökeltme solüsyonu ile yıkanan protein A veya G ile kaplı Sefaroz bilyeleri ile 2 saat 4°C'de inkübe edilmişlerdir. Immuno-çökeltme solüsyonu ile yıkandıktan sonra 600 x g'de 1 dakika boyunca çöktürülen sefaroze bilyeleri 30 µl 2x Laemmli solusyonunda çözölmüş ve 95°C'de 5 dakika kaynatıldıktan sonra yoğunluğu %6 ila %15 arasından değişen SDS-PAGE jeline yüklenerek yukarıda anlatıldığı üzere (bkz. 3.6) Western Emdirimi yöntemine tabi tutulmuşlardır.

3.8 shRNA Aktarımı

A-498 hücreleri kuyucuk başına 20.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu tabaklara ekilmişler ve kültür ortamda 24 saat büyütüldükten sonra %2 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin ve 8µg/ml polybren içeren kültür ortamında 12 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Hücreler daha sonra enfeksiyonun derecesi (MOI) 1 veya 2 olacak şekilde %2 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin içeren kültür ortamında hazırlanmış olan shFKBP38 içeren lentiviral partikülleri ile 24 saat boyunca enfekte edilmişlerdir. Enfeksiyon sonrasında hücreler 1xPBS ,ile yıkanmış ve %12 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin ve 2,5µg/ml puromisin içeren kültür ortamında 6 ila 9 gün boyunca seleksiyona tabi tutulmuşlardır. Puromisin seleksiyonu sonunda sağ kalarak çoğalan hücreler 6 kuyucuklu tabaklara alınarak büyütölmeye devam edilmişlerdir. Belirli bir yoğunluğa ulaşan hücreler %10 (hacim/hacim) Dimetil Sülfoksit içeren fetal sığır serumu ile toplanarak kriyotüplere konulmuş ve sıvı nitrojende stoklanmışlardır.

3.9 İlaç Dirençli RenCa Hücrelerinin Geliştirilmesi

Everolimus dirençli RenCa (erRenCa) hücrelerini geliştirmek amacı doğrultusunda, deney düzeneğinde RenCa hücreleri %10 (hacim/hacim) fetal sığır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin, %1 MEM non essential amino asit içeren RPMI-1640 kültür ortamında 37°C derecede %5 CO₂' li nemlendirilmiş ortamda büyütöldükten sonra kuyucuk başına 5.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu tabaklara ekilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresinden sonra hücreler 1µM Everolimus ile 72 saat boyunca 37°C derecede %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda inkübe edilmişlerdir. 72 saatin sonunda ölen hücreler 1 x PBS yardımı ile ortamdaki

uzaklaştırılmış ve kalan hücreler ikinci kez 10µM Everolimus ile 72 saat boyunca muamele edilmişlerdir. 10µM Everolimus'a direnç göstererek yaşamayı ve çoğalmayı başaran hücreler 96 kuyucuklu tabaklardan alınarak 6 kuyucuklu tabaklara aktararak çoğaltılmışlardır. Sonrasında T-75 doku kültürü kabına aktarılan hücreler 1µM Everolimus içeren büyüme ortamında 2 ay süresince kültüre edilerek Everolimus direnç mekanizmasının gelişmesi sağlanmıştır. Hücrelerin Everolimus'a karşı direnç geliştirip geliştirmediği WST-1 hücre canlılık testi ile tespit edilmiştir. Deney düzeneğinde RenCa hücreleri 1µM Everolimus içeren RPMI-1640 kültür ortamında 72 saat boyunca büyütüldükten sonra kuyucuk başına 5.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu tabaklara ekilmişler ve 24, 48 ve 72 saatlerinin sonunda WST-1 hücre canlılık testine (Bölüm 3.3) tabii tutulmuşlardır.

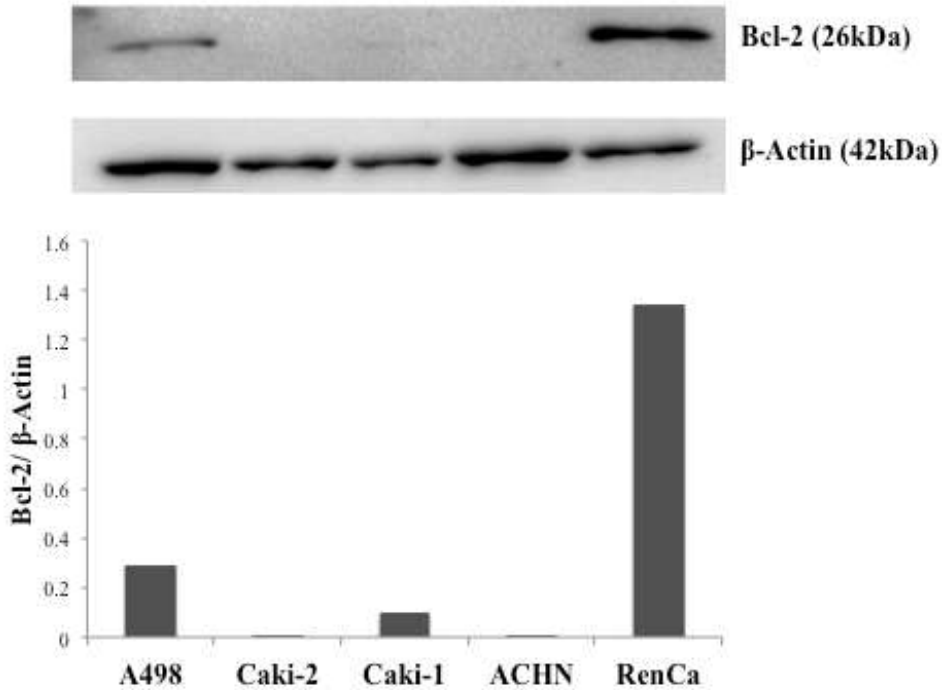
3.10 erRenCa Hücreleri ile Balb-c Farelerde Böbrek Kanseri Modeli Oluşturulması

Deney düzeneğinde erRenCa hücreleri %10 (hacim/hacim) fetal sıgır serumu, 100IU/ml penisilin, 100µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 kültür ortamında 37°C derecede %5 CO₂li nemlendirilmiş ortamda büyütülmüşlerdir. Hücre kültürü ortamında belirtilen şekilde büyütülen erRenCa hücreleri, hayvan başına 15x10⁶ hücre olacak şekilde, dört grubun her birinde bulunan 8 adet 6-10 haftalık erkek balb-c farelerinin sırt bölgesine subkütan olarak enjekte edilmişlerdir. erRenCa hücre enjeksiyonunu takip eden dördüncü günün sonunda, balb-c fareleri üzerinde yapılan öncül deneylerde belirlenmiş olan ve toksik olmayan miktarlardaki Everolimus (Yang vd. 2010) ve ABT-737 (Van Delft vd. 2008) ilaç uygulamalarına başlanmıştır. Bu bağlamda kontrol grubu olan birinci gruptaki balb-c farelerine ilaçların hazırlandığı DMSO, PBS içerisinde verilmektedir. İkinci gruptaki farelere miktarı 2mg/kg olacak şekilde PBS içerisinde hazırlanan Everolimus ilacı ve üçüncü gruptaki farelere miktarı 75mg/kg olacak şekilde su içerisinde hazırlanan ABT-737 ilacı verilmektedir. Dördüncü ve son gruptaki balb-c farelerine ise Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu uygulanmaktadır. Bahsi geçen ilaç uygulaması gün aşırı olmak üzere farelerin periton bölgesine enjekte edilmesiyle yapılmıştır. 11 enjeksiyonun sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek deney sonlandırılmıştır. Deney sonunda her bir gruptaki hayvandan timüs, kalp, mide, bağırsak, böbrek, dalak, testis, akciğer, karaciğer ve beyin alınarak patolojik incelemeye gönderilmişlerdir. Aynı şekilde tümör oluşumu gözlemlenmiş olan hayvanlardan tümör dokuları izole edilmiş ve patolojik incelemeye gönderilmişlerdir.

4. BULGULAR

4.1 Primer ve metastatik böbrek hücreli karsinoma (BHK) hücre hatlarında Bcl-2 ve Bcl-xL ifade tespiti

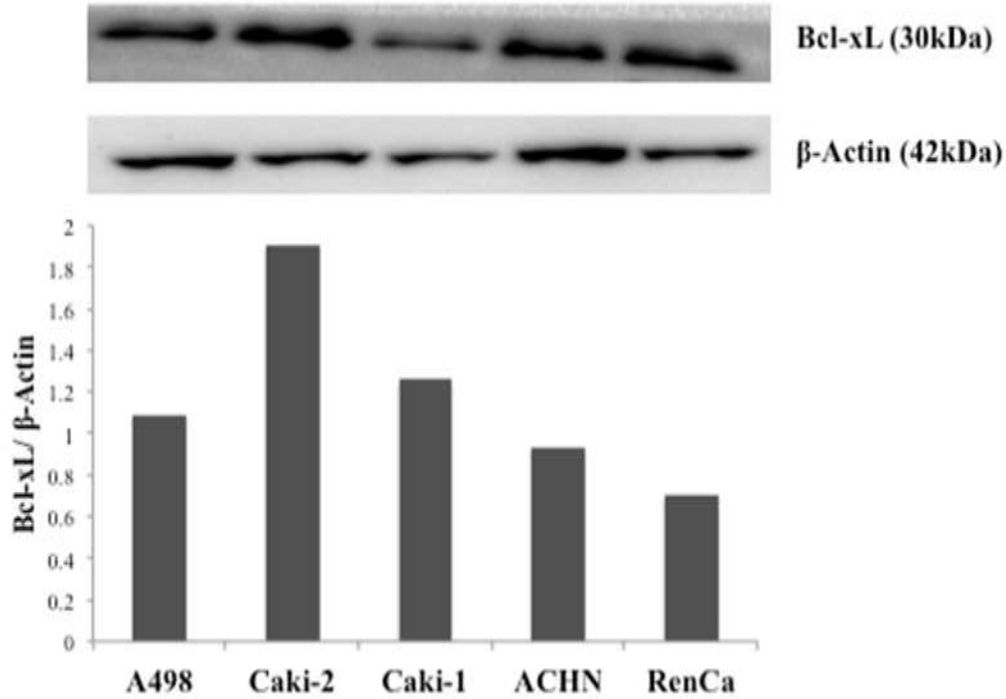
Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin başlıca görevi, çok hücreli organizmalarda normal gelişimin ve dokular arası dengenin sağlanmasında iş gören bir hücre içi sinyal yolağı olan programlı hücre ölümü diğer adıyla apoptozu bloklamaktır (Israels vd. 1999, Danial vd. 2007, Chipuk, 2008). Literatürde yapılan birçok çalışmada Bcl-2 ifade düzeyinin kanser hücrelerinde yüksek olduğu gözlenmiş olup (Villunger vd. 2003), böbrek hücreli karsinomada görülen kemoterapi ilaç direncinin de anti-apoptotik protein Bcl-2 anlatımının yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (Maruyama vd. 2006). Proje amacımız Everolimus direnci gösteren ve Bcl-2 proteinini yüksek ifade eden BHK hücre hatlarında Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun terapötik potansiyelini belirlemektir. Bu nedenle proje kapsamında kullanılacak model hücrelerin ABT-737'nin hedef aldığı Bcl-2 ve Bcl-xL proteinini normal şartlarda (apoptoz veya stres şartları yokluğunda) yüksekçe ifade etmesi gerekmektedir. Böylelikle primer A-498 ve Caki-2 ve metastatik Caki-1 ve ACHN BHK hücre hatları ile RenCa hücre hattında Bcl-2 ve Bcl-xL ifadesi karakterizasyonunun Western Emdirimi yöntemi ile yapılması projemizin ilk basamağını oluşturmuştur.



Şekil 1. Böbrek kanseri hücre hatlarında Bcl-2 ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespit edilmesi. Örneklerdeki Bcl-2 ifade seviyesini temsil eden protein bandı β -actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

Caki-2 ve ACHN hücrelerinde Bcl-2 ifadesi tespit edilmezken A-498, Caki-1 ve RenCa hücrelerinin Bcl-2 proteinini değişik miktarlarda ifade ettikleri yaptığımız Western Emdirimi deneyleri ile tespit edilmiştir (Şekil 1). Densitometrik analizler sonucu RenCa hücrelerinin A-498 hücrelerine oranla 7 kat daha fazla Bcl-2 içerdiği tespit edilirken, A-498 hücreleri Caki-1 hücrelerine oranla 2 kat daha fazla Bcl-2 ifadesi göstermektedirler.

Projemizde kullanılacak ABT-737 ilacı aynı zamanda Bcl-xL protein fonksiyonu üzerinde de baskılayıcı bir etki göstermekte olduğu için BHK hücre panelimizi oluşturan hücrelerde Bcl-xL ifade analizi Western Emdirimi yöntemi ile yapılmıştır. Şekil 2'den görülebileceği üzere tüm 5 BHK hücre hattı Bcl-xL proteinini değişik oranlarda ifade etmektedirler. β -Actin proteini ile normalize ettiğimiz densitometrik analiz sonucunda Caki-2 hücreleri en yüksek Bcl-xL ifadesine sahip olduğu ve Caki-1, A-498 ve ACHN hücrelerinde Bcl-xL ifadesinin benzer olduğu tespit edilirken en az Bcl-xL ifadesinin RenCa hücrelerinde olduğu gözlemlenmiştir.

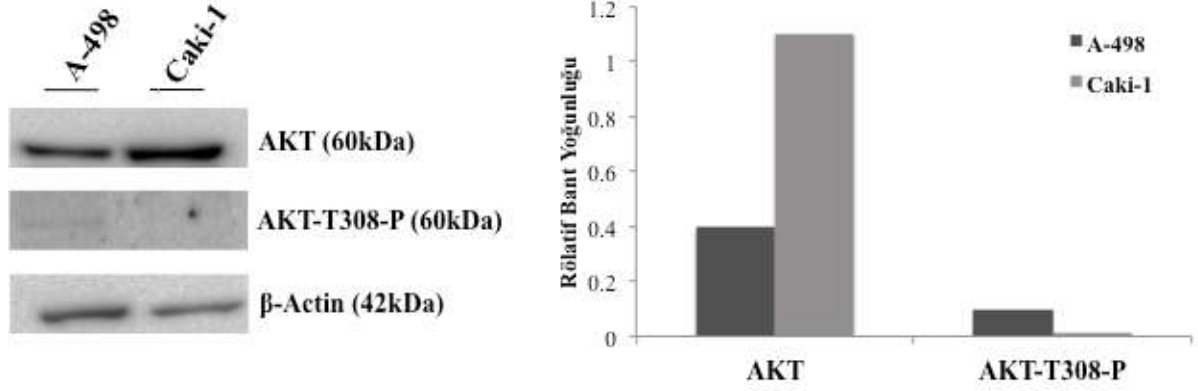


Şekil 2. Böbrek kanseri hücre hatlarında Bcl-xL ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespit edilmesi. Örneklerdeki Bcl-xL ifade seviyesini temsil eden protein bandı β -actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

Western Emdirimi deneylerimizin sonucunda, Everolimus ve ABT-737 kombinasyon muamelesi uygulanacak ve Bcl-2 ve Bcl-xL proteinini çokça ifade eden hücre modelleri olarak primer A-498 ve metastatik Caki-1 insan BHK hücre hatlarının seçilmesine karar verilmiş ve bundan sonraki deneylerimizde bu iki hücre hattı kullanılmıştır.

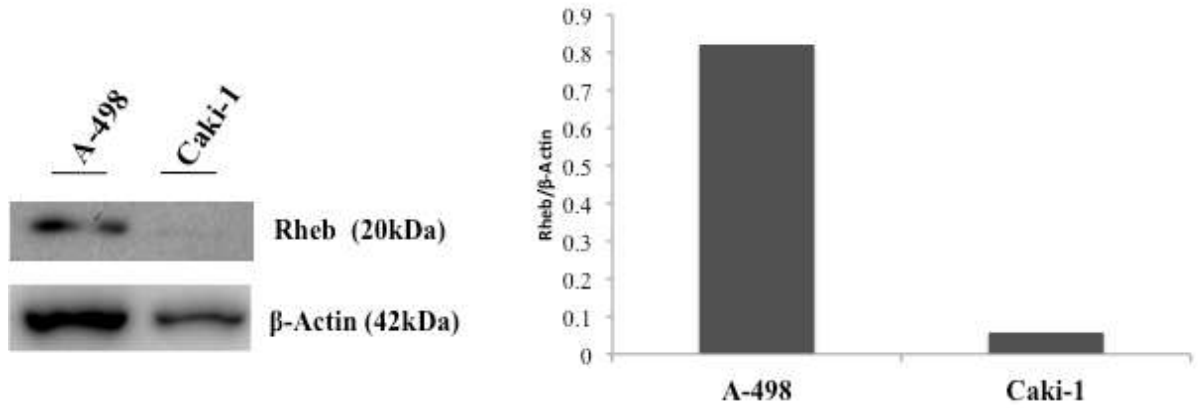
4.2 A-498 ve Caki-1 BHK'de mTOR aktivasyonu karakterizasyonu

BHK tedavisinde hücre sağkalım yolağı kontrolünde anahtar görev gören mTOR serin/treonin kinazının baskılanması hedef alınarak Temsirolimus, Everolimus ve Deferolimus gibi rapamisin analoglarının kullanımı yoluna gidilmiştir (Baunumathy vd. 2010). Ancak bu ilaçlarla yapılan kemoterapötik tedaviler ileri evre yada metastatik BHK'ya sahip hastaların ömürlerini sadece uzatabilmekte hastalığı tedavi ederek ölüm oranını azaltamamaktadırlar. Proje bünyesinde kullanılacak mTOR yolağı inhibitör ilacı Everolimus'un seçilen hücre hatları üzerindeki etkisini tespit etmeden önce bu hücrelerdeki mTOR aktivasyonu karakterizasyonu yapılması yoluna gidilmiştir. Bu amaç ile mTOR yolağında rol oynayan proteinlerin ifadeleri A-498 ve Caki-1 hücre hatlarında Western Emdirimi tekniğiyle tespit edilmişlerdir (Bölüm 3.6). Deney düzeneğinde hücre büyüklüğündeki farktan ötürü A-498 hücreleri yoğunluğu 300.000 olacak şekilde Caki-1 hücreleri ise yoğunluğu 350.000 olacak şekilde 6 kuyucuklu tabaklara ekilmişlerdir. 24 saat inkübasyon süresini takiben hücreler 20 saat boyunca serumdan yoksun kültür ortamında bekletildikten sonra serum içeren kültür ortamında 1 saat inkübe edilmişlerdir. Böylelikle mTOR yolağının aktivasyonu sağlanmıştır (Raught vd. 2000). mTOR yolağında bulunan mTORC1 kompleksinin karakterizasyonu için hücrelerden izole edilen proteinler AKT-T308P, mTOR-S2448P, 4E-BP1, ve 4E-BP1-S65P, 4E-BP1-T36/45-P, 4E-BP1-T70-P, p70S6K1, p70S6K1-T389-P, S6, S6-S235/236-P ve S6-S240/244-P'a özel antikorları ile analiz edilmişlerdir. mTORC2 kompleksinin karakterizasyonu için ise örnekler mTOR-S2481-P, Rictor, Rictor-T1135-P, AKT-S473-P'a özel antikorlarıyla analiz edilmişlerdir. Western Emdirimi deneylerinde β -actin protein miktar tayini yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. AKT kinazı PI3K/AKT/mTOR yolağında bulunur ve mTOR'un regülasyonunda rol oynar. Hücre büyüme faktörleri tarafından indüklenen ve hücre büyümesi, çoğalması, migrasyonu, yaşaması ve anjiyogenez gibi hücre için önem arz eden olayların merkezinde yer alan PI3K/AKT/mTOR yolağının (Gnarra vd. 1994, Sato vd. 2008), büyüme faktörleri tarafından indüklenmesi sonucunda treonin 308'de fosfatlanan AKT, aktive olarak Rheb proteini aracılığıyla mTORC1 kompleksinde yer alan mTOR kinazını aktif hale getirir. Buna bağlı olarak AKT kinazının treonin 308'de fosfatlanmış türevinin ifadesinde görülen artış, mTORC1 yolağının aktif olabileceğine işaret eder. A-498 ve Caki-1 BHK hücre hatlarında mTOR yolağı düzleminde AKT'nin aktive olup olmadığına AKT' nin treonin 308'de fosfatlanmış türevinin ifadesinin Western Emdirimi yöntemiyle ölçülmesiyle bakılmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde AKT aktivasyonunun Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki AKT ve AKT-T308-P ifade seviyesini temsil eden protein bandı β -actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

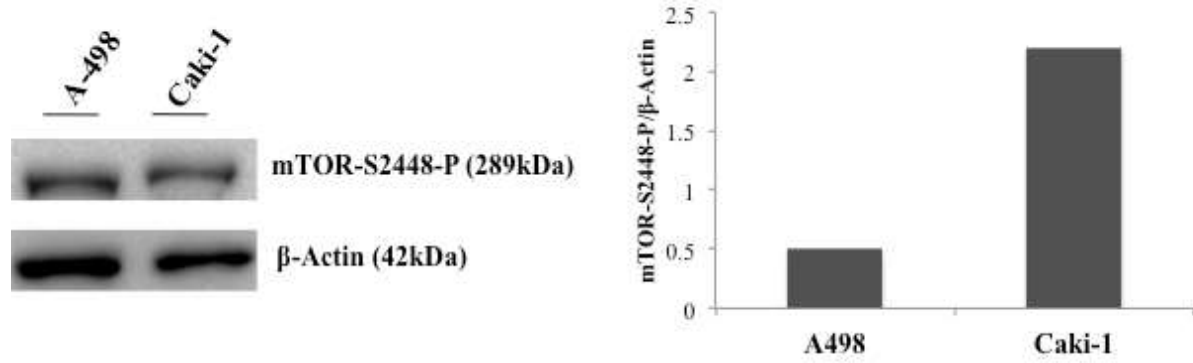
Şekli 3'de görüldüğü üzere Caki-1 hücreleri AKT proteinini A-498 hücrelerine kıyasla 3 kat daha fazla ifade etmişlerdir. AKT'nin T308'de fosfatlanmış türevi ise A-498 hücrelerinde çok düşük düzeyde ifade edilirken Caki-1 hücrelerinde deney düzeneğimize bağlı olarak AKT-T308-P formuna rastlanmamıştır. A-498 hücrelerinde ifade edilen AKT proteininin %25'i T308'de fosfatlanmıştır. Bu sonuçların ışığında uyguladığımız serum indüksiyonunun A-498 hücrelerinde AKT üzerinden mTOR yolağını düşüğe olsa aktive ederken Caki-1 hücreleri için 1 saatlik serum indüksiyonunun mTOR yolağı aktivasyonu için yeterli olmadığı ya da bu hücrelerde mTOR yolağının farklı bir şekilde aktive edilebileceği kanısına varılmıştır.



Şekil 4. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde Rheb protein ifadesinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki Rheb ifade seviyesini temsil eden protein bandı β -actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

mTOR yolağının sinyal iletimi sırası izlendiğinde T308'de fosfatlanan AKT'nin, aktive olarak Rheb proteini aracılığıyla mTORC1 kompleksinde yer alan mTOR kinazını aktif hale getirdiği

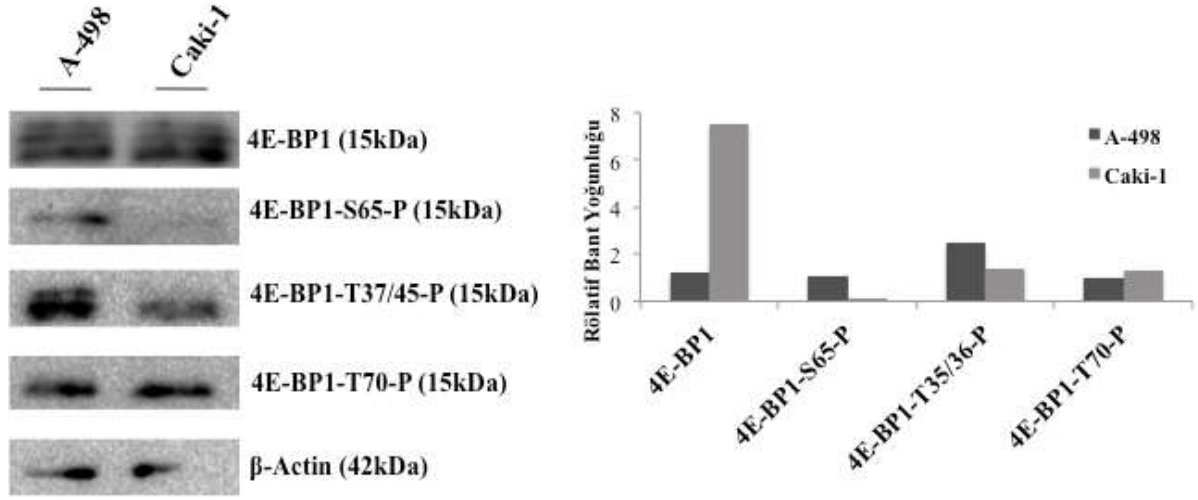
gözlemlenir. Bu nedenle takipçi yapılan deneylerde A-498 ve Caki-1 hücrelerinde Rheb protein ifadesi tayini yapılmıştır (Şekil 4). A-498 hücrelerinin Rheb proteinini Caki-1 hücrelerine oranla 8 kat daha fazla ifade ettiği Şekil 4'te gösterilmiştir. A-498 hücrelerinde Rheb ifadesinde görülen artışın, yine aynı hücrelerde AKT ifadesinde görülen artışla paralel gitmesi (Şekil 4), A-498 hücrelerinde mTORC1 kompleksinin aktif olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 5. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde mTOR'un S2448'de fosfatlanmış türevinin ifadesinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki mTOR-S2448-P ifade seviyesini temsil eden protein bandı β-actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

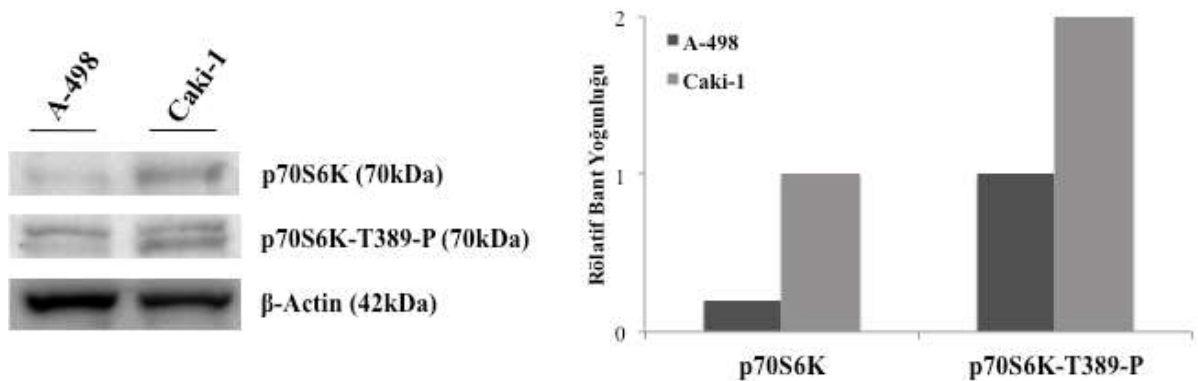
Rheb proteininin yardımıyla mTORC1 kompleksi bünyesinde serin 2448'de otofosforilasyonu gerçekleşen mTOR kinazının A-498 ve Caki-1 hücrelerindeki ifadeleri Şekil 5'de gösterilmiştir. Deney sonucumuzda mTOR'un S2448'de fosfatlanmış türevi Caki-1 hücrelerinde daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu sonuç deney düzeneğimizde uyguladığımız 1 saatlik serum indüksiyonunun Caki-1 hücrelerinde mTOR aktivasyonuna neden olduğunu doğrulamakla beraber Caki-1 hücrelerinde gerçekleşen mTOR-S2448 aktivasyonunun AKT ve Rheb üst baş (upstream) moleküllerinden bağımsız olarak geliştiği düşünülmektedir.

Aktif hale gelen mTOR kinazı, hedef proteini olan ökaryotik translasyon inşatör faktör 4E (eIF4E)'ye bağlanan protein-1 (4E-BP1)'i 4 amino asit bölgesinde (T36, T45, T70, S65) fosfatlar. 4E-BP1 proteininin T36, T45, T70, S65 bölgelerinde fosfatlanması bu proteinin eIF4E üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırır. Böylelikle eIF4E protein sentezini başlatır. Şekil 6'da 4E-BP1 ve onun S65, T37/45 ve T70'de fosfatlanmış türevlerinin A-498 ve Caki-1 BHK hücrelerindeki ifadeleri Western Emdirimi yöntemi ile gösterilmiştir. 4E-BP1 proteininin Caki-1 hücrelerinde A-498 hücrelerine kıyasla daha fazla ifade edildiği; ancak 4E-BP1 proteininin S65 ve T37/45'de fosfatlanmış türevlerinin A-498 hücrelerinde Caki-1 hücrelerine oranla daha fazla ifade edildiği gözlemlenmiştir.

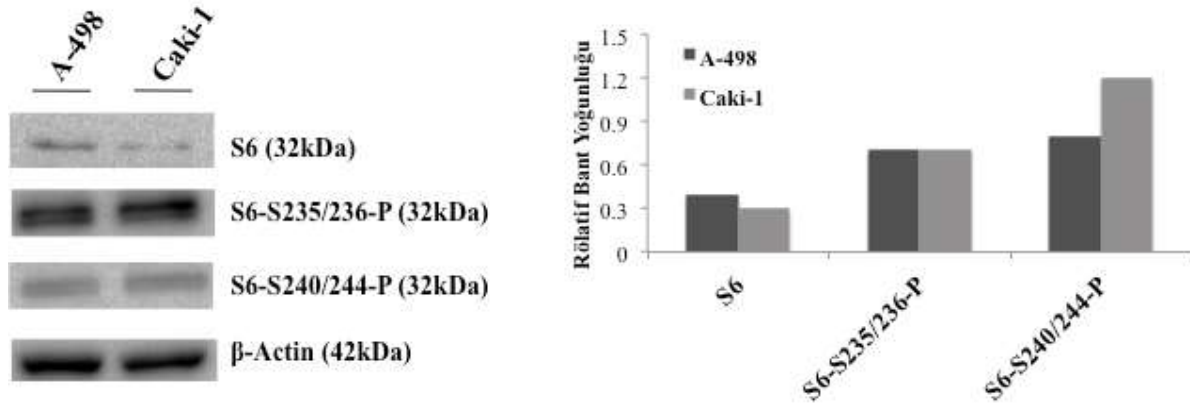


Şekil 6. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde 4E-BP1 ve fosfatlanmış türevlerinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki 4E-BP1, 4E-BP1-S65-P, 4E-BP1-T37/45-P VE 4E-BP1-T70-P ifade seviyesini temsil eden protein bandı β -actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

4E-BP1 proteini gibi p70S6K proteini de mTORC1 kompleksinin hedef proteinidir. mTORC1 kompleksinin protein sentezini uyarıcı bir diğer etkisi de p70 ribosomal S6 kinase 1 (S6K1)' i T389'da fosfatlayarak aktive etmesine dayanır (Ma vd. 2009). Şekil 7'de A-498 ve Caki-1 hücrelerindeki p70S6K ve onun T389'da fosfatlanmış türevinin ifadesi Western Emdirimi sonucu ile incelenmiş ve p70S6K ve onun T389'da fosfatlanmış türevi Caki-1 hücrelerinde A-498 hücrelerine oranla daha çok ifade edildiği tespit edilmiştir.



Şekil 7. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde p70S6K ve fosfatlanmış türevlerinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki p70S6K ve p70S6K-T389-P ifade seviyesini temsil eden protein bandı β -actin protein bandına göre normalize edilmiştir.



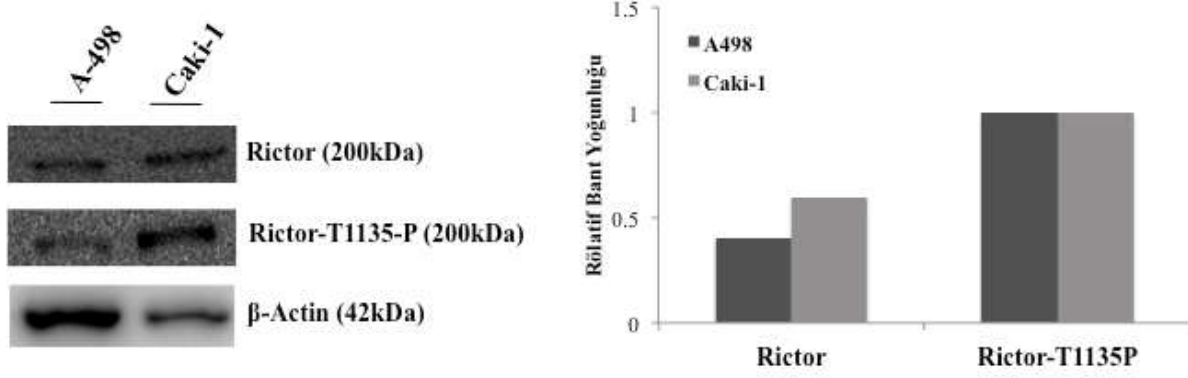
Şekil 8. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde S6 ve fosfatlanmış türevlerinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki S6, S6-S235/236-P ve S6-S240/244-P ifade seviyesini temsil eden protein bandı β -actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

p70S6K kinazının hedef proteini olan ribozomal S6 (S6) proteinin bu kinaz tarafından 235/236 ve S240/244 bölgesinde fosfatlanması protein translasyonunun başlamasını sağlar. Şekil 8'de S6 ve onun fosfatlanmış türevleri olan S235/236 ve S240/244 formlarının A-498 ve Caki-1 hücrelerindeki ifadeleri gösterilmiştir. A-498 hücrelerinin S6 proteinini Caki-1 hücrelerine göre daha az ifade ettiği, ancak S6 proteininin S235/236'da fosfatlanmış türevinin iki hücre hattında da aynı oranda ifade edildiği gözlemlenmiştir. S6 proteininin S240/244'de fosfatlanmış formu ise Caki-1 hücrelerinde A-498 hücrelerine oranla 2 kat daha fazla ifade edilmiştir.

Everolimus direnci gösteren hücrelerde mTORC2 yolağının aktive olduğu literatürde yapılan diğer deneyler ile gösterilmiştir (Santoni vd. 2014). Projemizin bundan sonraki kısmında yaptığımız deneyler ile A-498 ve Caki-1 hücrelerinde serum indüksiyonunun mTORC2 yolağının aktivasyonuna neden olup olmadığının saptanması hedeflenmiştir. mTORC1 kompleksi regülasyonunda birtakım geribildirim yolları rol oynamaktadır. Bu yollardan bir tanesi mTORC1 kompleksinin mTORC2 yolağını dolaylı olarak inaktive etmesidir. mTORC1 kompleksi içerisinde bulunan mTOR kinazı mTORC2 kompleksi inhibitörü Rictor proteinini treonin 1135'de fosfatlayarak aktive eder. T1135'de fosfatlanarak aktive olan Rictor, mTORC2 kompleksinde bulunan mTOR kinazı ile interaksyona girerek mTORC2 kompleksinin inaktive olmasına neden olur. Bu bağlamda Rictor-T1135-P proteini inaktive olmuş mTORC2 kompleksine işaret eder.

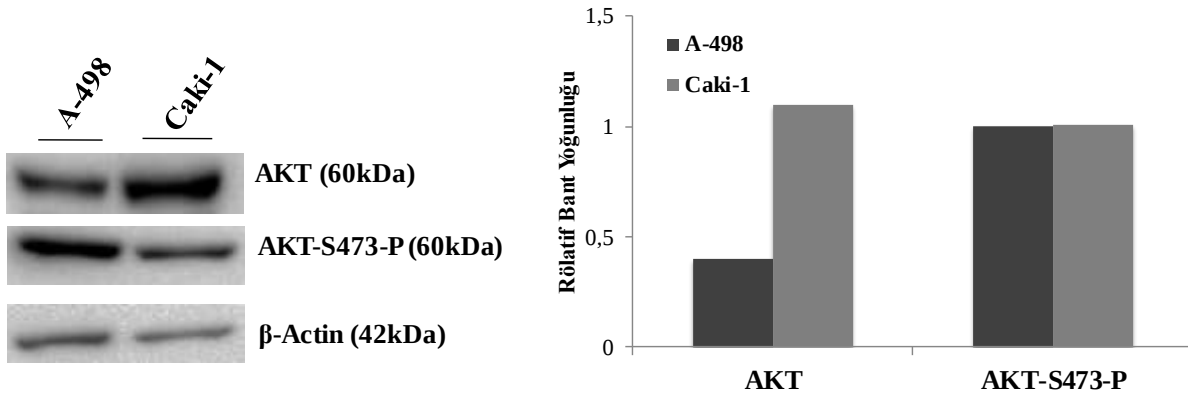
Şekil 9'da A-498 ve Caki-1 hücrelerinde Rictor ve Rictor'un T1135'de fosfatlanmış formunun ifadeleri gösterilmiştir. Rictor proteinin Caki-1 hücrelerinde A-498 hücrelerine kıyasla daha fazla ifade edilirken, Rictor'un T1135'de fosfatlanmış türevinde her iki hücre hattında paralel

olarak artış gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattında da mTORC1 ve alt baş (downstream) moleküllerinin de aktive olduğu göz önüne alındığında Şekil 9'da gösterilen bulgularımız kendini doğrular niteliktedir.



Şekil 9. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde Rictor ve fosfatlanmış türevinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki Rictor ve Rictor-T1135-P seviyesini temsil eden protein bandı β -actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

mTORC2 yolağının aktivasyon statüsü belirteci olarak kullanılan bir diğer yöntem ise mTORC2 tarafından serin 473'de fosfatlanarak aktive edilen AKT kinazı seviyesinin tespit edilmesidir. mTORC1'in mTORC2 kompleksini inaktive etmesi AKT-S473-P seviyesinde bir düşüşe neden olacaktır. Bu nedenle A-498 ve Caki-1 hücrelerinde AKT ve AKT-S473-P seviye tespiti Western Emdirimi yöntemi ile yapılmıştır (Şekil 10).

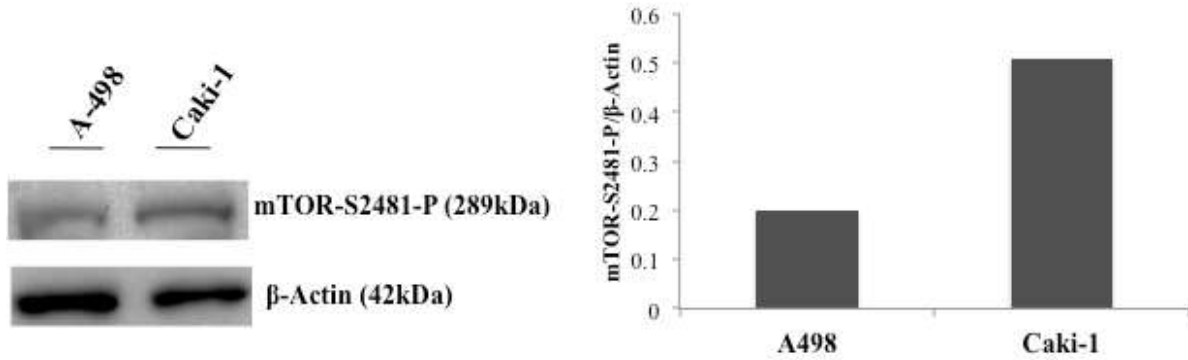


Şekil 10. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde AKT aktivasyonunun Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki AKT ve AKT-S473-P ifade seviyesini temsil eden protein bandı β -actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

AKT' nin S473'de fosfatlanan formu her iki hücre hattında da tespit edilebilecek miktardadır. A-498 hücrelerinde Caki-1 hücrelerine göre daha az ihtiva edilen AKT proteininin büyük

çoğunluğunun (2,5 kat) S473'de fosfatlandığı da Şekil 10'da gösterilmiştir. Ancak Caki-1 hücrelerinde bulunan AKT proteininin %80' i S473'de fosfatlanmıştır. Sonuçlarımızı açıklamak için yaptığımız literatür taramasında mTORC2'nin mTORC1 kompleksinin inaktivasyonundan bağımsız olarak da aktive edildiği ve hücrelerin bu nedenle Everolimus direnci geliştirebildiği belirtilmiştir (Oh ve Jacinto 2011). mTORC2 yolağında yer alan ve bu kompleks bünyesinde serin 2481'de otofosforile olan mTOR kinazı aktif mTORC2 yolağının belirteçlerinden biridir. Bu nedenle A-498 ve Caki-1 hücrelerinde mTORC2 yolağının mTORC1 yolağından bağımsız olarak aktive olup olmadığının anlaşılması için yaptığımız deneylerde mTORC2 aktivasyonunun indikatörü olan mTOR-S2481-P türevinin ifadesinin Western Emdirimi tespiti yoluna gidilmiştir. mTOR'un fosfatlanmış türevinin ifadeleri Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmiştir (Şekil 11). Deney sonucuna göre mTORC2 kompleksinde bulunan mTOR kinazının S2481'de otofosforilasyonu her iki hücre hattında da tespit edilmiştir. mTOR-S2481 otofosforilasyonunun Caki-1 hücrelerinde A-498 hücreleriyle karşılaştırıldığında 2,5 kat daha fazla ifade edildiği görülmüştür.

Western Emdirimi deneylerimizin sonucunda A-498 ve Caki-1 hücrelerinde serum indüksiyonunun AKT-T308-P'nin aktive olmasına ve dolayısı ile mTORC1 yolağının (mTOR-S2448-P) aktive edilmesine sebebiyet verdiği gözlemlenmiştir. mTORC1 yolağı aktivasyonu A-498 ve Caki-1 hücrelerinde alt baş sinyal moleküllerinin sırası ile aktive olması (Şekil 6-8) ve geri bildirim yolağı ile Rictor'un fosfatlanarak (Şekil 9) aktive olması ile sonuçlanmıştır. Ancak A-498 ve Caki-1 hücrelerinde Rictor'un mTORC1 tarafından aktive edilmesinin mTORC2 yolağının inhibe edilmesi için yeterli olmadığı görülmüştür (Şekil 10 ve 11).



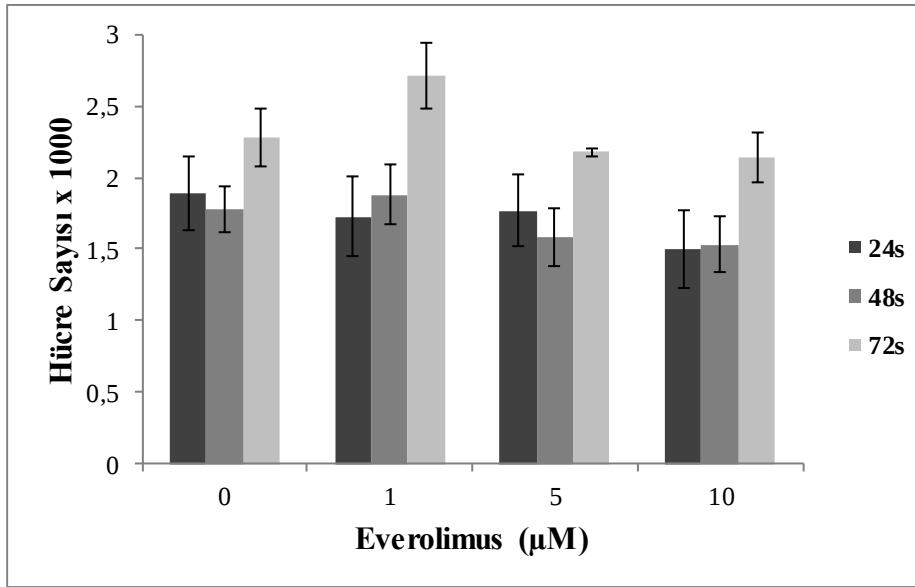
Şekil 11. A-498 ve Caki-1 hücrelerinde mTOR'un S2481'de türevlerinin protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki mTOR-S2481-P ifade seviyesini temsil eden protein bandı β-actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

4.3 Everolimus ve ABT-737 kemoterapötik ilaçlarının A-498 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Everolimus direnci gösteren ve Bcl-2 proteinini yüksek ifade eden BHK hücre hatlarında Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun terapötik potansiyelini belirleyebilmek için BHK

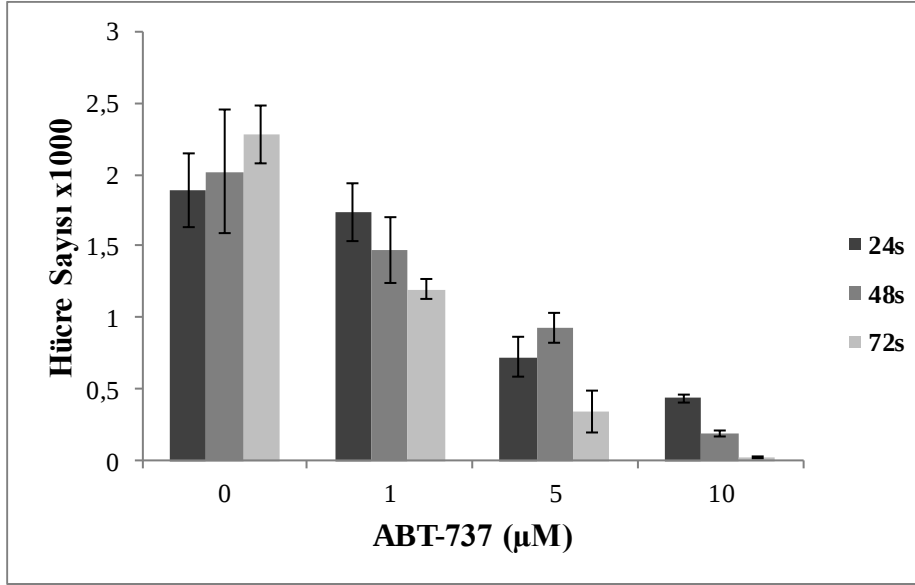
hücre modellerimizden biri olan A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaçlarının hücre sağ kalımı üzerindeki en düşük efektif dozlarını belirleme çalışmaları WST-1 hücre canlılık testi ile yapılmıştır. Deney düzeneği “Gereç ve Yöntemler” kısmında Bölüm 3.3’de WST-1 hücre canlılığı testi başlıkları altında detaylı olarak anlatılmıştır.

WST-1 hücre canlılık testi sonunda elde edilen absorbans değerleri, deneylere paralel yapılan ve 1.000, 2.000, 3.000, 4.000 ve 5.000 hücre ekilmiş standart tabaklardan elde edilen absorbans değerleri ile çizilen standart eğri yardımı ile hücre sayısına çevrilmiştir. Böylelikle ilaç muamelesi sonucunda görülen absorbansdaki düşüşün sitostatik ya da sitotoksik etkiden olup olmadığı analiz edilmek istenmiştir.



Şekil 12. A-498 BHK’da farklı dozlardaki Everolimus’un hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi. Deney 4 kez tekrarlanmıştır.

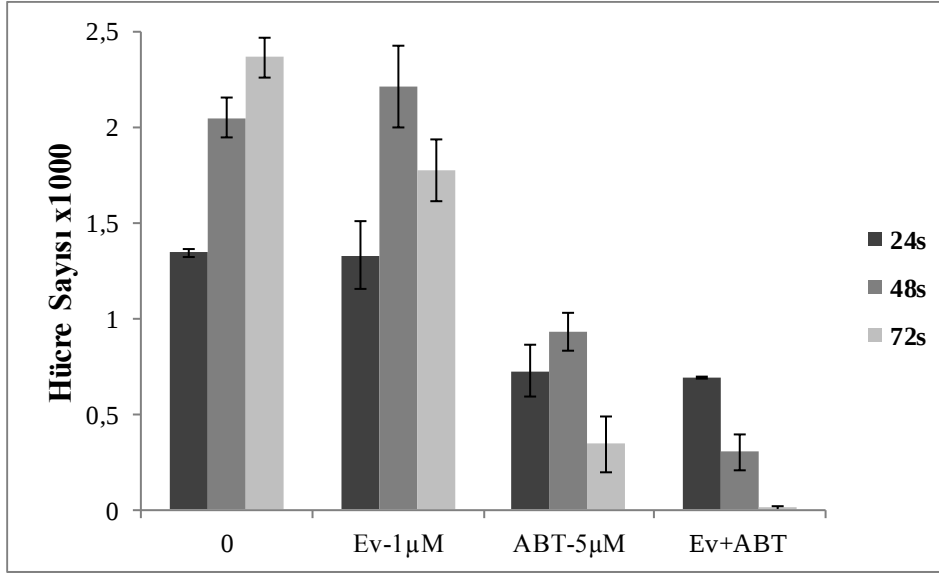
1, 5 ve 10µM Everolimus ile 24, 48 ve 72 saat muamelesinin A-498 hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 12’de gösterilmiştir. Kuyucuk başına yoğunluğu 2.000 olarak ekilen A-498 hücreleri 72 saat sonucunda sayılarını 2.400’ e yükseltmişlerken bu hücrelerin 1µM Everolimus ile muamelesi sonunda 24 ve 48 saatlik dilimler için canlılığını yitirmediği ve bu hücrelerin 72 saatin sonunda ise muamele görmemiş hücreler (kontrol hücreler) kadar çoğaldıkları tespit edilmiştir. Hücreler uygulanan 5 ve 10µM Everolimus’a karşı 24 saatten başlayarak 72 saat boyunca direnç göstermiş ve canlı hücre sayısında herhangi bir düşüş kayıtlı edilmemiştir. A-498 BHK hücrelerinde uygulanan WST-1 hücre canlılığı testi, 1, 5 ve 10µM dozlarındaki Everolimus’a karşı hücrelerin 24, 48 ve 72 saat boyunca direnç gösterdiğini ortaya koymuştur.



Şekil 13. A-489 BHK'da farklı dozlardaki ABT-737'nin hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.

A-498 hücreleri 1, 5 ve 10µM konsantrasyonlarındaki Bcl-2 inhibitörü ABT-737 ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilmişlerdir (Şekil 13). 1µM ABT-737, A-498 hücrelerinin canlılığında 24 ve 48 sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe yol açmazken, 72 saatin sonunda kuyucuk başına 2.000 olarak ekilen hücrelerin sayısı 1.200' e kadar gerilemiştir. 5µM ABT-737 dozu ise 24 saatin sonunda hücre canlılığında %60 düşüşe yol açarken, bu oran 48 saat muamele sonrasında hücre canlılığında %80, 72 saat muamele sonundaysa %90 düşüşe neden olmuştur. Deney düzeneğinde kullanılan en yüksek ABT-737 dozu (10µM) 24 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığında %80 düşüşe yol açarken, 48 saat sonunda hücre canlılığında %90 düşüş gözlemlenmiştir. 10µM ABT-737, 72 saat muamele sonrasında hücre canlılığını %98 oranında düşürmüştür. A-498 BHK hücrelerinde uygulanan WST-1 hücre canlılığı testi sonunda 10µM ABT-737 konsantrasyonunun hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sebep olduğuna karar verilmiştir.

Bir çok kanserin tedavisinde anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesini inhibe edecek ilaç geliştirilmesi ve kanser hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye olan direncini azaltmaya yönelik çalışmalar yapılmasına rağmen Bcl-2 inhibitörlerinin BHK tedavisinde henüz denenmemiş olması (Santoni vd. 2014) proje hipotezini oluşturmuştur. Bu hipotez doğrultusunda Everolimus direnci gösteren ve Bcl-2 proteinini çokça ifade eden ve hücre modellerimizden biri olan A-498 BHK hücre hattında Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre canlılığına etkisi WST-1 hücre canlılığı testi ile belirlenmiştir (bkz. 3.3). Şekil 12 ve 13'deki sonuçlarımız doğrultusunda 1µM Everolimus ve 5µM ABT-737 dozlarının A-498 hücrelerinde kombinasyon için kullanılmasına karar verilmiştir.

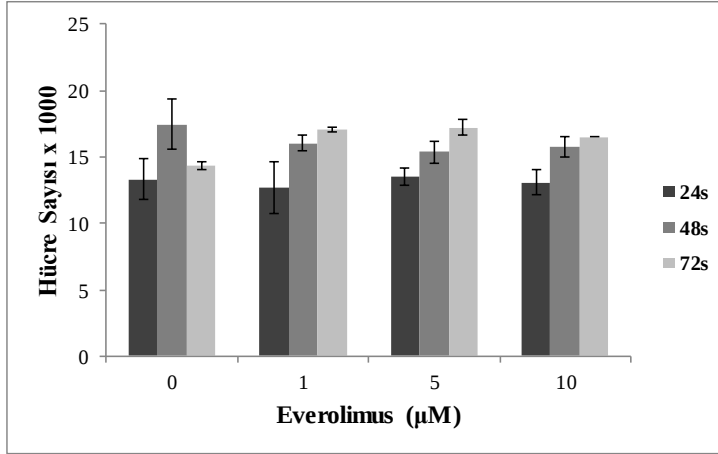


Şekil 14. A-498 BHK’da Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile tespit edilmesi.

Şekil 14’de 1µM Everolimus, 5µM ABT-737 ve iki ilacın kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde muamele edilmiş A-498 hücrelerinin bu muameleye verdiği yanıt gösterilmiştir. 1µM Everolimus ile muamele edilen A-498 hücreleri 24, 48 ve 72 saatin sonunda 0µM ile ifade edilen ve hiçbir ilaç muamelesi görmeyen kontrol hücrelerine oranla herhangi bir değişiklik göstermemişlerdir. İlaç kombinasyonunda kullanılmak üzere 5µM olarak hücrelere tatbik edilen ABT-737, 24 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığında %50 düşüşe neden olurken, bu düşüş 48 saat süren muamele sonunda %60’a yükselmiştir. Hücre canlılığında tespit edilen %80’ lik düşüş ise hücrelerin 5µM ABT-737 ile 72 saat muamele edilmesi sonucunda gözlemlenmiştir. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücrelere uygulanması 24 saat sonunda hücre canlılığında %50 düşüşe neden olmuştur. Hücre canlılığında görülen bu düşüş 48 ve 72 saatin sonunda daha da artış göstermiştir. Öyle ki Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu ile 48 saat muamele canlı hücre sayısında %80 oranında düşüşe neden olurken 72 saatin sonunda canlı hücre sayısında %95 azalma tespit edilmiştir.

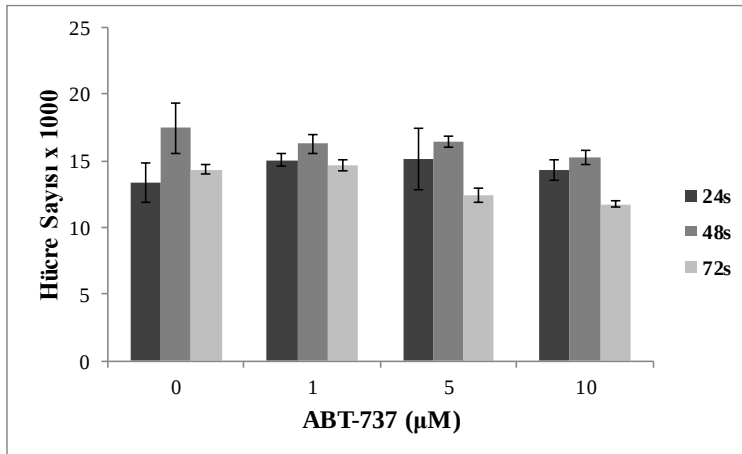
4.4 Everolimus ve ABT-737 kemoterapötik ilaçlarının Caki-1 hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Everolimus ve ABT-737 ilaçlarının hücre sağ kalımı üzerindeki en düşük efektif dozlarını bulmak için BHK hücre modellerimizden biri olan Caki-1 hücrelerinde doz belirleme çalışmaları diğer bir hücre modelimiz olan A-498 BHK hücre hattında olduğu gibi WST-1 hücre canlılık testi ile yapılmıştır (bkz. 3.3).



Şekil 15. Caki-1 BHK'da farklı dozlardaki Everolimus'un hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.

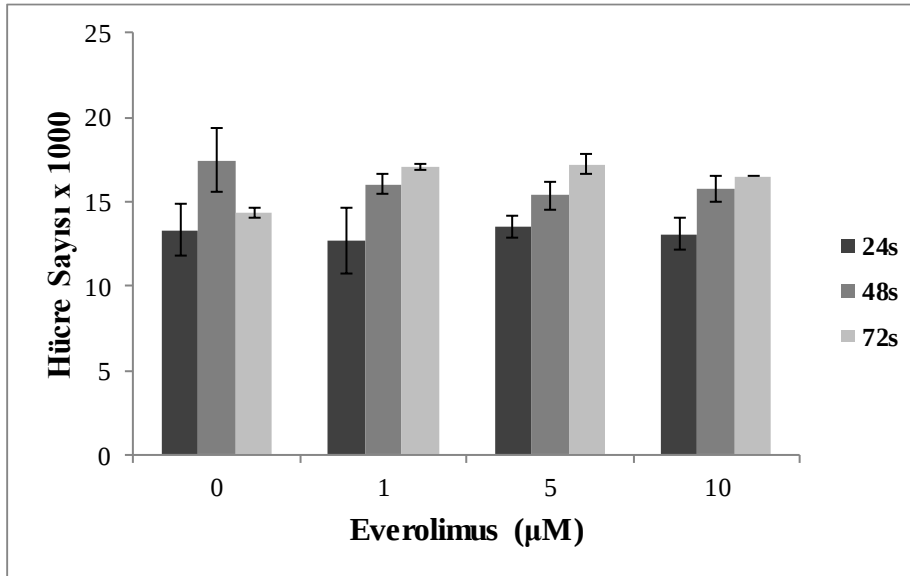
Caki-1 hücreleri 1, 5 ve 10µM Everolimus ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilmiş ve Everolimus'un hücre canlılığı üzerindeki etkisi Şekil 15'de gösterilmiştir. Kuyucuk başına 10.000 ekilen ve 1µM Everolimus ile muamele edilen hücreler 24 saatten başlayarak 72 saatin sonuna kadar çoğalarak sayılarını 17.000'e çıkarttıkları ve ilaç muamelesi görmemiş kontrol hücrelerinde olduğu gibi çoğalmaya devam ettikleri tespit edilmiştir. 5 ve 10µM Everolimus, tıpkı 1µM Everolimus'da gözlemlendiği gibi 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde hücre canlılığında herhangi bir düşüşe yol açmazken hücrelerin çoğalarak sayılarını artırdıkları tespit edilmiştir. 1, 5 ve 10µM dozlarındaki Everolimus'un uygulanan Caki-1 hücre canlılığında düşüşe yol açmadığı ve bu hücrelerin Everolimus'a karşı dirençli olduğu yapılan WST-1 hücre canlılığı testi ile gösterilmiştir.



Şekil 16. Caki-1 BHK'da farklı dozlardaki ABT-737'nin hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.

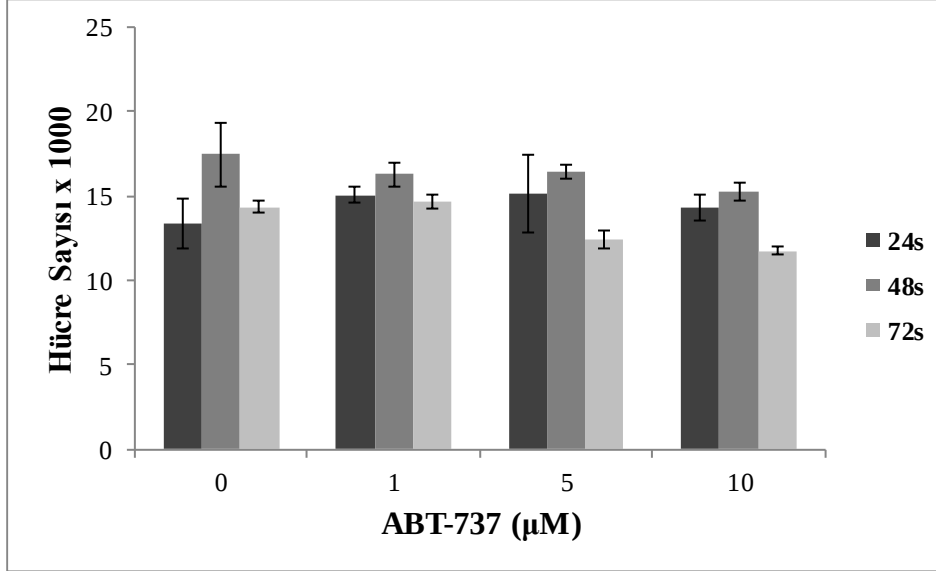
Caki-1 hücrelerinin Bcl-2 inhibitörü ABT-737' ye cevabının test edilmesi için hücreler 1, 5 ve 10µM ABT-737 ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilmişlerdir. 1µM ABT-737 ile 24 ve 72 saat muamele edilen hücreler çoğalarak sayılarını artırmışlardır. 48 saat sonunda ise hücre canlılığında gözlemlenen düşüşün istatistiksel olarak anlamsız olduğu Şekil 16'da görülmektedir. 5µM ABT-737, 24 ve 48 saat inkübasyon sürelerinin sonunda Caki-1 hücre canlılığını %15 oranında artırmış, 72 saat sonunda ise hücre canlılığında %10 düşüşe yol açmıştır. 5µM ABT-737 konsantrasyonuna paralel olarak 10µM ABT-737 dozu da 24 ve 48 saatin sonunda hücre canlılığında artışa yol açarken, 72 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığında %20 civarında düşüş kayıt edilmiştir. Burada sergilenen WST-1 hücre canlılık testi sonucuna göre 1, 5 ve 10µM ABT-737 hücre canlılığında sitostatik ve sitotoksik bir etkiye yol açmamıştır ve hücreler ABT-737'ye karşı direnç göstermişlerdir.

Yukarıda anlatılan deneyler için 4 yıl önce Tübitak projemizden alınan yüksek pasajlı hücreler kullanılmış olup sonuçların verifikasyonu için ATCC'den yeniden Caki-1 hücreleri ısmarlanmış ve deneyler aynı düzenek korunarak tekrarlanmıştır. Literatürde yapılan çalışmalara paralel olarak yeni ısmarlanan Caki-1 hücrelerinde Everolimus muamelesi sonucunda canlı hücre sayısında herhangi bir düşüş saptanmamıştır. Ancak yeni ısmarlanan hücreler ABT-737 ile muamele edildiklerinde 10µM konsantrasyonunda hücre canlılığında bir düşüşün gerçekleştiği tespit edilmiştir.



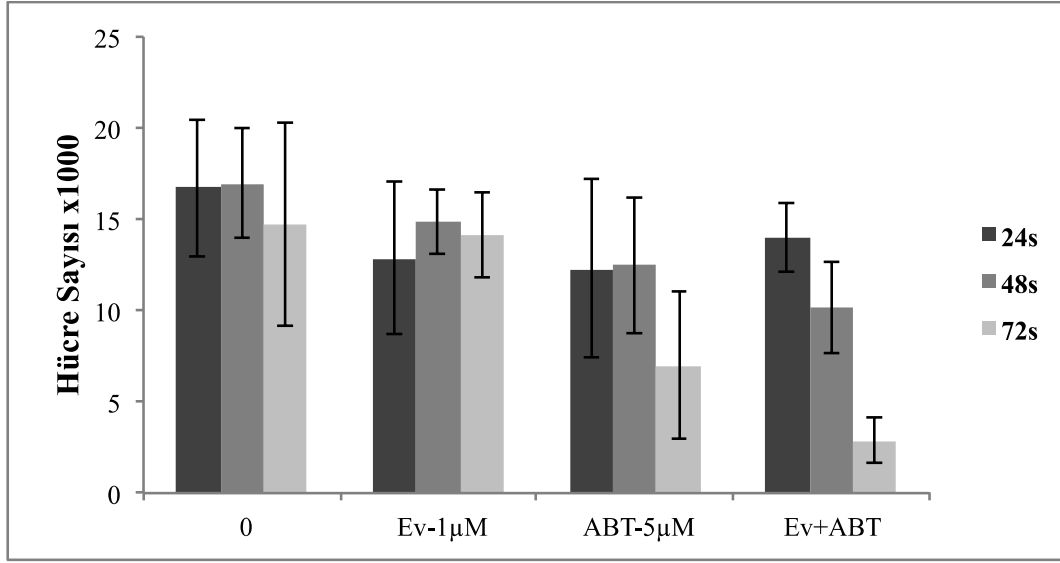
Şekil 17. Erken pasajlı Caki-1 BHK'da farklı dozlardaki Everolimus'un hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.

Şekil 17'den görülebileceği gibi 1, 5 ve 10µM Everolimus, 24 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığında düşüşe yol açmamıştır. Aynı dozlar için 48 ve 72 saat sonunda Everolimus'un Caki-1 hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 18. Erken pasaj Caki-1 BHK'da farklı dozlardaki ABT-737'nin hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.

Şekil 18'de görüleceği üzere 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde 1µM ABT-737, ilaç muamelesi görmemiş kontrol (0µM) hücreleri ile benzer hücre sayısında kalmıştır. Hücrelerin 24 ve 48 saat boyunca 5µM ABT-737 ile muamelesi canlılıklarına etki etmezken, 72 saat inkübasyon sonunda 5µM ABT-737 hücre canlılığında %10 düşüşe yol açmıştır. Deney düzeneğinde uygulanan en yüksek ABT-737 dozu (10µM) 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe sebebiyet vermemiştir; ancak 72 saat sonunda 10µM ABT-737 muamelesi hücre canlılığında %40 oranında düşüşe neden olmuştur. Deney sonuçlarımız ışığında 1µM Everolimus ve 10µM ABT-737 dozlarının Caki-1 hücrelerinde kombinasyon için kullanılmasına karar verilmiştir.

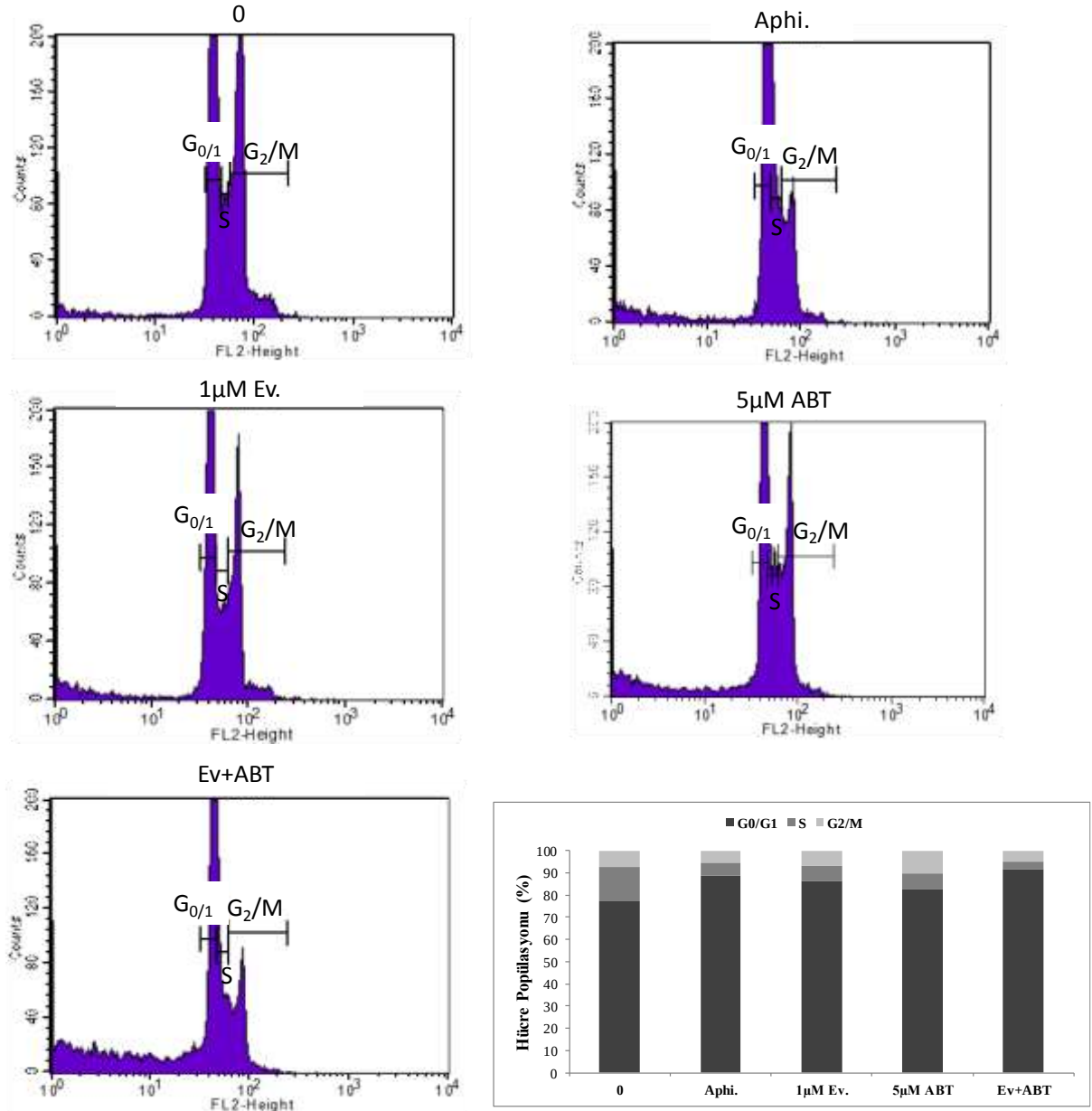


Şekil 19. Caki-1 BHK’da Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile tespit edilmesi.

Şekil 19’da 1µM Everolimus, 10µM ABT-737 ve iki ilacın kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde muamele edilmiş Caki-1 hücrelerinin bu muameleye verdiği yanıt gösterilmiştir. 1µM Everolimus ilaç muamelesinin 24, 48 ve 72 saatin sonunda Caki-1 hücre canlılığında hiçbir ilaç muamelesi görmeyen kontrol hücrelerine (0µM) kıyasla istatistiksel olarak bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. 10µM ABT-737, 72 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığında %50 düşüşe neden olmuştur. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu 48 saatin sonunda hücre canlılığında %35 oranında düşüşe yol açmıştır. Hücre canlılığında görülen bu düşüş 72 saatin sonunda daha da artış göstererek canlı hücre sayısının %80 oranında azalmasına sebebiyet vermiştir.

4.5 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun A-498 BHK hücre döngüsü üzerine etkisinin belirlenmesi

WST-1 hücre canlılık testi ile A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu sonucunda tespit ettiğimiz canlılıktaki düşüşün hücre döngüsü üzerindeki etkisi Akış Sitometrisi (Bölüm 3.4) ve Western Emdirimi (Bölüm 3.6) deneyleri yapılarak belirlenmiştir.

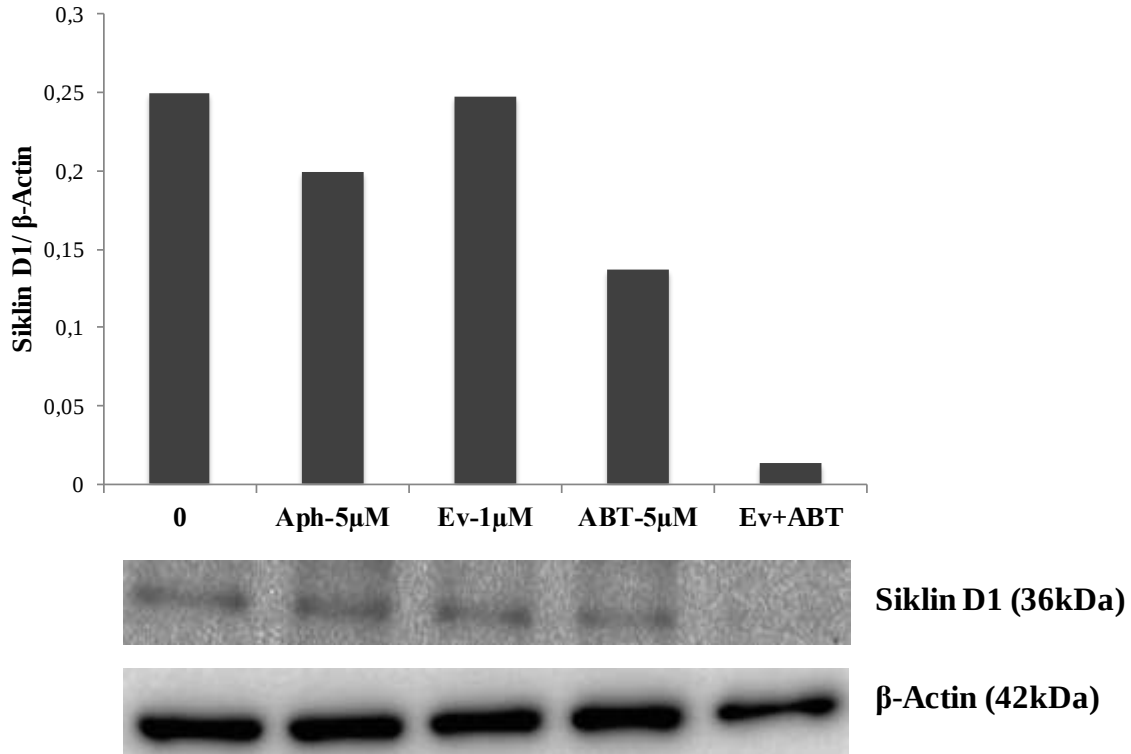


Şekil 20. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre siklüsü üzerine etkisinin Akış Sitometresi yöntemi ile tespit edilmesi. Örneklerdeki DNA propidiyum iyodit boyaması ile etiketlenmiş ve Aphidicolin (Aphi) ile muamele görmüş hücreler G0/G1 fazlarını gösteren referans olarak kullanılmıştır.

Akış sitometrisi sonuçlarımız değerlendirildiğinde ilaç muamelesiz kontrol hücrelerimizin (0µM) 24 saat serum indüksiyonunu takiben sadece %16' sının S fazına girdiği ve hücrelerin %7' sinin G2/M fazında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 20). Bu durumda 24 saat serum içeren büyüme ortamında bulunan hücrelerin %77' lik çoğunluğu halen G0/G1 fazında bulunmaktadır. 24 saatlik Aphidicolin muamelesi G0/G1 fazında bulunan hücreleri %89'a çıkarırken S ve G2/M fazında bulunan hücrelerin yüzdesi sadece 6 olarak tespit edilmiştir. Everolimus tatbiki

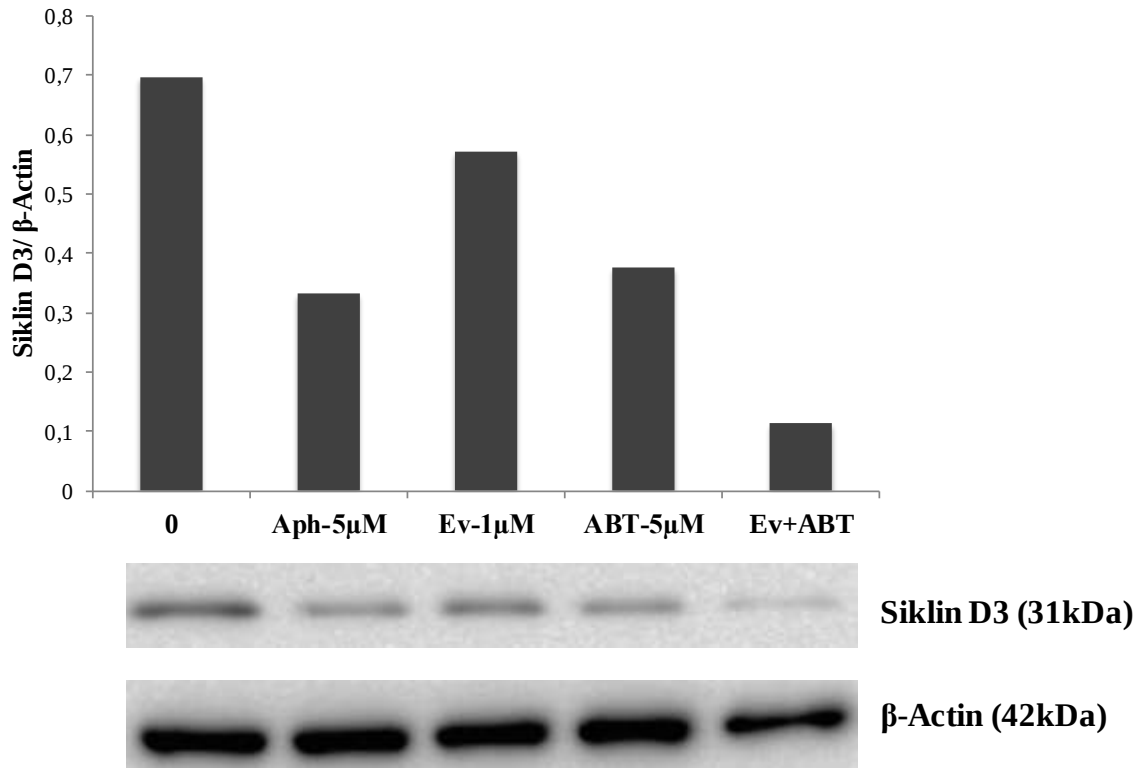
sonucunda G0/G1 fazında bulunan hücreler %86 olarak tespit edilmişken hücrelerin %7' si S ve G2/M fazına geçmişlerdir. ABT-737 muamelesi sonucunda %83 G0/G1, %7 S ve %10 G2/M fazında hücre tespit edilmiştir. Kombine ilaç muamelesi G0/G1 fazındaki hücreleri %92' ye çıkartırken, S fazında bulunan hücreleri %3' e düşürmüştür, G2/M fazında bulunan hücreler popülasyonun %5'ini oluşturmaktadır. Sonuçlarımız bir bütün olarak ele alındığında Everolimus veya ABT-737 muamelesinin S ve G2/M fazında bulunan hücre yüzdesinde kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olmadığı tespit edilirken kombine tedavinin S ve G2/M fazında bulunan hücre yüzdesini anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Akış sitometresinden elde edilen sonuçların tasdik edilmesi için, G1 fazı siklin D1/D3 ve de siklin p27/Kip1 kinaz inhibitör protein ifade anlatımı Western Emdirimi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla A-498 hücreleri yukarıda belirtilen deney koşullarında 6 kuyucuklu tabaklara ekilmiş ve ajanlarla muamele gördükleri 24 saatin sonunda hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonları 30µg olacak şekilde hazırlanan proteinler %12'lik SDS-poliakrilamid jeline yüklenerek elektroforez yoluyla ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan proteinler Western Emdirimi tekniğiyle nitroselüloz membrana aktarılmış ve örnekler Siklin D1, Siklin D3 ve p27/Kip1 antikoları ile analiz edilmişlerdir. Western Emdirimi deneylerinde β-actin protein miktar tayini yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.



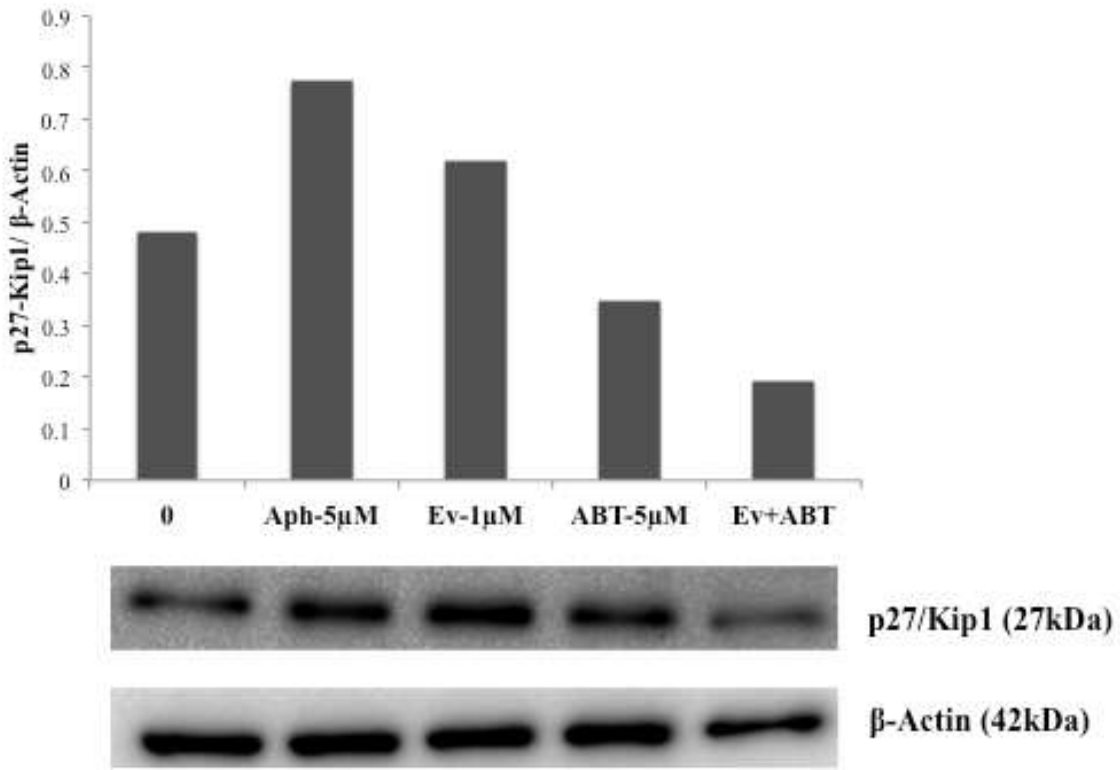
Şekil 21. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu uygulanan A-498 BHK hücrelerinde Siklin D1 ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespiti. Örneklerdeki Siklin D1 ifade seviyesini temsil eden protein bandı β-actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

Şekil 21’den görüleceği üzere Everolimus muamelesi kontrol hücrelerine kıyasla (0µM) Siklin D1 ifadesi üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken hücrelerin Aphidicolin ile muamele edilmesi Siklin D1 ifadesinde %20 oranında düşüşe neden olmuştur. Bu sonuçlar WST-1 deneylerimizi doğrular nitelikte olup A-498 hücrelerinin Everolimus’a karşı direnç gösterdiğini ve çoğalmaya devam ettiklerini göstermiştir. ABT-737 ve kombine ilaç muamelesinin A-498 hücrelerinde Siklin D1 ifadesinde düşüşüne neden olması (ABT-737 için %45, kombine ilaç muamelesi için %95) 24 saatin sonunda bu hücrelerin apoptoza girerek protein yıkımına başladıklarına işaret etmektedir.



Şekil 22. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu uygulanan A-498 BHK hücrelerinde Siklin D3 ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespit edilmesi. Örneklerdeki Siklin D3 ifade seviyesini temsil eden protein bandı β-actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

G1 fazında görev alan diğer bir Siklin D3’ ün A-498 hücrelerinin Everolimus ile muamele görmesini takiben %18 azaldığı Aphidicolin tatbikinin ise Siklin D3 ifadesinde %52 düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 22). Beklenir şekilde ABT-737 ve kombine ilaç ile 24 saat muamele A-498 hücrelerinin apoptotik sürece girmelerinden dolayı Siklin D3 ifadesinde sırası ile %46 ve %84 düşüşe sebebiyet vermiştir.



Şekil 23. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu uygulanan A-498 BHK hücrelerinde p27/Kip1 ifadesinin Western Emdirimi yoluyla tespiti. Örneklerdeki p27/Kip1 ifade seviyesini temsil eden protein bandı β-actin protein bandına göre normalize edilmiştir.

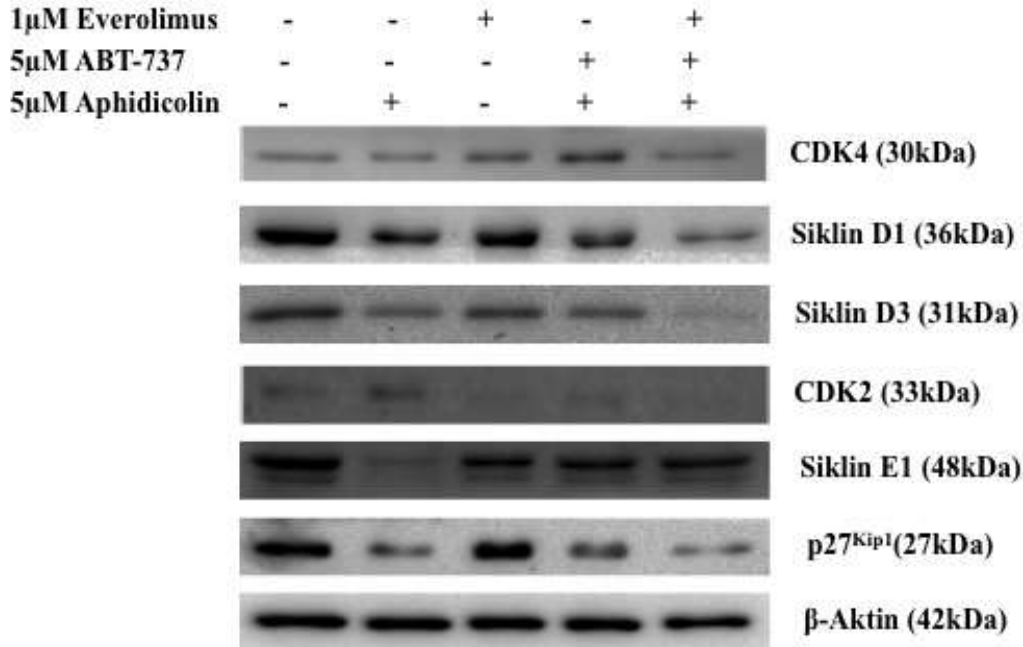
Şekil 23'te gösterilen siklin kinaz inhibitör p27/Kip1 protein seviyesi Aphidicolin tatbiki sonrasında %61 artış göstermiştir. Everolimus dirençli A-498 hücrelerinin bu ilaç ile muamele görmeleri beklenildiği gibi p27/Kip1 protein seviyesinde sadece %29'luk bir artışa sebebiyet vermemiştir. ABT-737 ve kombine ilaç tedavisi gören A-498 hücrelerinde apoptotik yıkımdan mütevellit p27/Kip1 protein seviyesi düşüş göstermiştir.

4.6 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun A-498 ve Caki-1 hücre döngüsü üzerindeki etkisinin detaylı olarak incelenmesi

Yukarıda gösterilen sonuçlara ek olarak (bkz. 4.5) Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun A-498 hücre döngüsüne olan etkisi bu kısımda daha kapsamlı olarak araştırılmıştır. A-498 hücrelerine ek olarak Bcl-2 proteinini çokça ifade eden ve Everolimus direnci gösteren Caki-1 hücrelerinde de Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre döngüsüne etkisi detaylı olarak araştırılmıştır.

Deney düzeneğinde A-498 hücreleri 1μM Everolimus ve/veya 5μM ABT-737 ilaçları ile 24 saat boyunca muamele edilirken Caki-1 hücreleri 24 saat boyunca 1μM Everolimus ve/veya 10μM ABT-737 ilaçlarına tabi tutulmuşlardır. Kontrol olarak ise hücreler 48 saat boyunca 5μM

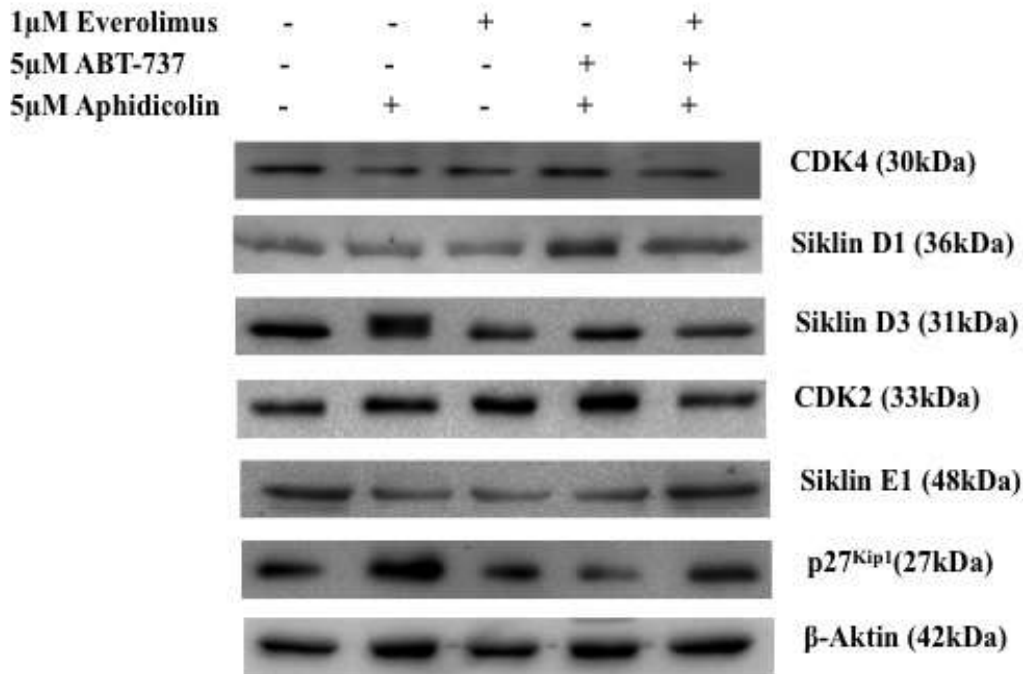
Aphidicolin ile muamele edilmişlerdir. İlaç kombinasyonunun hücre döngüsüne etkisi bu döngüde rol alan protein ifadelerine Western Emdirimi (bknz 3.6) yöntemiyle bakılmasıyla analiz edilmiştir. Western Emdirimi deneylerinde β -Aktin proteini miktar tayini yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.



Şekil 24. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre döngüsünde rol oynayan proteinlerin üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

Siklin proteinlerden D1, D3 ve E1 hücre döngüsünde G1 fazında rol oynarlar. G1 fazında, siklin proteinleri hücre içi ve dışındaki durumu kontrol ederek hücrelere DNA replikasyonuna başlayıp başlayamayacakları emrini verirler. Siklin D1 ve D3 proteinlerinin hedef kinazları olan CDK4' e bağlanarak oluşturdukları kompleks diğer siklin proteinlerinden olan Siklin E1'in ifade edilmesine sebep olur. Hücre döngüsünde G1/S fazı geçişinden sorumlu olan siklin E1 ise CDK2 enzimine bağlanarak aktif G1/S kinaz kompleksini oluşturur. Bu siklin-CDK komplekslerinin inhibisyonunda sorumlu olan p21 ailesi üyesi p27Kip1 proteini Siklin E1-CDK2 kompleksine bağlanarak kinaz enzim aktivitesini bloke eder. mTOR kinazı hücre büyümesi ve çoğalmasından sorumlu olduğu için hücre döngüsünde yer alan proteinlerin ifadelerinde görülen artış veya azalış mTOR yolağının aktivitesi ile yakından ilişkilidir. Bu bağlamda Şekil 24'de gösterildiği üzere kontrol hücrelerine kıyasla (0 μ M) Everolimus ile muamele edilen A-498 hücrelerinde siklin D1 ve D3 protein seviyelerinde herhangi bir değişikliğin gözlemlenmemiş olması bu hücrelerin Everolimus'a dirençli olmalarından kaynaklanmaktadır. ABT-737 ve kombine ilaç muamelesinin A-498 hücrelerinde Siklin D1 ifade düşüşüne neden

olması (ABT-737 için %45, kombine ilaç muamelesi için %95) 24 saatin sonunda bu hücrelerin apoptoza girerek protein yıkımına başladıklarına işaret etmektedir. Buna karşın, ilaç kombinasyonu CDK4 proteini üzerinde herhangi bir etkiye yol açmamıştır. İlaç kombinasyonu 24 saatin sonunda siklin E1 seviyesinde %25 düşüşe yol açarken bu düşüş CDK2 proteini ifadesinde %60 oranındadır. Bu düşüş G1 fazında görülen hücre döngüsünün inhibisyonu ile ilişkilidir. ABT-737 ve kombine ilaç tedavisi gören A-498 hücrelerinde apoptotik yıkımdan mütevellit p27^{Kip1} protein seviyesinde ise %60 oranında düşüş görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu 24 saat muamelenin sonunda A-498 hücre döngüsünü G1 fazında durdurmaktadır.



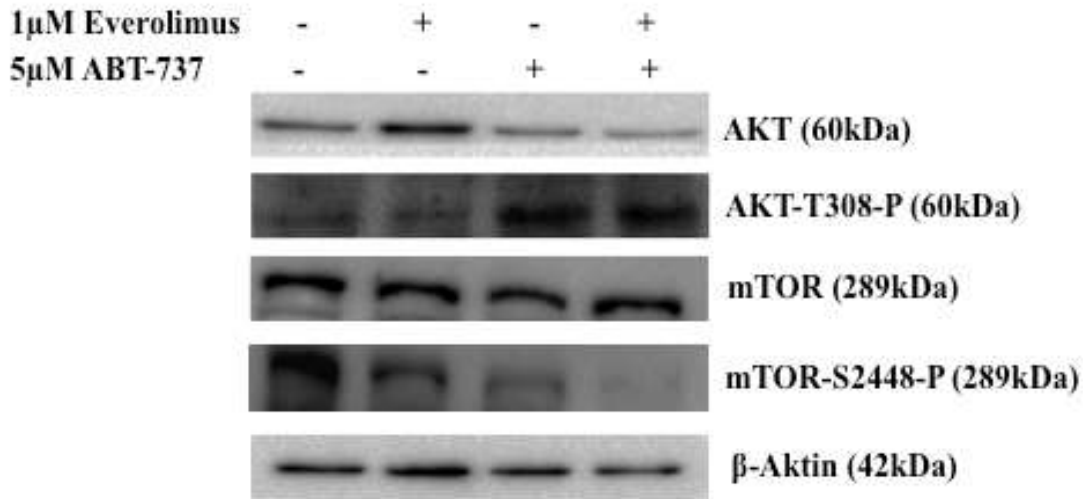
Şekil 25. Caki-1 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre döngüsünde rol oynayan proteinlerin üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

Şekil 25 incelendiğinde ise Everolimus ve kombinasyon ilaç uygulamasında Caki-1 hücrelerinde CDK4 ifadesi %30 oranında azalması Siklin D1 ve Siklin D3 de gözlemlenen ifade düşüşüne paralel olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca mono- ve kombin-ilaç tedavisi azalan yüzdelerde Siklin E1 ifadesinde de düşüşe neden olmuştur. Beklenildiği gibi Everolimus ve kombine tedavi p27^{Kip1} proteininin ifadesinde artışa neden olmuştur.

4.7 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTOR yolağı üzerindeki etkisinin tespit edilmesi

Projemizin bir sonraki aşamasında Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun A-498 BHK hücrelerindeki moleküler mekanizmalar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda BHK'da anahtar görev gören mTOR sağkalım yolağı, incelenen ilk moleküler mekanizma yolağı olmuştur. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTOR yolağının iki ayrı kompleksi olan mTORC1 ve mTORC2 üzerindeki etkisi, bu yolakta rol alan proteinlerin ifadelerinin Western Emdirimi tekniği (Bknz. 3.6) ile tespit edilmesiyle sağlanmıştır. Western Emdirimi tekniğinde mTORC1 kompleksinin karakterizasyonu için AKT, AKT-T308-P, mTOR, mTOR-2448-P, p70S6K, p70S6K-T389-P, S6, S6-S235/236-P, S6-S240/244-P, 4E-BP1, 4E-BP1-S65-P, 4E-BP1-T37/45-P, 4E-BP1-T70-P'a özel antikorlar kullanılmıştır. mTORC2 kompleksinin karakterizasyonu için ise AKT, AKT-S473-P, mTOR, mTOR-S2481-P, Rictor, Rictor-T1135-P'a özel antikorlar kullanılmıştır. β -Aktin proteini miktar tayini yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

mTOR'un regülasyonunda rol alan AKT kinazı PI3K/AKT/mTOR yolağı aktivasyonu sırasında treonin 308'de fosfatlanarak mTORC1 kompleksinde yer alan mTOR kinazının aktivasyonun gerçekleştirir ve bu sayede aktif hale gelen mTOR kinazının serin 2448'de otofosforilasyonu gerçekleşir (Ma vd. 2010).

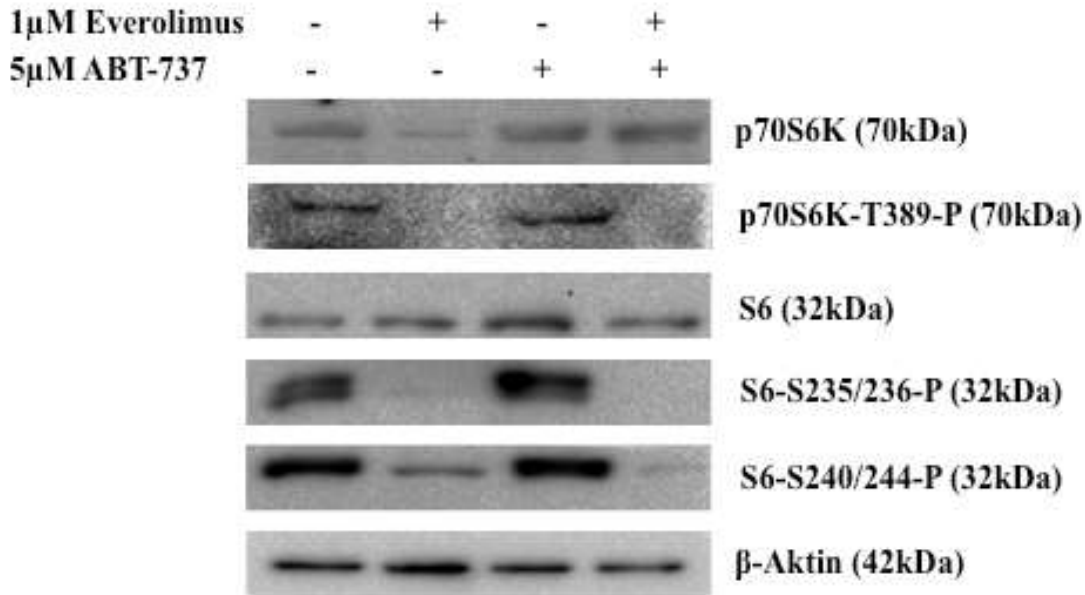


Şekil 26. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun AKT ve mTORC1 kompleksinde bulunan mTOR kinazı aktivasyonu üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

Şekil 26'da görüldüğü üzere Bcl-2 inhibitörü olan ABT-737, AKT'nin treonin 308'de fosfatlanmış türevinin ifadesinde kontrol hücrelerine kıyasla 4 kat artışa yol açmış ve bu artış

Everolimus ve ABT-737 ilaç muamelesi sonunda da tespit edilmiştir. Buna rağmen treonin 308'de fosfatlanan ve aktif olan AKT mTOR kinazı üzerinde herhangi bir etkiye yol açmamıştır. Deney sonucumuzdan yaptığımız çıkarım Everolimus ilacının AKT kinazının treonin 308'de fosfatlanmasından sonraki alt baş moleküllerde inhibasyona etki ettiği yolundadır. Literatür incelendiğinde, ABT-737 muamelesinin AKT' nin T308'de fosfatlanmasında bir artışa sebebiyet vermesi ABT-737'nin hücrel oksidatif stresi arttırmasına bağlanabilir (Howard vd. 2009). Nitekim yapılan çalışmalar oksidatif stresin fosfatidilinositol 3-kinaz yolağını aktive ettiği ve dolayısı ile AKT-T308 fosfatlanmasını arttırdığını göstermiştir (Edelstein vd. 2012, Santoni vd. 2014).

Bununla birlikte uygulanan 1µM Everolimus'un mTOR kinazının serin 2448'de gerçekleşen otofosforilasyonunu ilaç muamelesi görmeyen kontrol hücrelerine kıyasla %40 oranında düşürdüğü ve bu düşüşün 5µM ABT-737 muamelesi sonucunda %80'e indiği görülmüştür. İki ilacın kombinasyonunun ise mTOR kinazının serin 2448'de fosfatlanmasını tamamen önlediği tespit edilmiştir.

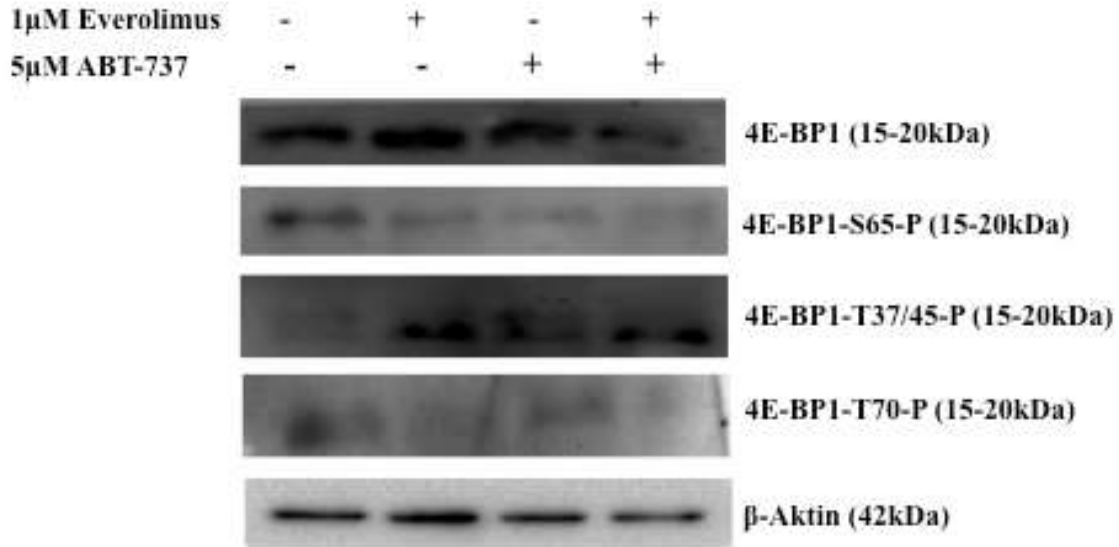


Şekil 27. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun protein sentezinden sorumlu p70S6 kinazı ile alt yolak S6 proteini üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

mTOR yolağı akış mekanizmasında aktif hale gelen mTOR kinazı, p70S6K proteinini treonin 389'da fosfatlayarak aktive eder. Aktif hale gelen p70S6 kinazı tarafından ribozomal S6 proteininin serin 235/236 ve S240/244 bölgelerinde fosfatlanması protein translasyonunun başlamasını sağlar (Rosner vd. 2010). Şekil 27'de, uygulanan Everolimus muamelesinin, bazal p70S6K protein ifadesini kontrol hücrelerine kıyasla %80 oranında düşürdüğü ve aynı düşüşün p70S6K proteinin treonin 389'da fosfatlanmış türevinde de görüldüğü gösterilmiştir.

Everolimus muamelesine kıyasla ABT-737 ve iki ilacın kombinasyonunun p70S6K protein ifadesinde bir ve iki kat kadar bir artışa yol açtığı tespit edilmiştir.

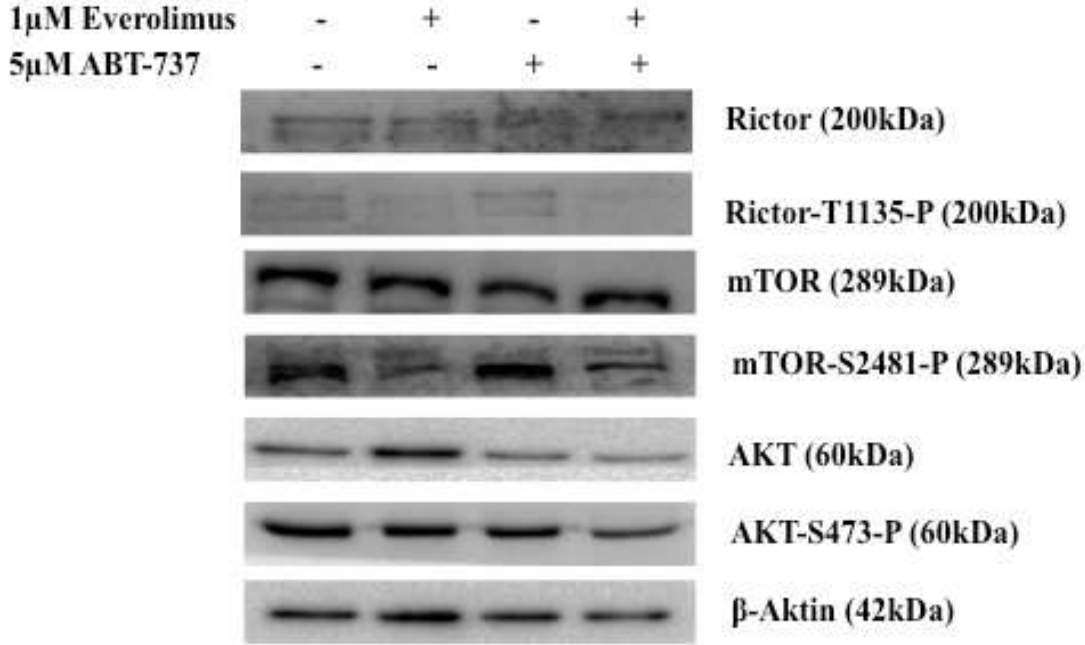
ABT-737 ilacının tek başına uygulanmasıyla treonin 389'da fosfatlanan p70S6K protein ifadesinde 3 kat kadar artış gözlemlenirken, Everolimus ve ABT-737 kombinasyonun p70S6K proteinin bu türevinde tamamen düşüşe yol açmıştır. p70S6 kinazının hedef proteini olan S6 proteininin ifadesi ilaç muameleleri sonunda hemen hemen aynı kalırken, aynı proteinin serin 235/236 ve serin 240/244'de fosfatlanmış türevlerinin ifadesinde Everolimus muamelesi sonunda sırasıyla %90 ve %50 oranında düşüş görülmüştür. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu sonunda ise S6-S235/236-P ve S6-S240/244 seviyelerinde sırasıyla %100'e ve %20'ye kadar düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 28. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun protein sentezi regülatör proteini 4E-BP1 ifadesi üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

Aktif hale gelen mTOR kinazı 4E-BP1 T37/T45, T70 ve S65 bölgelerinde fosfatlayarak, 4E-BP1 proteininin eIF4E üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırır ve bu sayede protein sentezinin başlar (Gingras vd. 2001). Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun 4E-BP1 ve onun fosfatlanmış türevlerinin ifadesine olan etkisi Şekil 28'de Western Emdirimi yöntemiyle gösterilmiştir. Everolimus muamelesi sonunda bazal 4E-BP1 protein ifadesinde %100 oranında artış görülürken, tek başına uygulanan ABT-737 ilacı protein ifadesini %20 oranında düşürmüştür. İlaç kombinasyonu bazal 4E-BP1 seviyesinde %50 oranında düşüşe yol açmıştır. 4E-BP1 proteininin serin 65 ve treonin 70'de fosfatlanmış türevleri ayrı olarak uygulanan Everolimus ve ABT-737 ilaç muamelesine protein seviyelerinde %50 oranında

düşüş göstererek cevap verirken, iki ilacın kombinasyonu bu proteinlerin ifadelerini sırasıyla %80 ve %90 oranında düşürmüştür. 4E-BP1' in treonin 37/45'de fosfatlanan türevinin protein seviyesi ise tüm ilaç muameleleri sonunda artış göstermiştir.



Şekil 29. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTORC2 kompleksi üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

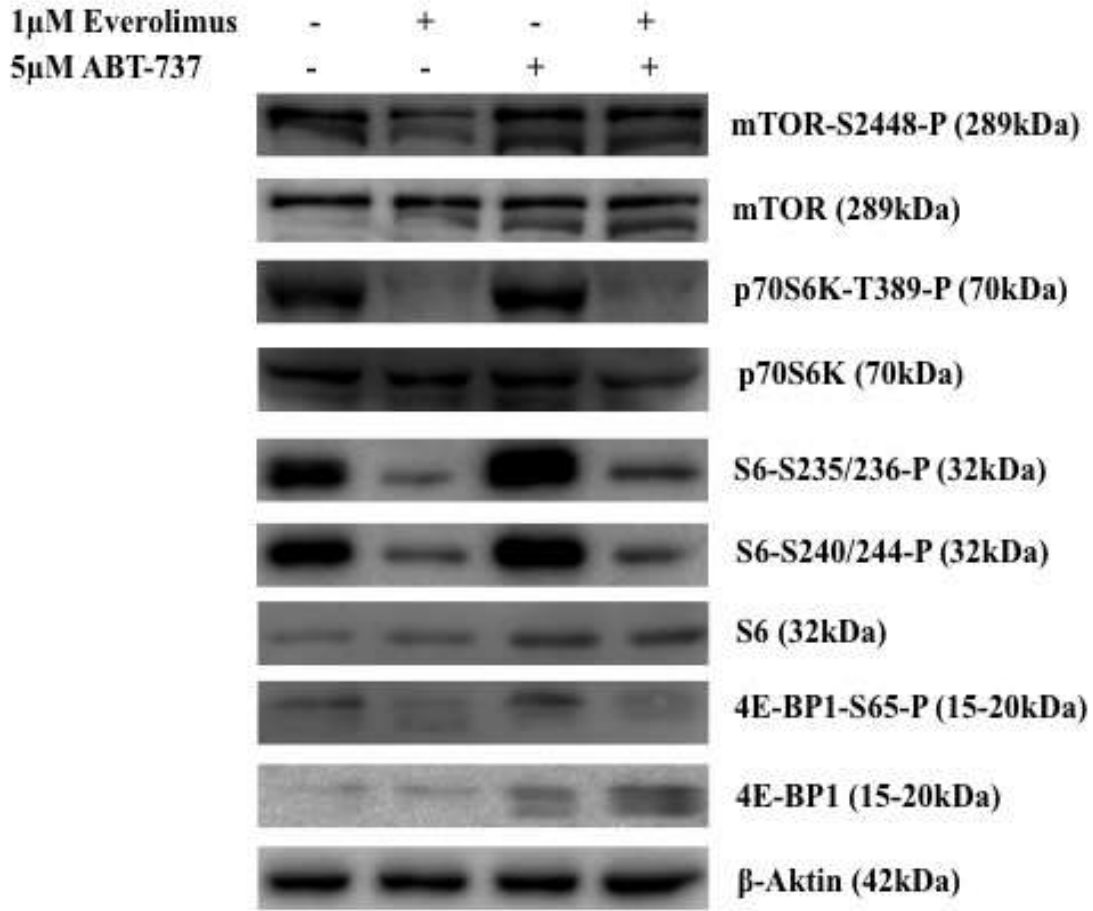
Everolimus direnci gösteren hücrelerde mTORC2 yolağının aktive olduğu literatürde yapılan diğer deneyler ile gösterilmiştir (Santoni vd. 2014). Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTORC2 kompleksi üzerindeki etkisi, bu komplekste yer alan proteinlerin ifadelerine Western Emdirimi tekniği ile bakılarak Şekil 29'da gösterilmiştir.

Hatırlanacağı gibi mTORC2 kompleksinin mTORC1 kompleksi aracılığıyla dolaylı olarak inaktive edilmesi mTORC1 kompleksi regülasyonunda yol alan geribildirim yolaklardan bir tanesidir (Santoni vd. 2014). Bu geribildirim yolağında mTORC1 kompleksi bünyesinde yer alan mTOR kinazı Rictor proteinini treonin 1135 bölgesinde fosfatlanarak aktive eder ve bu aktivasyon sonucunda Rictor mTORC2 kompleksinde bulunan mTOR kinazını inhibe eder. Bu bağlamda Rictor-T1135-P proteini inaktive olmuş mTORC2 kompleksine işaret eder. Şekil 29'da gösterildiği üzere Everolimus ve ABT-737 ilaçlarının tek başına veya birlikte uygulanması bazal Rictor protein ifadesinde herhangi bir değişime yol açmamıştır. Rictor'un treonin 1135'de fosfatlanan türevinin protein ifadesi incelendiğinde ise tek başına uygulanan Everolimus'un Rictor-T1135-P protein seviyesinde %80 oranında düşüşe yol açtığı görülmüştür. ABT-737 tek başına Rictor-T1135-P seviyesine etki etmezken, Everolimus ile birlikte uygulandığında protein seviyesinde %70 düşüşe yol açmıştır. Şekil 26'da gösterilen

mTOR-S2448-P seviyesindeki düşüş dolaylı olarak Rictor proteininin treonin 1135 bölgesinde fosfatlanmasını engelleyerek mTORC2 üzerindeki inhibitör etkisinin kalkmasına yol açmıştır. mTORC2'nin mTORC1 kompleksinin inaktivasyonundan bağımsız olarak da aktive edildiği ve hücrelerin bu nedenle Everolimus direnci geliştirebildiği belirtilmiştir (Oh ve Jacinto 2011). mTORC2 yolağında yer alan ve bu kompleks bünyesinde serin 2481'de otofosforile olan mTOR kinazı aktif mTORC2 yolağının belirteçlerinden biridir. mTOR kinazının serin 2481'de fosfatlanan türevinin protein ifadesi Şekil 29'da gösterilmiştir. Everolimus hücrelere tek başına uygulandığında mTOR-S2481-P protein ifadesini %70 oranında düşürürken. ABT-737'nin tek başına uygulanması protein seviyesinde %60 oranında artışa yol açmıştır. İki ilacın kombinasyonu ise protein ifadesinin %30 oranında azalmasına neden olmuştur.

4.8 Caki-1 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTOR sağkalım yolağına etkisinin tespit edilmesi

Primer böbrek kanseri hücre hattı A-498 için elde ettiğimiz sonuçların sağlaması metastatik böbrek kanseri hücre hattı Caki-1 kullanılarak yapılmıştır. Bu bağlamda Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun mTORC1 kompleksi üzerindeki etkisi 4.7'de bahsedildiği şekilde Caki-1 hücre hatlarında Western Emdirimi tekniğiyle tespit edilmiştir. mTORC1 kompleksinin karakterizasyonu için örnekler mTOR-S2448P, mTOR, p70S6K1, p70S6K1-T389-P, S6, S6-S235/236-P ve S6-S240/244-P, 4E-BP1, ve 4E-BP1-S65P'e özel antikorları ile analiz edilmişlerdir. Western Emdirimi deneylerinde β -aktin protein miktar tayini yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

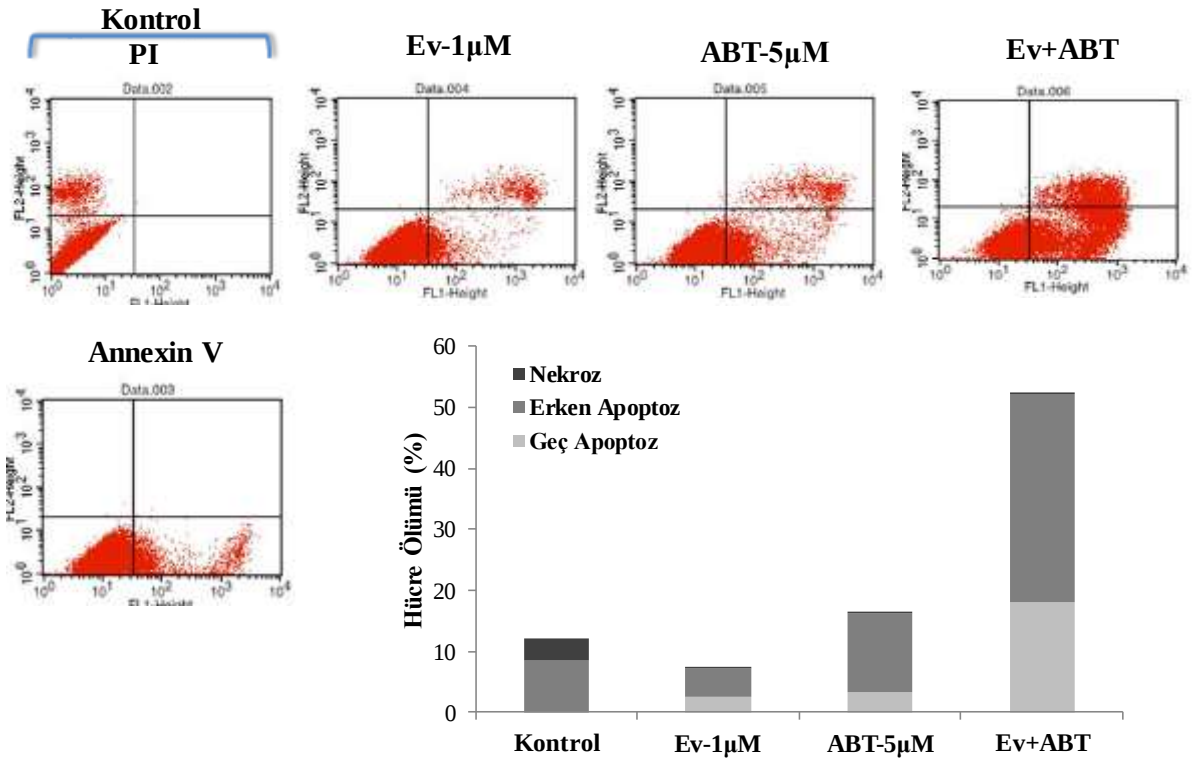


Şekil 30. Caki-1 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTOR yolağı üzerindeki etkisinin Western Emdirimi yöntemi le tespit edilmesi.

Caki-1 (Şekil 30) hücrelerinde 1 μ M Everolimus'un mTOR kinazının serin 2448'de gerçekleşen otofosforilasyonunu düşürdüğü ilaç muamelesi gören hücrelerde ise ilaç muamelesi görmeyen kontrol hücrelerine (0 μ M) kıyasla artırdığı görülmüştür. Everolimus muamelesine ek olarak Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun, bazal p70S6K protein ifadesini kontrol hücrelerine kıyasla düşürdüğü ve bu düşüşün p70S6K proteininin treonin 389'da fosfatlanmış türevinde de görüldüğü saptanmıştır. p70S6 kinazının hedef proteini olan S6 proteininin ifadesi ilaç muameleleri sonucunda Caki-1 hücrelerinde artışa yol açmıştır (Şekil 30). Aynı proteinin serin 235/236 ve 240/244'de fosfatlanmış aktif türevinin ifadesinde Everolimus veya ilaç kombinasyonu muamelesi sonunda anlamlı bir düşüş görülmüştür. mTOR sağkalım yolağının diğer bir hedef proteini olan 4E-BP1 proteinin serin 65 bölgesinde fosfatlanan türevinin ifadesi Everolimus muamelesi sonunda azalırken, ilaç kombinasyonunun artışa yol açtığı gözlemlenmiştir.

4.9 Everolimus ve ABT-737'nin hücre ölümüne etkisinin A-498 hücrelerinde tespit edilmesi

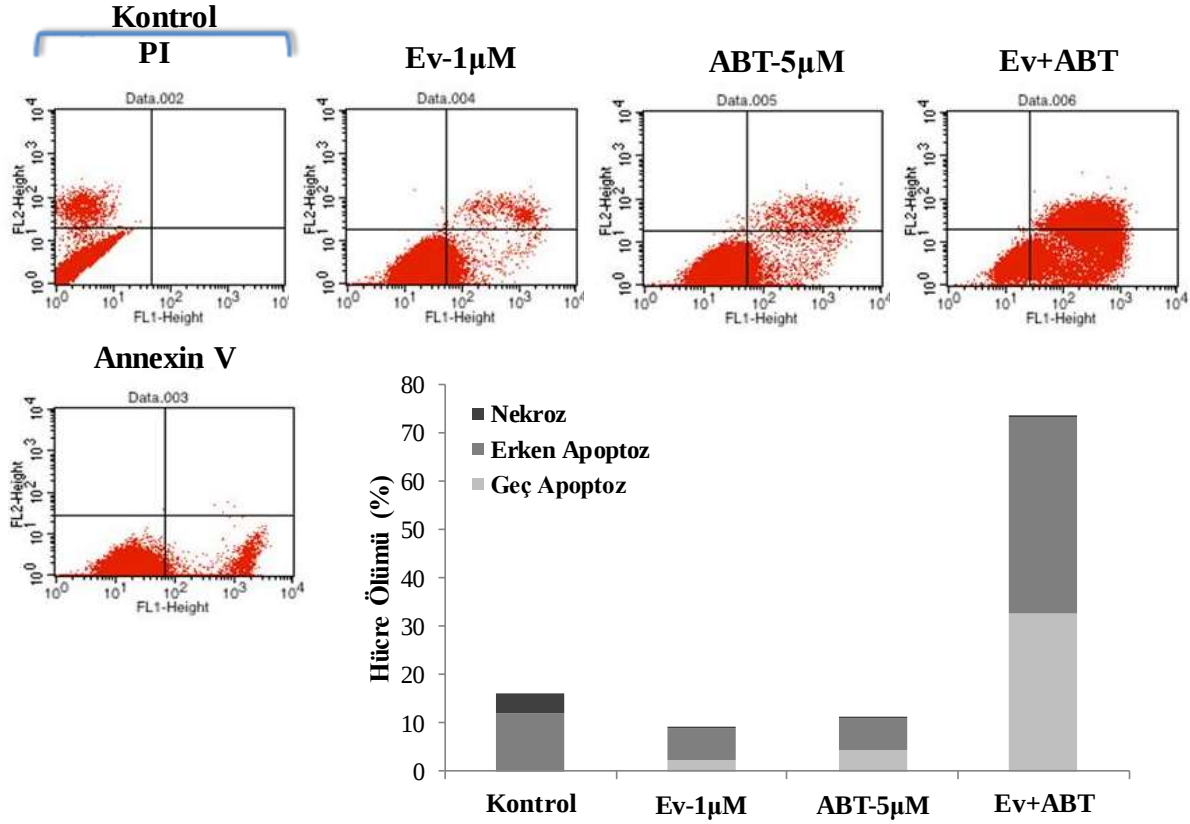
Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun A-498 BHK hücre canlılığında düşüşe yol açtığı WST-1 hücre canlılık yöntemiyle deneylerimizde gösterilmiştir. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre canlılığında sebep olduğu bu düşüşün hücre ölümüne bağlı olup olmadığı Annexin-V hücre ölüm kiti kullanılarak tespit edilmiştir. Deney düzeneği “Gereç ve Yöntem” kısmında Bölüm 3.5’de Annexin-V hücre ölüm testi başlığı altında açıklanmıştır.



Şekil 31. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi. PI ve Annexin V muamele görmemiş kontrol hücrelerinde sırası ile geç ve erken apoptozu tespit edilmesi için kullanılmıştır. A-498 hücreleri 24 saat süre ile 1µM Everolimus ve 5µM ABT-737 ilaç kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır.

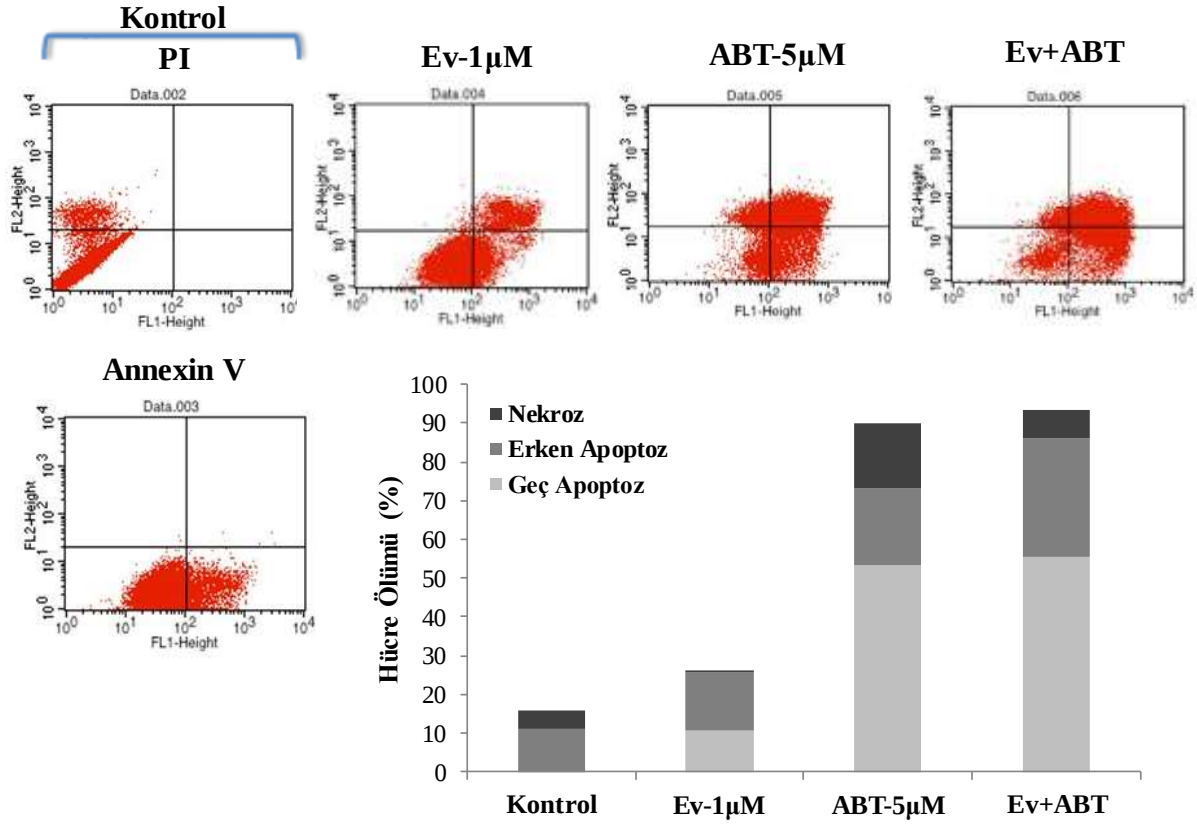
Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun 24 saatin sonunda A-498 hücre ölümünü tetikleyici etkisi Şekil 31’de gösterilmiştir. 1µM Everolimus ve 5µM ABT-737 konsantrasyonları tek başına A-498 hücrelerine 24 saat uygulandığında, erken ve geç apoptozu yol açmaktadır. Geç apoptoz oranı 1µM Everolimus uygulanan hücrelerde %16 oranında tespiti edilirken, bu oran 5µM ABT-737 ile muamele edilen hücrelerde %20 civarındadır. Everolimus ve ABT-737 ilaçları birlikte uygulandığında hücrelerin %40’ ı geç apoptozda bulunurken, yaklaşık olarak %60’ ı erken apoptoz devresindedir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, Everolimus ve ABT-

737 ilaç kombinasyonunun 24 saat muamele sonucunda hücrelerde ölüme yol açtığı gözlemlenmiştir.



Şekil 32. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi. PI ve Annexin V muamele görmemiş kontrol hücrelerinde sırası ile geç ve erken apoptozu tespit edilmesi için kullanılmıştır. A-498 hücreleri 48 saat süre ile 1μM Everolimus ve 5μM ABT-737 ilaç kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır.

Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu A-498 hücrelerinde 48 saat uygulandığında hücrelerin %60'ı erken apoptoz evresinde bulunurken, %40'ının geç apoptoz evresinde bulunduğu Şekil 32'de gösterilmiştir. 48 saat muamele sonunda Everolimus ve ABT-737'nin tek başlarına uygulandıklarında ise birbirleriyle paralel sonuçlar verdikleri gözlemlenmiş ve %6 erken apoptoz gözlemlenirken geç apoptoz safhasına geçen hücre yüzdesi 2 ila 4 olarak belirlenmiştir.



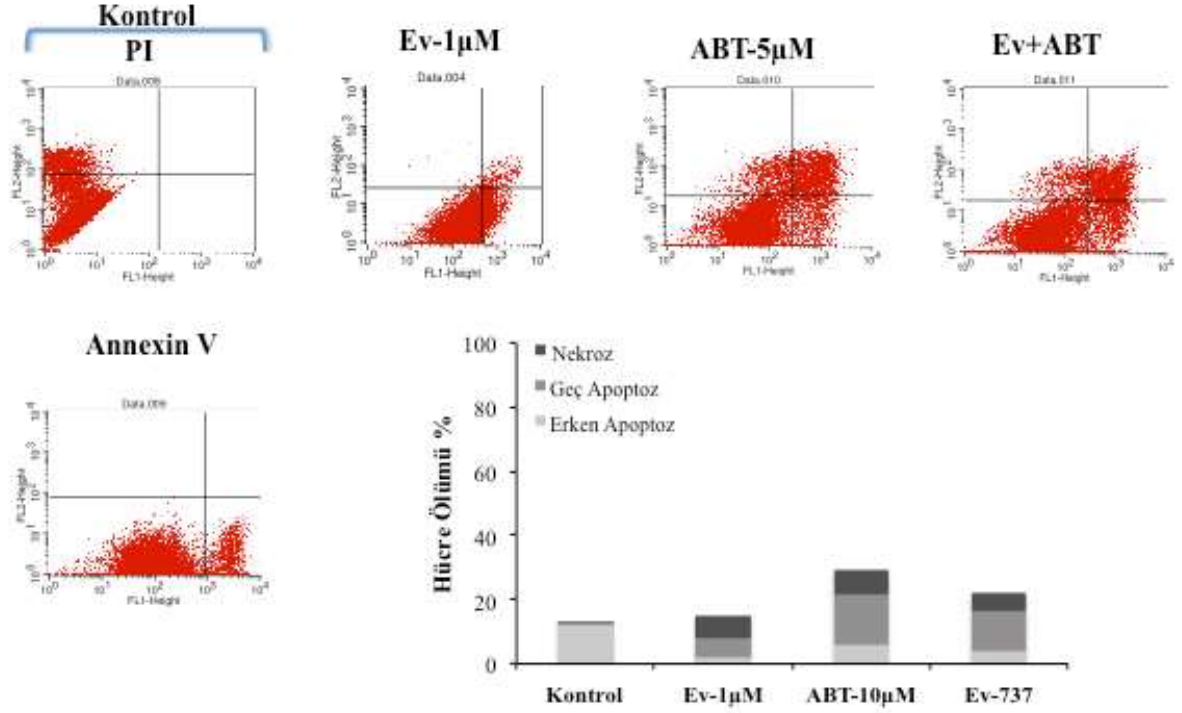
Şekil 33. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi. PI ve Annexin V muamele görmemiş kontrol hücrelerinde sırası ile geç ve erken apoptozu tespit edilmesi için kullanılmıştır. A-498 hücreleri 72 saat süre ile 1µM Everolimus ve 5µM ABT-737 ilaç kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır.

Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonun A-498 hücre ölümü üzerine etkisi 72 saat sonunda yukarıda bahsi geçen diğer zaman dilimlerine oranla farklılık gösterdiği Şekil 33'te gösterilmiştir. 72 saat sonunda hücre popülasyonunun büyük bir kısmı erken apoptoz evresinden geç apoptoz evresine geçiş yapmıştır. Kombine tedavi sonrasında tespit edilen erken apoptoz safhasında %31 hücre tespit edilirken geç apoptoz safhasında %55 hücre bulunmaktadır. Everolimus tatbiki A-498 hücre erken ölümünde %15 olarak tespit edilirken geç apoptoza uğrayan hücre yüzdesi 11' dir. ABT-737 muamelesi sonucunda erken apoptotik fazda %20 ve geç apoptotik fazda %53 hücre bulunmaktadır.

4.10 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonun metastatik Caki-1 hücre ölümü üzerine etkisi

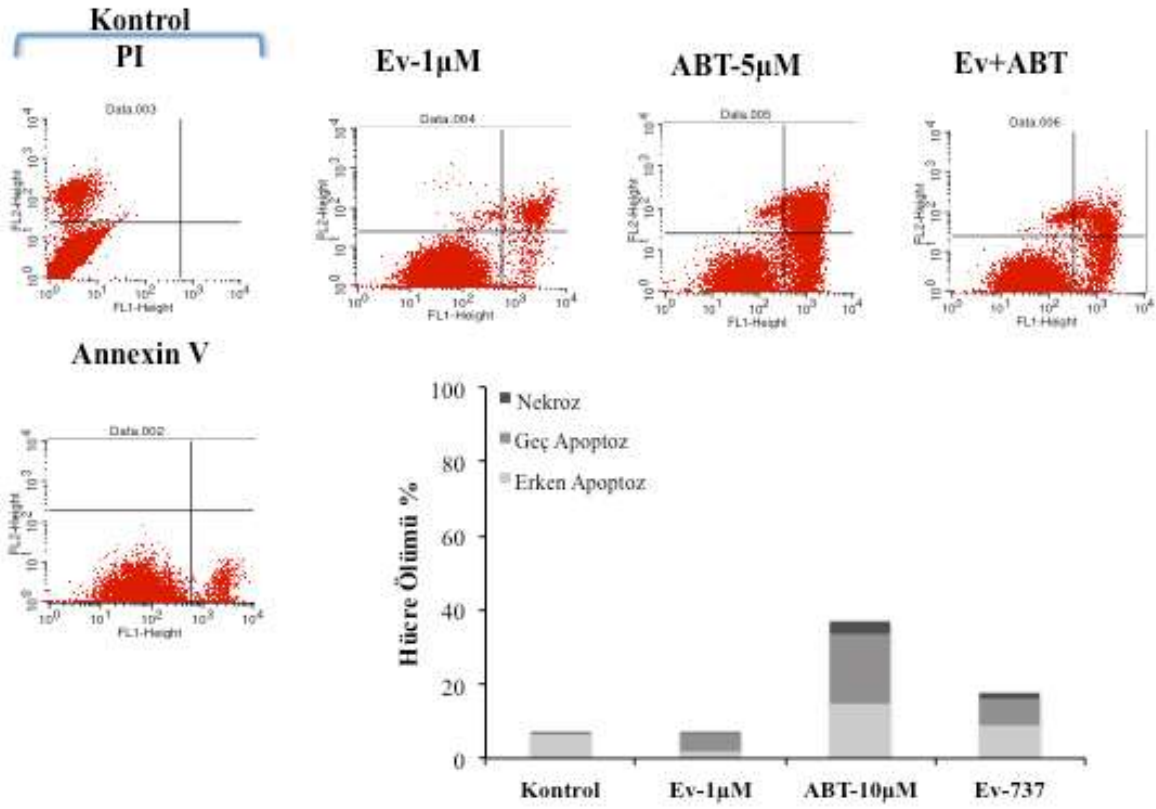
Primer bölge böbrek kanseri hücre hattı A-498 için elde ettiğimiz sonuçların sağlaması metastatik böbrek kanseri hücre hattı Caki-1 kullanılarak yapılmıştır. Caki-1 hücreleri üzerinde

kullanılan ilaç kombinasyonunun hücre canlılığında yol açtığı düşüşün hücre ölümünden kaynaklanıp kaynaklanmadığı Annexin-V metodu ile tespit edilmiştir (bkz. 3.5).

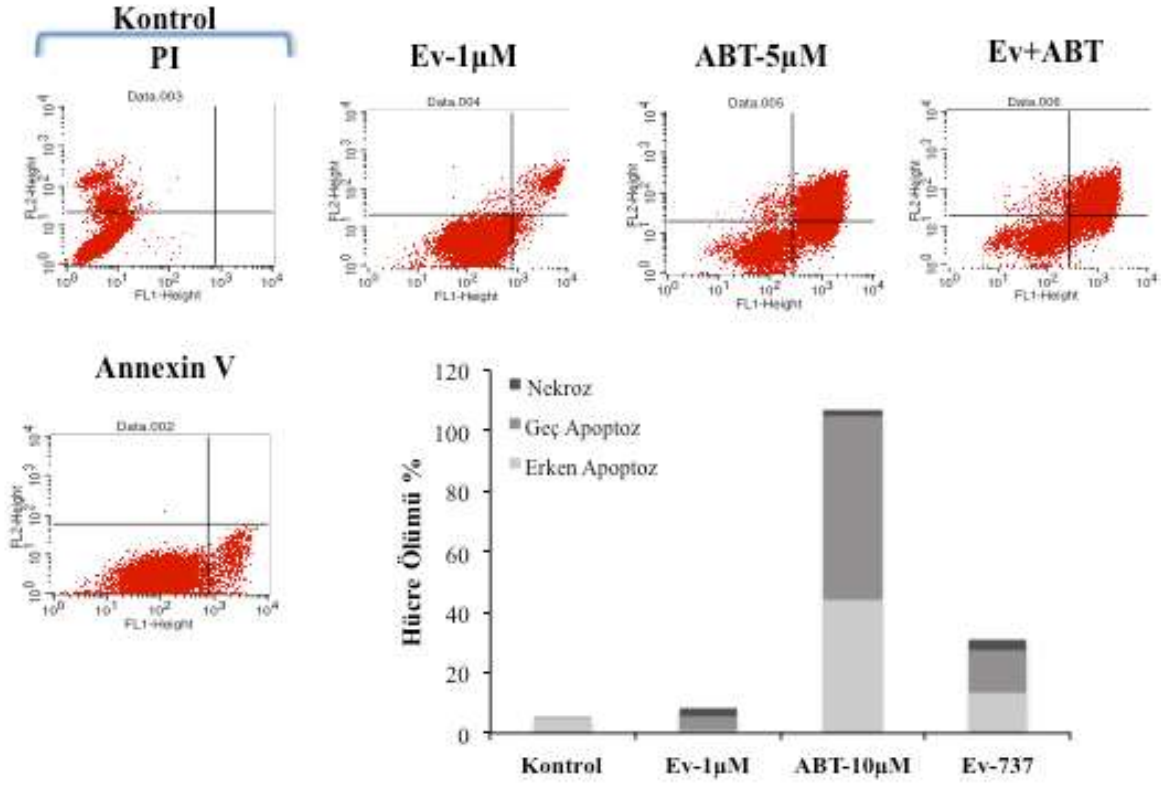


Şekil 34. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi. PI ve Annexin V muamele görmemiş kontrol hücrelerinde sırası ile geç ve erken apoptozu tespit edilmesi için kullanılmıştır. Caki-1 hücreleri 24 saat süre ile 1µM Everolimus ve 10µM ABT-737 ilaç kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır.

1µM Everolimus ve 10µM ABT-737 ile muamele edilen metastatik Caki-1 hücrelerinde kombinasyonun 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda hücre ölümüne yol açtığı tespit edilirken (Şekil 34, 35, 36), ABT-737'nin tek başına uygulandığında hücre ölümünde daha anlamlı artışa yol açtığı gözlemlenmiştir. Analiz sonucunda ilaç kombinasyonunun Caki-1 hücre hattında apoptozla bağlı hücre ölümüne sebebiyet verdiği tespit edilmişken metastatik BHK tedavisinde ABT-737 monoterapisinin de başarılı sonuç verebileceği kanısı doğmuştur.



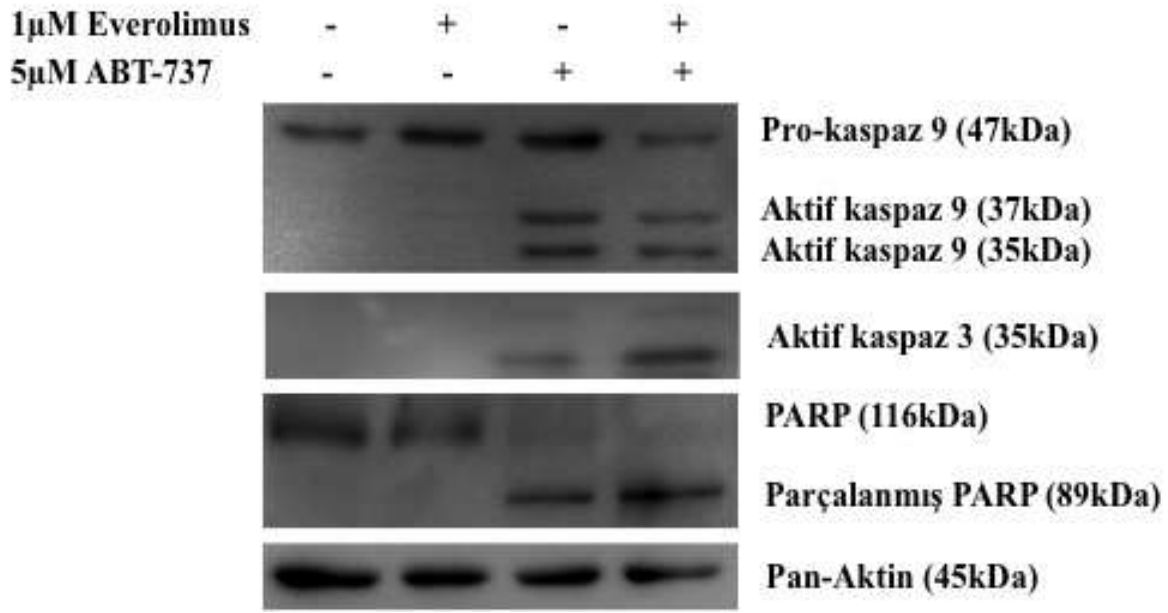
Şekil 35. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi. PI ve Annexin V muamele görmemiş kontrol hücrelerinde sırası ile geç ve erken apoptozu tespit edilmesi için kullanılmıştır. Caki-1 hücreleri 48 saat süre ile 1µM Everolimus ve 10µM ABT-737 ilaç kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır.



Şekil 36. Everolimus ve ABT-737 kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkisinin Annexin-V hücre ölüm kitiyle tespit edilmesi. PI ve Annexin V muamele görmemiş kontrol hücrelerinde sırası ile geç ve erken apoptozu tespit edilmesi için kullanılmıştır. Caki-1 hücreleri 72 saat süre ile 1µM Everolimus ve 10µM ABT-737 ilaç kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır.

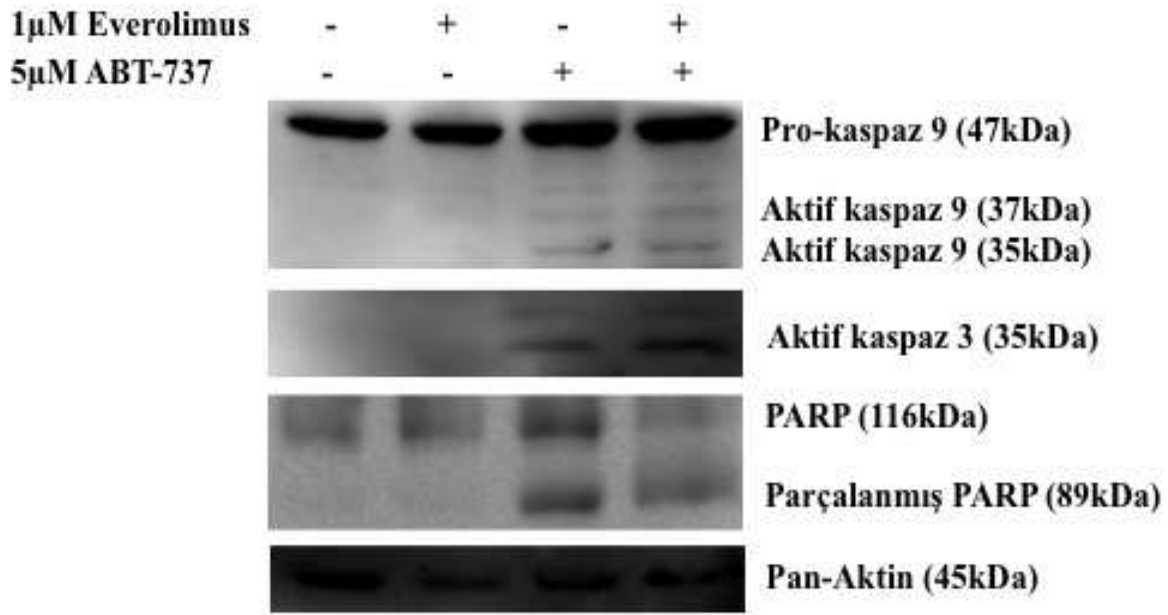
4.11 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun A-498 ve Caki-1 apoptoz moleküler mekanizmasına etkisinin tespit edilmesi

Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun A-498 ve Caki-1 hücrelerinde yol açtığı ölümün moleküler mekanizmasını anlamak için apoptoz yolağında rol alan kaspaz proteinlerinin ifadelerine Western Emdirimi (bknz. 3.6) ile bakılmıştır. Western Emdirimi tekniği ile ilaç muamelesi sonucunda aktif kaspaz 9, parçalanmış kaspaz 3 ve PARP protein seviyelerindeki değişim tespit edilmiştir. Western Emdirimi deneylerinde β -Aktin ve pan-aktin proteinleri miktar tayini için yükleme kontrolü olarak kullanılmışlardır.



Şekil 37. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun kaspaz yolağı üzerindeki etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

Raporumuzun literatür özetinde açıklandığı üzere hücre ölümü esnasında pro-apoptotik Bax/Bak proteinleri mitokondri çevresinde bir kanal oluştururlar. Bu kanaldan sitoplazmaya salgılanan sitokrom c ile etkileşime giren APAF1 ve pro-kaspaz 9 proteinleri “apoptozom” kompleksini oluşturarak pro-kaspaz 9’ u aktive ederler. Bu sayede aktive olan kaspaz-9 tarafından aktivasyonu gerçekleştirilen cellat kaspazları (pro-kaspaz 3, 6, 7) apoptozu gerçekleştirir (Corrano vd. 2003, Bratton vd. 2010). Annexin yöntemi ile hücre ölümünü gösterdiğimiz sonuçlara istinaden ABT-737’nin tek başına ve Everolimus ile kombinasyonunun aktif kaspaz 9 proteininin ifadesinde artışa yol açtığı Şekil 37’de gösterilmiştir. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu, aktif kaspaz 9’un efektör proteini olan pro-kaspaz 3’ün aktivasyonunu sağlamış ve aktif kaspaz 3 seviyesinde artış gözlemlenmiştir. PARP proteinin parçalanmış hali aktif apoptoz mekanizmasının bir diğer indikatörüdür. ABT-737 ve ilaç kombinasyonunun PARP proteinin parçalanmasına da yol açtığının gözlemlenmesi üzerine kombinasyon tedavisinin hücre ölümüne sebebiyet verdiği kanıtlanmıştır (Şekil 37).

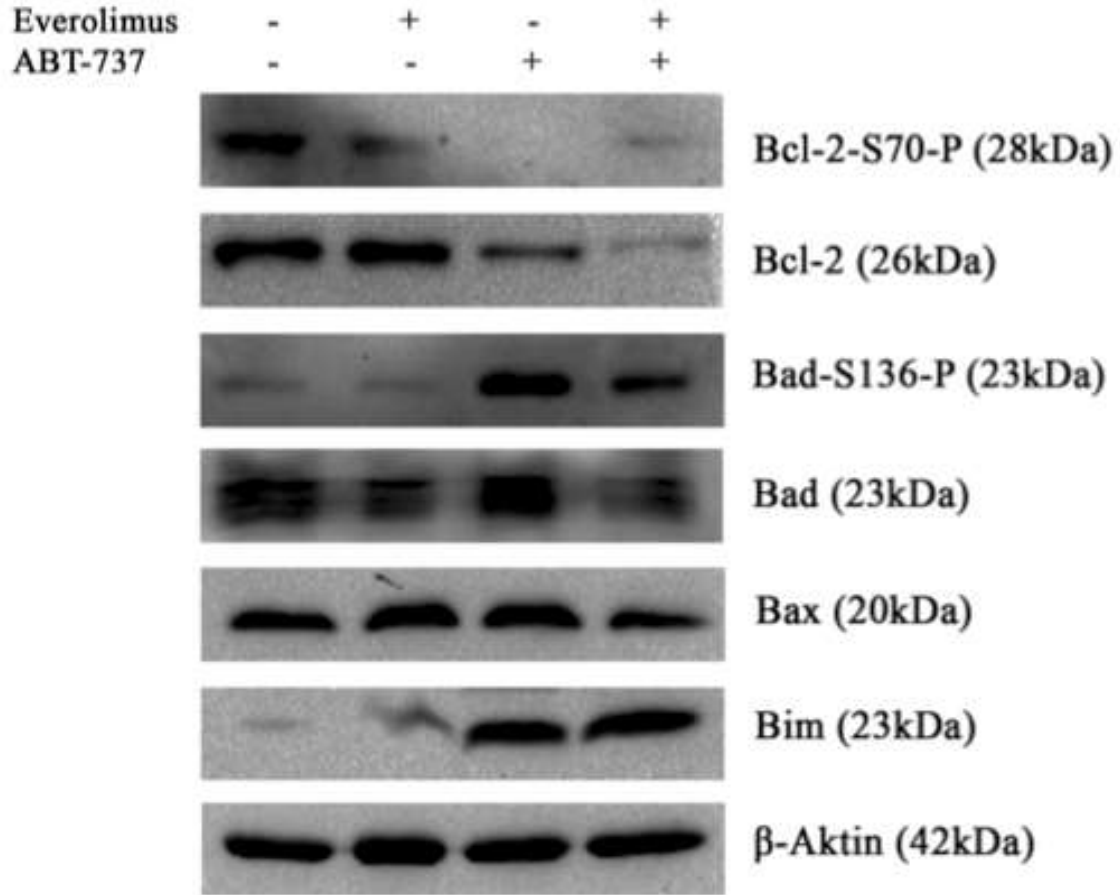


Şekil 38. Caki-1 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun kaspaz yolağı üzerindeki etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

Benzer şekilde Caki-1 hücrelerinde ABT-737 ve kombine uygulamanın sonucunda aktif kaspaz 9 ve kaspaz 3 seviyeleri artmış ve PARP parçalanması tespit edilmiştir (Şekil 38).

4.12 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun Bcl-2 güdümlü apoptoz yolağı üzerindeki etkisinin analiz edilmesi

Proje başvurmuzda belirtildiği üzere Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun etki mekanizması en yüksek Bcl-2 ifadesi gösteren ve ilaç muamelesine en iyi cevap veren bir BHK hücre hattı seçilerek araştırılmıştır. A-498 hücreleri Caki-1 hücrelerine kıyasla daha yüksek Bcl-2 protein seviyesine sahip olduğu ve kombinasyon uygulamasında monoterapilere kıyasla daha yüksek apoptoza bağlı hücre ölümünü desteklediği için moleküler yolak çalışmalarında model hücre hattı olarak seçilmiştir. İlaç kombinasyonunun 24 saat sonunda A-498 hücrelerinde Bcl-2 protein ailesi üyelerinin Bcl-2, Bcl-2-S70-P, Bax, Bim, Bcl-xL, Mcl-1, Puma ve Noxa protein ifadeleri üzerindeki etkisi Western Emdirimi tekniği ile analiz edilmiştir (Bölüm 3.6). Deneylerde β-Aktin ve pan-Aktin proteinleri miktar tayini için yükleme kontrolü olarak kullanılmışlardır.



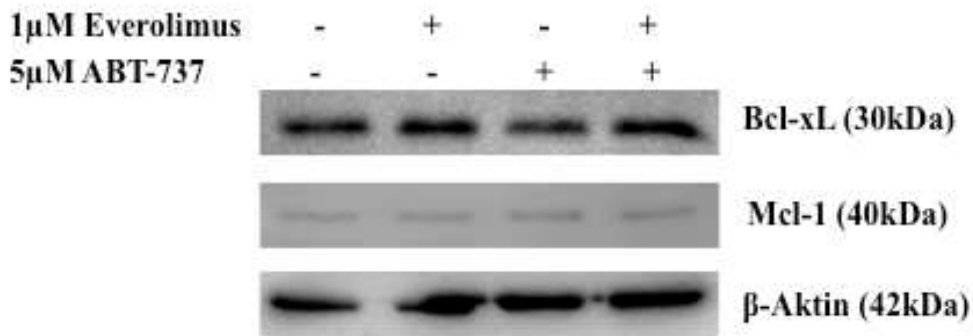
Şekil 39. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun Bcl-2 protein ailesi üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

Şekil 39'da A-498 hücrelerine uygulanan ilaç kombinasyonu sonucunda anti- ve pro-apoptotik Bcl-2 protein ifadelerindeki değişim Western Emdirimi yöntemiyle gösterilmiştir. Everolimus uygulaması sonucunda Bcl-2 protein ifadesinde %40 oranında artış gözlemlenmiştir. Bcl-2'nin BH3 bölgesini hedef alarak pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesine mensup diğer üyelerle etkileşime geçmesini engelleyen ABT-737 ilacı tek başına uygulandığında; A-498 hücrelerindeki Bcl-2 protein seviyesinde %75 oranında düşüş görülmüştür. Her iki ilaç beraber uygulandığında ise Bcl-2 ifadesinde %80 oranında azalma tespit edilmiştir. Bcl-2'de görülen bu düşüş ABT-737 muamelesi sonrası hücre içerisinde meydana gelen oksidatif stresin Bcl-2 proteininin proteozomlarda yıkımına neden olması ile açıklanabilir (Azad vd. 2008). Bu yıkıma paralel olarak aynı şekilde ABT-737 veya kombinasyon muamelesi sonunda Bcl-2 proteininin esnek döngüsünde (flexible loop) bulunan serin 70'de fosfatlanan türevinin ifadesinde de düşüş gözlemlenmiştir. Bcl-2 proteininin esnek döngüsünde bulunan amino asitlerinde gerçekleşen fosfatlanmanın, Bcl-2'nin aynı ailedeki diğer proteinlerden olan Bax ve Bim ile

etkileşimi azalttığı ve bu sayede apoptoz mekanizmasını önleyemediği bilinmektedir (Shitashige vd. 2001, Bassik vd. 2004). Serin 70'de fosfatlanan Bcl-2 türevinde görülen düşüşe rağmen apoptoz mekanizmasının aktif olması, FKBP38 proteininin fosfatlanmanın gerçekleştiği esnek bölgeye bağlanarak fosfatlanmayı engellenmesi ile açıklanabilir (Kang vd. 2005).

Bcl-2 ailesinin bir diğer üyesi olan ve sadece BH3 bölgesine sahip olan Bim proteini, Bax/Bak proteinlerine bağlanarak onların mitokondri üzerinde kanal oluşturmalarını mümkün kılar ve bu sayede apoptozu indükler (Cory vd. 2002, Letai vd. 2002). Bu sebeple Bim protein ifadesinde görülen artış aktif apoptozla ilişkilendirilebilmektedir. Everolimus ilacı tek başına uygulandığında Bim proteininin ifadesine etki etmezken, ABT-737 ile birlikte A-498 hücrelerine verildiğinde Bim protein ifadesinde kontrol hücrelerine oranla %100' lük bir artış görülmüştür (Şekil 39). Bu sonuçta ABT-737 ve kombinasyon muamelesi sonucunda görülen hücre ölümünü anlamlı kılmaktadır.

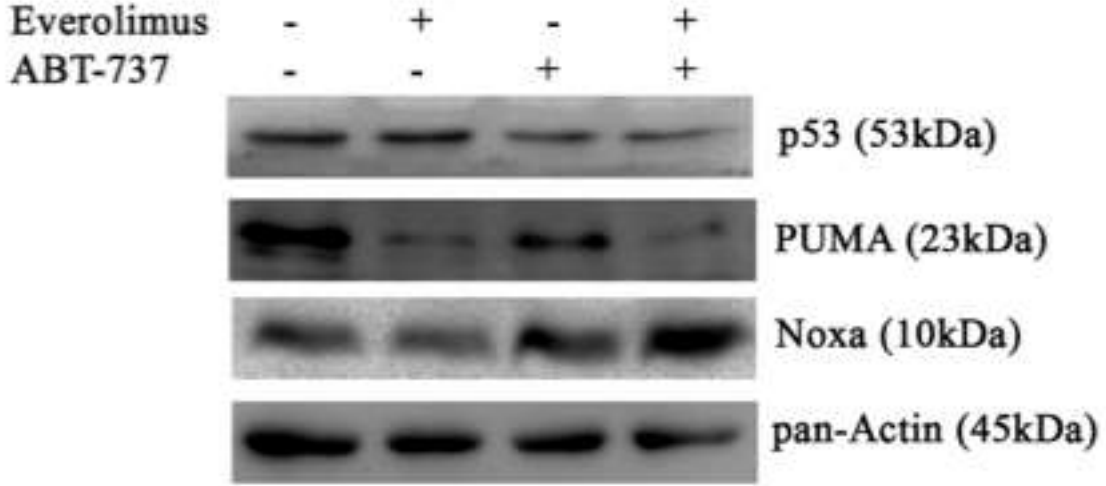
mTORC2 kompleksi içinde yer alan mTOR kinazının AKT'yi serin 473'de fosfatlaması, AKT'nin apoptozu teşvik eden BAD proteinini serin 136 bölgesinde fosfatlamasına neden olur (Datte vd. 1997, Copp vd. 2009). Bu sayede apoptotik yolağın inhibasyonu gerçekleşirken sağkalım yolağı harekete geçer. İlaç kombinasyonu sonucunda AKT'nin serin 473'de fosfatlanmış türevinde görülen düşüşe rağmen (Şekil 29) AKT'nin BAD proteinini serin 136'da fosfatladığı görülmüştür. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre ölümüne yol açması, serin 136'da fosfatlanan BAD proteininin apoptoz mekanizmasını durdurmak için yeterli olmadığını göstermektedir.



Şekil 40. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesi üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun Bcl-2 protein ailesinin diğer üyelerinden olan anti-apoptotik Bcl-xL ve Mcl-1 proteinlerinin ifadelerinde değişime yol açıp açmadığı Western Emdirimi yöntemiyle tespit edilmiş ve Şekil 40'da gösterilmiştir. A-498 hücrelerinde Everolimus ilaç uygulamasının Bcl-xL ve Mcl-1 proteinlerinin ifadelerinde bir değişime yol açmadığı

görülmüştür. ABT-737 tek başına veya Everolimus ile birlikte uygulandığında Bcl-xL protein seviyesinde sırasıyla %30 ve %10' luk bir düşüşe yol açarken, bu ilaç uygulamaları Mcl-1 protein seviyesini etkilememiştir.



Şekil 41. A-498 hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun p53, Puma ve Noxa proteinleri üzerinde olan etkisinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

Tek bir BH3 kısmına sahip Bcl-2 pro-apoptotik proteinlerinden olan Puma ve Noxa proteinleri anti-apoptotik Bcl-2 protein üyelerine bağlanarak onların Bax/Bak ile kompleks kurmalarına engel olurlar (Ghiotto vd. 2010, Bouillet vd. 2002). Bu sayede özgür kalan Bax/Bak proteinleri apoptozun başlamasını sağlarlar. Bir transkripsiyon faktörü olan p53 proteinini, Puma ve Noxa'nın transkripsiyonunu regüle ederek apoptozun başlamasına yardımcı olur (Johnstone vd.). Özellikle sitoplazmada bulunan p53 proteinin tek bir BH3 kısmına sahip Bcl-2 ailesi üyesi gibi davranarak Bax ve/ veya Bak'ı aktive edebildiği ve bu sayede mitokondri dış çeperindeki geçirgenliğe katkı sağladığı literatürde gösterilmiştir (Green ve Kroemer, 2009). Bu bağlamda p53, Puma ve Noxa proteinlerinin ifadelerindeki değişim apoptoz mekanizmasının aktivasyonu ile ilişkilendirilebilir.

Şekil 41'de görüleceği üzere, ABT-737 tek başına ve Everolimus ile birlikte uygulandığında kontrol hücrelerine ve Everolimus'un tek başına uygulandığı hücelere kıyasla p53 proteininin ifadesinde %60'lık bir düşüşe yol açmıştır. Everolimus ilaç uygulamasının Puma seviyesinde %70 düşüşe yol açarken, Everolimus ilacı ABT-737 ile birlikte uygulandığında ise protein seviyesi %85 oranında azalmıştır. ABT-737 ilacının tek başına kullanılması ise protein seviyesinde sadece %50'lik bir düşüşe yol açmıştır. Puma protein seviyesinde görülen düşüş, ABT-737 varlığında ifadesi düşen p53 proteini ile paralellik göstermektedir.

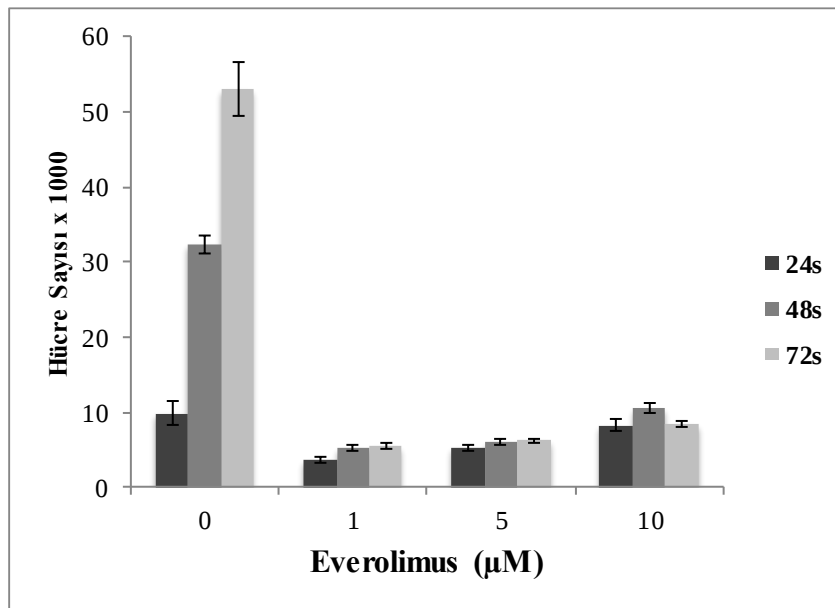
Yine Şekil 41'de görüleceği üzere ilaç muamelesine maruz kalmayan hücreler ile Everolimus ile muamele edilen hücrelerde rastlanan Noxa protein ifadesi, ABT-737 tek başına ya da

Everolimus ile beraber uygulandığında artış göstermiştir. Noxa'nın da transkripsiyonunun regülasyonundan sorumlu olan p53 proteininde gözlemlenen düşüş Noxa'nın protein ifadesinde bir değişikliğe yol açmamıştır. Noxa'nın Bcl-2 ailesi proteinlerinden sadece Mcl-1 ile etkileşime girmesi ve ABT-737 ilacının Mcl-1 proteinini baskılamamasını elde edilen sonucu anlamlı kılmaktadır (Chen vd. 2005, Kuwana vd. 2005).

4.13 Everolimus ve ABT-737 kemoterapötik ilaçlarının RenCa hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Projemiz kapsamında, Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu için prelinik deneyleri yapabilmek için Bcl-2 proteinini çokça ifade RenCa hücreleri kullanılarak yapılacak böbrek kanseri in-vivo modeli oluşturulmadan önce RenCa hücrelerinde Everolimus ve ABT-737 ilaçlarının en düşük efektif dozlarını bulmak için WST-1 hücre canlılık testi yapılmıştır .

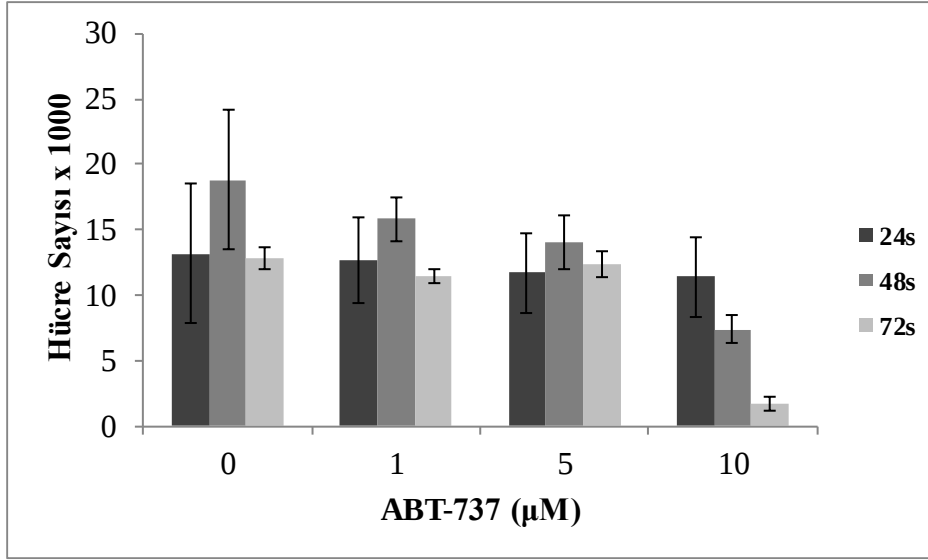
Deney düzeneği “Gereç ve Yöntem” kısmında Bölüm 3.3’de WST-1 Hücre Canlılığı Testi başlığı altında anlatılmıştır.



Şekil 42. RenCa hücre modelindeki farklı dozlardaki Everolimus'un hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.

1, 5 ve 10µM Everolimus ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen RenCa hücrelerinin WST-1 hücre canlılık testi sonucunda izlediği profil Şekil 42’de gösterilmiştir. 1, 5 ve 10µM Everolimus muamelesi, kontrol hücrelerine kıyasla (0µM) hücre canlılığında istatistiksel olarak düşüş göstermişlerdir. 1µM Everolimus muamelesi 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde hücre canlılığında %60 düşüşe sebep olmuştur. Bu sonuca paralel olarak 72 saat inkübasyon sonucunda hücreler canlılıklarını aynı oranda düşürmüşlerdir. 5µm Everolimus muamelesi sonunda 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde, 1µM Everolimus muamelesi sonucuna kıyasla, hücre

canlılığında istatistiksel olarak anlam ifade etmeyen bir artış gözlemlenmiş ve bu sonucun 10µM Everolimus için de hemen hemen aynı kaldığı tespit edilmiştir.



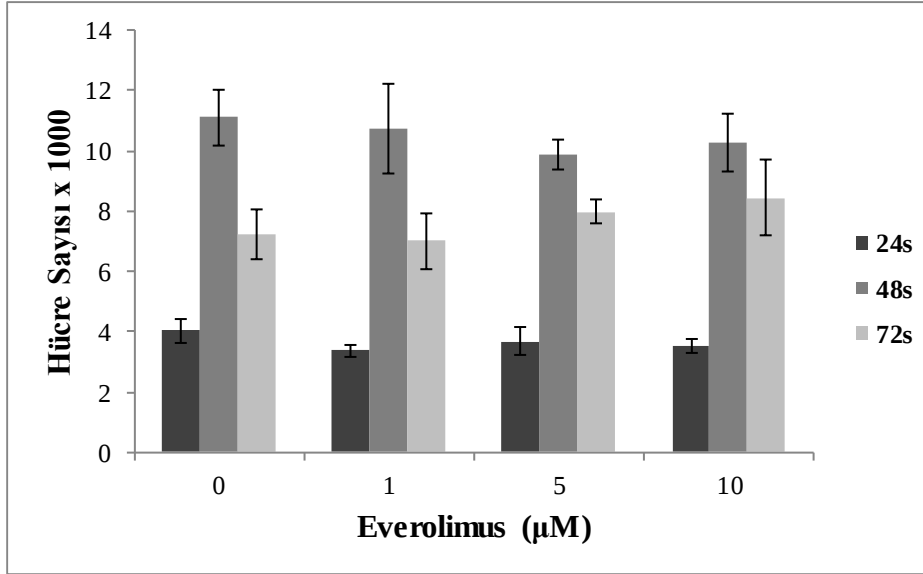
Şekil 43. RenCa hücre modelindeki farklı dozlardaki ABT-737'nin hücre canlılığına etkisinin WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi.

Şekil 43'de RenCa hücrelerinin 1, 5, ve 10µM ABT-737' e karşı 24, 48 ve 72 saat muamelesine verdiği cevap gösterilmiştir. 1µM ABT-737 ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiş RenCa hücreleri ilaç muamelesi görmemiş kontrol (0µM) hücrelerine benzer şekilde canlılıklarını korumuşlardır. 1µM ABT-737'nin hücre canlılığına etkisine paralel olarak 5µM ABT-737 konsantrasyonu da hücre canlılığında herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. Hücre canlılığında görülen deney düzeneğinde kullanılan en yüksek doz olan 10µM ABT-737'nin 24 saat muamele sonucunda hücre canlılığını düşürmezken, 48 saat inkübasyon sonunda hücre sayısında %20 azalma tespit edilmiştir. %80 düşüş hücrelerin 10µM ABT-737 ile 72 saat muamele edilmesinin sonucunda gözlemlenmiştir.

4.14 Everolimus'a dirençli RenCa hücrelerinin geliştirilmesi

RenCa hücrelerinin 1, 5 ve 10µM Everolimus ile 24, 48 ve 72 saat muamelesinin sonunda uygulanan WST-1 hücre canlılık testi sonucuna göre, bu hücrelerin Everolimus'a karşı direnç göstermediği tespit edilmiştir. Everolimus'a direnç gösteren BHK hücre modelinde, anti-apoptotik Bcl-2 proteininin ABT-737 ile kombinasyonunun hücrelerin kemoterapi ve radyoterapiye olan direncini kırmak amacı ile kullanılması projemizin hipotezini oluşturmaktadır. Bu hipotezimi araştırabilmek için in-vivo modelde kullanılmak üzere RenCa hücrelerinin Everolimus'a karşı direnç göstermesi gerekmektedir. Bu sebeple RenCa hücrelerinin in-vivo deneylerinde kullanılmak üzere uygun hale getirilmesi için Everolimus

dirençli RenCa hücrelerinin geliştirilmiştir (Bölüm 3.9). Hücrelerin Everolimus'a karşı direnç geliştirip geliştirmediği WST-1 hücre canlılık testi ile tespit edilmiştir (bkz. 3.3).

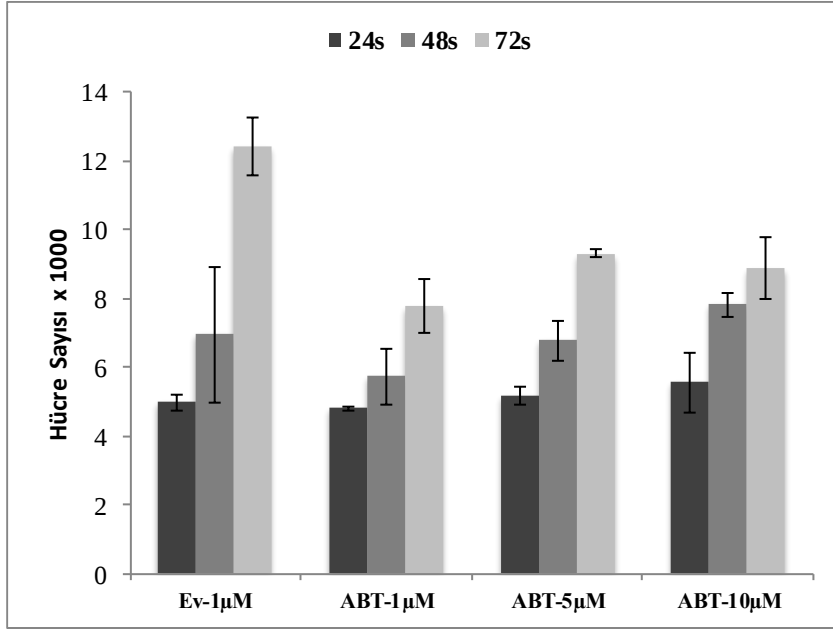


Şekil 44. erRenCa hücrelerin Everolimus'a direnç kazanmasının WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmesi. erRenCa hücreleri farklı dozlardaki Everolimus ile muamele görmüş ve hücre canlılığı 24, 48 ve 72 saat zaman dilimlerinde WST-1 testi kullanılarak ölçülmüştür.

Şekil 44'de gözlemleneceği üzere 1,5 ve 10µM Everolimus ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilen RenCa hücreleri, ilaç muamelesi görmeyen (0µM) kontrol hücreleriyle paralel olarak çoğalmaya devam etmişlerdir. Uygulanan Everolimus dozlarının Şekil 44'de gösterilen sonuçlarla karşılaştırıldığında hücre canlılığında herhangi bir değişikliğe yol açmaması, RenCa hücrelerinin Everolimus'a karşı direnç kazandığını göstermektedir.

4.15 Everolimus ve ABT-737 kemoterapötik ilaçlarının erRenCa hücre canlılığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi

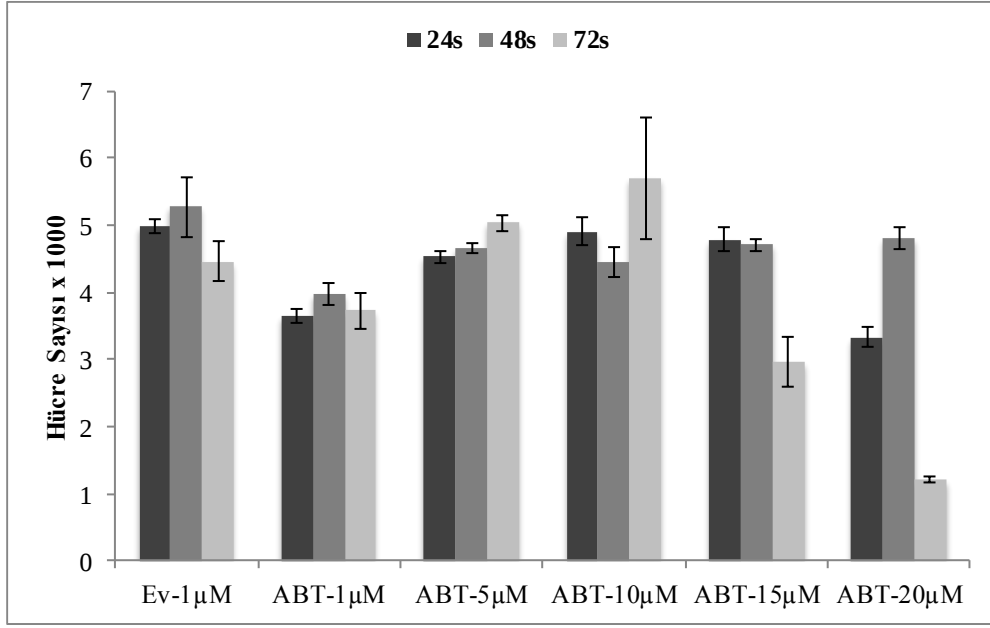
Bir önceki deneyde Everolimus'a karşı direnç kazandığı gösterilen RenCa hücrelerini in-vivo deneylerde kullanmadan önce bu hücreler üzerinde kullanılabilecek en uygun Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonu için gerekli olan doz belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda Everolimus'a dirençli RenCa (erRenCa) hücreleri farklı ABT-737 konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat süresince muamele edilmişler ve bu muamelelerin erRenCa hücre canlılığına etkisi WST-1 hücre canlılık testi (Bölüm 3.3) ile gösterilmiştir.



Şekil 45. erRenCa hücrelerin ABT-737 muamelesi sonucunda hücre canlılığının WST-1 testi ile belirlenmesi.

İlaç muamelesi görmeyen (Ev-1µM) kontrol hücrelerine paralel olarak 1µM Everolimus beraberinde 1µM ABT-737 ilaç kombinasyonu 24 ve 48 saat dilimleri için hücre canlılığında herhangi bir değişikliğe yol açmazken, 72 saat sonunda uygulanan bu ilaç kombinasyonu hücre proliferasyonunda sadece %25 düşüşe sebebiyet vermiştir (Şekil 45). Everolimus ile beraber uygulanan ABT-737 konsantrasyonunun 5 ve 10µM'a kadar çıkarılması hücre canlılığında bir düşüşe sebebiyet vermemiştir.

RenCa hücrelerinin diğer BHK hatlarına oranla daha yüksek Bcl-2 ifade ettiği göz önünde bulundurularak (Şekil 1) erRenCa hücrelerinin 10µM'dan daha yüksek ABT-737 konsantrasyonu ile muamele edilmelerine karar verilmiştir. Literatürde ABT-737 için kullanılan maksimum konsantrasyonun 50µM olduğu tespit edilmiş (Zall vd., 2010), ancak bu yüksek dozajın hayvan deneylerinde toksisiteye mahal vereceği çekincesi ile erRenCa hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat dilimlerinde 10, 15 ve 20 µM ABT-737 ile muamele edilmelerine karar verilmiştir.

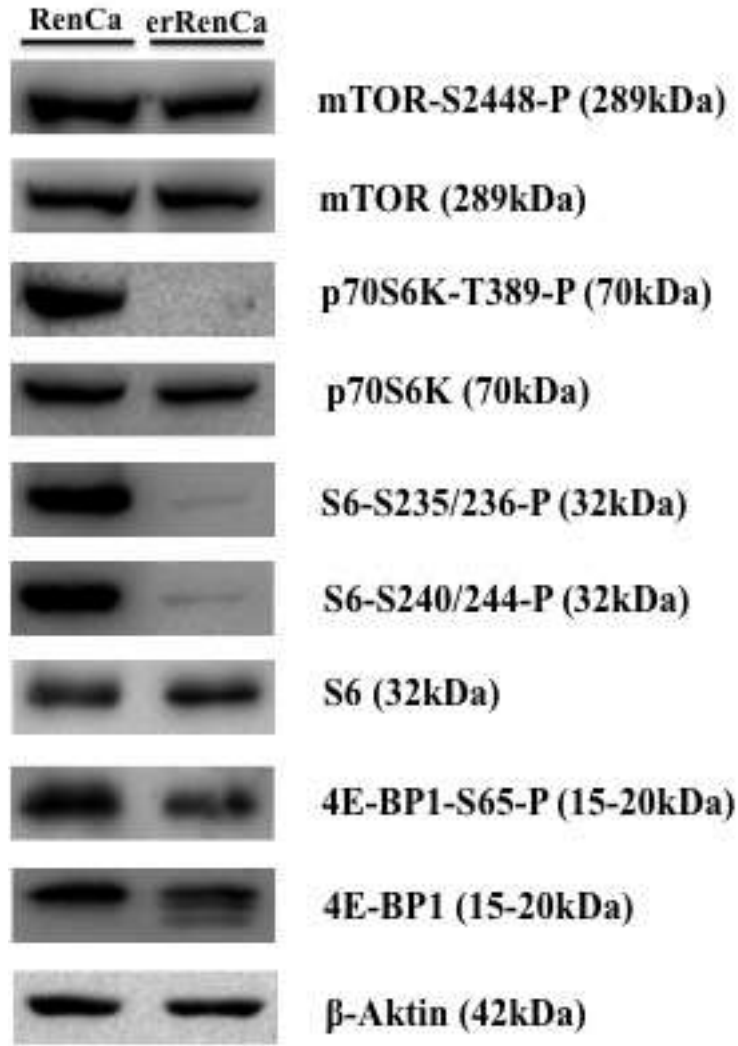


Şekil 46. erRenCa hücrelerin yüksek konsantrasyonlarda ABT-737 muamelesi sonucunda hücre canlılığının WST-1 testi ile belirlenmesi.

İlaç muamelesi görmeyen (Ev-1µM) kontrol hücrelerine paralel olarak 1µM Everolimus beraberinde 1µM, 5 µM ve 10 µM ABT-737 ilaç kombinasyonu 24, 48 ve 72 saat dilimleri için hücre canlılığında herhangi bir değişikliğe yol açmazken, 15 ve 20 µM ABT-737 ilaç kombinasyonu 72 saat sonunda hücre canlılığında sırayla ile %40 ve %70 düşüşe sebebiyet vermiştir (Şekil 46). Yapılan bu öncül deneylerimizin ışığında erRenCa hücrelerinin Balb-c modelinde kullanılabilecekleri kanısına varılmıştır.

4.16 RenCa ve erRenCa hücre modellerinde mTOR yolağının incelenmesi

İn vivo deneylerde kullanılmak üzere tarafımızdan Everolimus'a karşı dirençli hale getirilen RenCa (erRenCa) hücrelerinde, ilaç direncinin mTOR sağkalım yolağına olan etkisi bu yolda görev alan proteinlerin ifadelerine Western Emdirimi yöntemi (Bölüm 3.6) kullanılarak bakılmıştır. mTOR yolağı mTOR, mTOR-2448-P, p70S6K, p70S6K-T389-P, S6, S6-S235/236-P, S6-S240/244-P, 4E-BP1, 4E-BP1-S65-P'a özel antikorlar ile analiz edilmiştir. Western Emdirimi deneylerinde β-Aktin proteini miktar tayini için yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

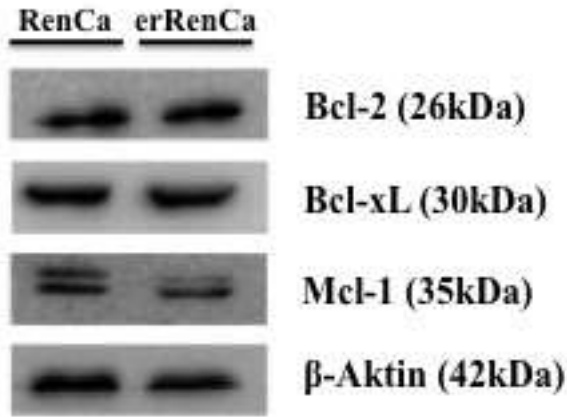


Şekil 47. RenCa ve erRenCa hücrelerinde mTOR yolağında görev alan protein ifadelerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespiti.

RenCa hücreleriyle kıyaslandığında erRenCa hücrelerinde mTOR kinazının serin 2448'de gerçekleşen otofosforilasyonunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 47). Buna karşın erRenCa hücrelerinde mTOR kinazı hedef proteini olan p70S6K'nın treonin 389'da fosfatlanmasında görülen düşüş p70S6 kinazının kendi hedef proteini olan S6 protein kinazını serin 235/236 ve serin 240/244 bölgelerinde fosfatlayamamasına sebebiyet vermiştir. Aynı şekilde erRenCa hücrelerinde RenCa hücreleri ile kıyaslandığında mTOR kinazının bir diğer hedef proteini olan 4E-BP1 proteinin serin 65 bölgesinde gerçekleşen fosfatlanmasında düşüş gözlemlenmiştir. Şekil 47'de gösterilen veriler göz önüne alındığında hücre canlılık testleri ile Everolimus'a karşı dirençli olduğu kanıtlanan erRenCa hücrelerinde (bkz. 4.14) mTOR yolağının baskılandığı görülmüştür. Hücrelerin bu durumdan kaçmak için alternatif hücre sağkalım ve hücre büyüme yollarına yöneldikleri düşünülmüştür.

4.17 RenCa ve erRenCa hücre modellerinde anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin incelenmesi

erRenCa hücrelerinin mTOR yolağının baskılandığı halde çoğalabilmesinin anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ifadelerindeki artış ile açıklanabileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda RenCa ve erRenCa hücrelerinde Everolimus ilaç direncinin etkisini incelemek için bu ailede yer alan Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 proteinlerinin ifadelerine Western Emdirimi yöntemi ile bakılmıştır. Western Emdirimi deneylerinde β -Aktin proteini miktar tayini için yükleme kontrolü olarak kullanılmışlardır.



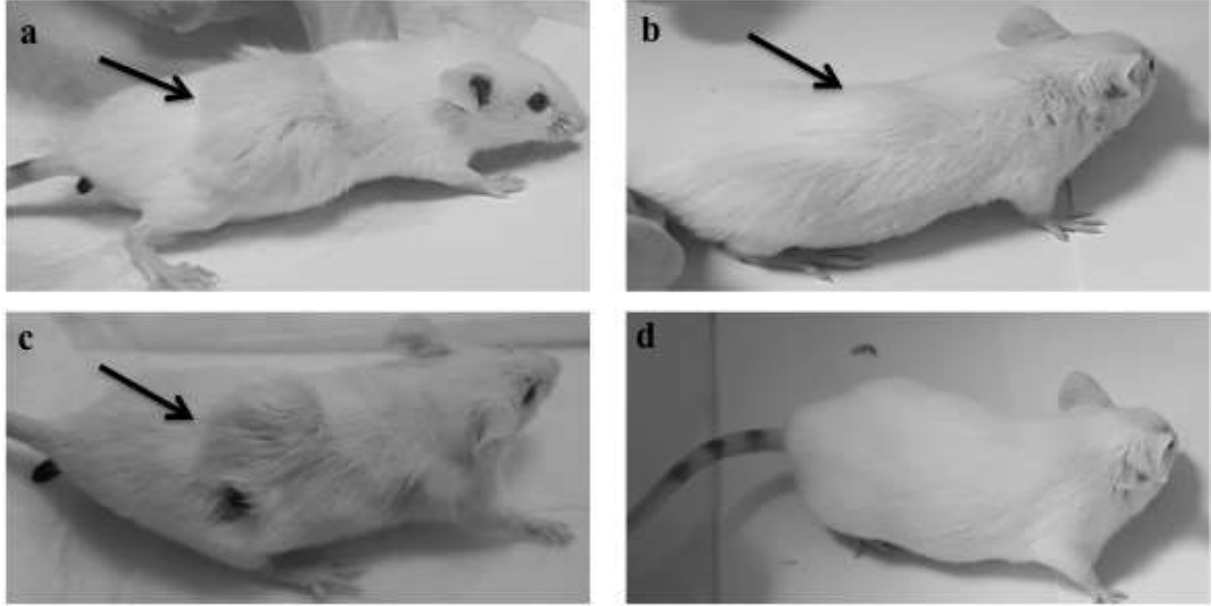
Şekil 48. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin ifade düzeylerinin Western Emdirimi yöntemi ile tespit edilmesi.

RenCa ve erRenCa hücreleri, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin ifadeleri açısından karşılaştırılmıştır (Şekil 48). Bcl-2 protein ifadesi erRenCa hücrelerinde RenCa hücrelerine kıyasla %20 oranında artış göstermiştir. Bcl-xL protein ifadesinde ise %40 oranında artış gözlemlenmiştir. Everolimus direnci anti-apoptotik Bcl-2 ailesinin bir diğer üyesi olan Mcl-1 protein ifadesinde ise %40 oranında düşüşe yol açmıştır. Bu veriler doğrultusunda erRenCa hücrelerinin anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL protein seviyelerinde tespit edilen artış bu hücrelerin mTOR yolağı baskılanmış olmasına rağmen çoğalabilmelerini göstermektedir.

4.18 Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun BHK hücre hattı üzerindeki etkisinin in-vivo deneyler ile doğrulanması

Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun kemoterapötik özelliğinin tespiti için yapılan in-vitro deneylerinin, in-vivo hayvan deneyleri ile desteklenebilmesi için proje bünyesinde geliştirilen Everolimus dirençli RenCa (erRenCa) hücre modeli kullanılarak balb-c farelerde böbrek kanseri oluşturulmuş ve Everolimus ve ABT-737 ilaç enjeksiyonu başarıyla tamamlanmıştır. Deney düzeneği “Gereç ve Yöntem” kısmında Bölüm 3.10’da “erRenCa

Hücreleri ile Balb-c Farelerde Böbrek Kanseri Modeli Oluşturulması” başlığı altında detaylı olarak açıklanmıştır.



Şekil 49. Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun tümör oluşumuna etkisinin in-vivo deneyleri ile tespit edilmesi. a. Kontrol, b. Everolimus, c. ABT-737, d. Everolimus-ABT-737 kombinasyonu ile tedavi edilen. Balb-c farelerinde oluşan tümör benzeri dokular, resimlerde siyah ok ile gösterilmişlerdir.

İlaç muamelesine maruz kalmayan kontrol grubundaki sekiz hayvanda tümör oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 49a). Kontrol hayvanlarına kıyasla sadece Everolimus ile muamele edilen hayvanların sekizinden dördünde tümör oluşumu gözlemlenirken (Şekil 49b), ABT-737 ile muamele edilen hayvanların sekizinden üçünde tümör oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 49c). İlaç kombinasyonu ile tedavi edilen hayvan grubunda ise sekiz hayvanın hiçbirinde tümör oluşumu gözlemlenmemiştir (Şekil 49d).

Patolojik inceleme sırasında hayvanlardan izole edilen organlar (timüs, kalp, mide, bağırsak, böbrek, dalak, testis, akciğer, karaciğer ve beyin) üzerinde ilaç tedavisinin neden olduğu herhangi bir toksik etkiye rastlanmamıştır. Yine patolojik inceleme sonucunda hayvanlarda oluşan tümör dokusunun böbrek hücreli karsinom olduğu belirlenmiştir (Şekil 50). Hayvanlarda oluşan tümörlerin dördüncü veya beşinci evrelerde bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo 1, 2, 3 ve 4). Ayrıca hayvanlardan alınan organlardan olan timüs, kalp, mide, bağırsak, böbrek, dalak, testis, akciğer, karaciğer ve beyinde metastatik tümör bulgusuna rastlanmamıştır. Tablo 1’den görüleceği üzere kontrol grubunda oluşan tümörlerin evresi çoğunlukla 4 olarak tespit edilmiştir. Everolimus grubundaki 8 hayvandan 4’ünde tümör gelişimi gözlenmiş ve gelişen tümörlerden ikisinin evresi 5 olarak tespit edilirken diğer ikisi 2. ve 4. evre olarak

tanımlanmıştır. ABT-737 tedavisini alan hayvanların sadece 3' ünde 5. evre tümör gelişimi tespit edilmiştir. Bu durum Everolimus'a dirençli böbrek kanser tedavisinde ABT-737 mono terapisinin de başarılı olabileceğine işaret etmektedir. Kombine tedavi gören fare grubumuzda hiç tümör oluşumu görmememiz in-vitro deneylerimizi doğrular nitelikte olup Everolimus-ABT-737 kombinasyon tedavisinin ilaç dirençli böbrek kanserinde doğru bir yaklaşım olduğu izlenimini vermektedir.

Tablo 1. Kontrol grubu hayvanlarından alınan tümörlerin patolojik inceleme sonuçları

Kontrol	Tümör	Evre/nekroz
H1	Böbrek hücreli karsinom	4/+
H2	Böbrek hücreli karsinom	5/+
H3	Böbrek hücreli karsinom	4/+
H4	Böbrek hücreli karsinom	5/+
H5	Böbrek hücreli karsinom	4/+
H6	Böbrek hücreli karsinom	4/+
H7	Böbrek hücreli karsinom	4/+
H8	Böbrek hücreli karsinom	4/+

Tablo 2. Everolimus grubu hayvanlarından alınan tümörlerin patolojik inceleme sonuçları

Everolimus	Tümör	Evre/nekroz
H1	Böbrek hücreli karsinom	5/+
H2	Tümör yok	-
H3	Tümör yok	-
H4	Tümör yok	-
H5	Böbrek hücreli karsinom	4/-
H6	Böbrek hücreli karsinom	2/-
H7	Tümör yok	-
H8	Böbrek hücreli karsinom	5/+

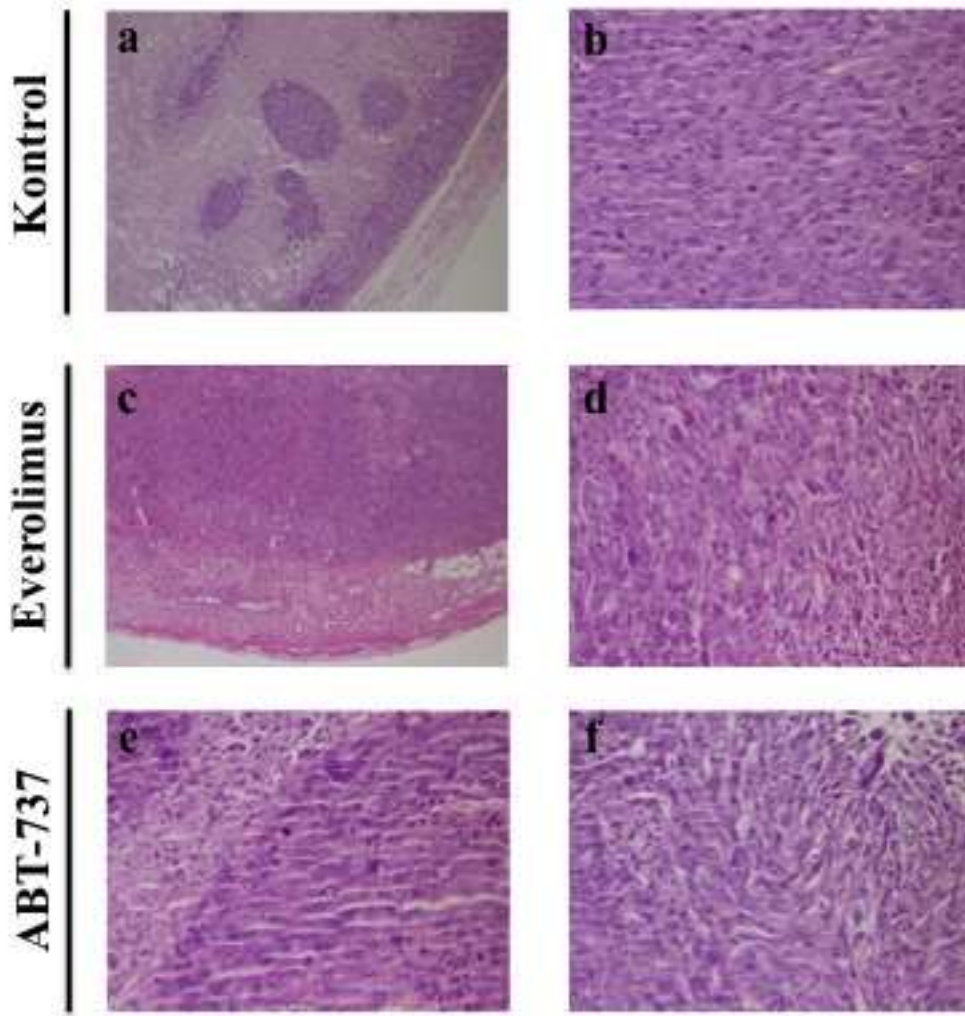
Tablo 3. ABT-737 grubu hayvanlarından alınan tümörlerin patolojik inceleme sonuçları

ABT-737	Tümör	Evre/nekroz
H1	Böbrek hücreli karsinom	5/-

H2	Böbrek hücreli karsinom	5/-
H3	Tümör yok	-
H4	Tümör yok	-
H5	Tümör yok	-
H6	Tümör yok	-
H7	Tümör yok	-
H8	Böbrek hücreli karsinom	5/-

Tablo 4. Kombinasyon grubu hayvanlarından alınan tümörlerin patolojik inceleme sonuçları

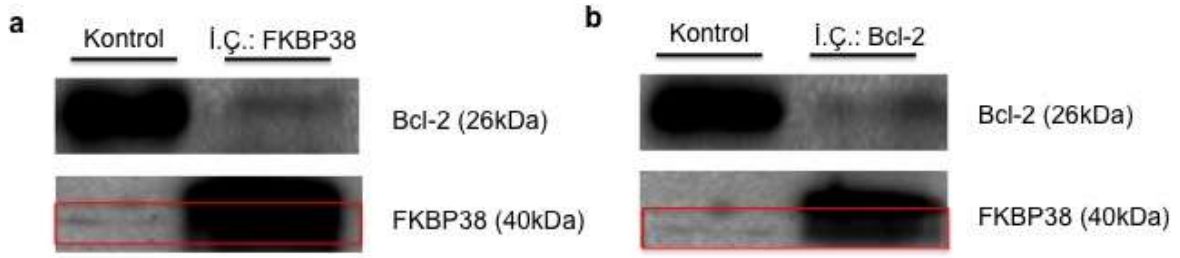
Kombinasyon	Tümör	Evre/nekroz
H1	Tümör yok	-
H2	Tümör yok	-
H3	Tümör yok	-
H4	Tümör yok	-
H5	Tümör yok	-
H6	Tümör yok	-
H7	Tümör yok	-
H8	Tümör yok	-



Şekil 50. Hayvanlardan elde edilen tümör dokularının histopatolojik olarak incelenmesi. a. Yumuşak dokuda geniş nekroza sahip tümör; b. Pleomorfizm ve geniş mitoz içeren tümör; c. Yumuşak dokuda solit tümör; d. Eozinofilik ve açıkça görünür nükleolide sahip pleomorf tümör hücreleri; e. Aşırı nükleer pleomorfizm gösteren tümör, nekrozlu dev hücreler; f. Sarkomatoid dedifferentiation gösteren tümör dokusu.

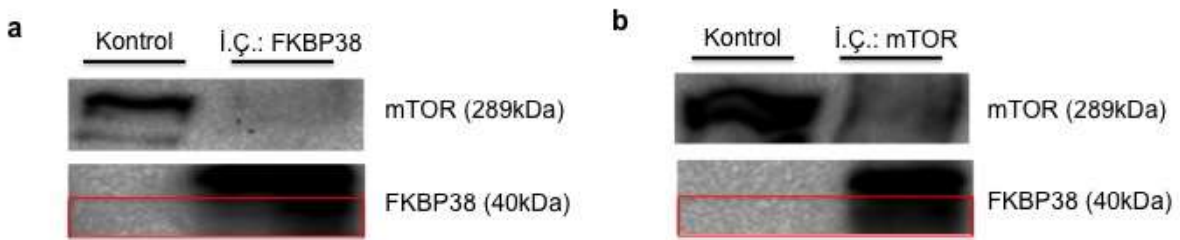
4.19 FKBP38 proteini ile Bcl-2 proteininin etkileşiminin incelenmesi

Projemizin son iş paketi kapsamında, kombinasyon tedavide kullandığımız Everolimus ve ABT-737 ilaçlarının hedef aldığı moleküler yollar arasındaki bağlantıda FKBP38 proteinin rolü araştırılmıştır. FK506 protein ailesinin bir üyesi olan FKBP38 proteini hem mTORC1 kompleksine hem de anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerine bağlanabilmektedir (Bai vd. 2007, Choi vd. 2011). Literatürdeki bu bilgiye dayanarak, projemiz bünyesinde öncelikle FKBP38 ile Bcl-2 veya mTOR proteinlerinin etkileşimi eş-immün çökeltme yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Bölüm 3.7).



Şekil 51. A-498 hücrelerinde immün çökeltme yöntemi kullanılarak proteinlerinin (a) FKBP38 antikoruna ya da (b) Bcl-2 antikoruna ile çöktürülmesi sonrasında FKBP38-Bcl-2 protein-protein etkileşiminin Western Emdirimi yöntemi kullanılarak belirlenmesi.

A-498 protein lizatlarından anti-FKBP38 antikoruna kullanılarak çöktürülen FKBP38 proteininin Bcl-2 ile etkileşiminin belirlendiği Şekil-51A üst blotunda görüleceği üzere A-498 hücrelerinde az da olsa FKBP38-Bcl-2 protein etkileşimi mevcuttur. Deney sonuçlarımızın sağlanması için hücre lizatları bu kez anti-Bcl-2 antikoruna ile bekletilmiş ve membrana aktarılan proteinler anti-FKBP38 antikoruna ile etiketlenmiştir (Şekil 51B, alt blot). Deney sonucunda herhangi bir ilaç muamelesi görmemiş A-498 hücrelerinde FKBP38 proteininin de eş-immün çökeltmesinin gerçekleştiği kanıtlanmıştır (Şekil 52). Sonuçlarımız hiçbir ilaç muamesine maruz kalmayan A-498 hücrelerinde FKBP38 ile Bcl-2 proteininin etkileşime girdiğini göstermektedir.

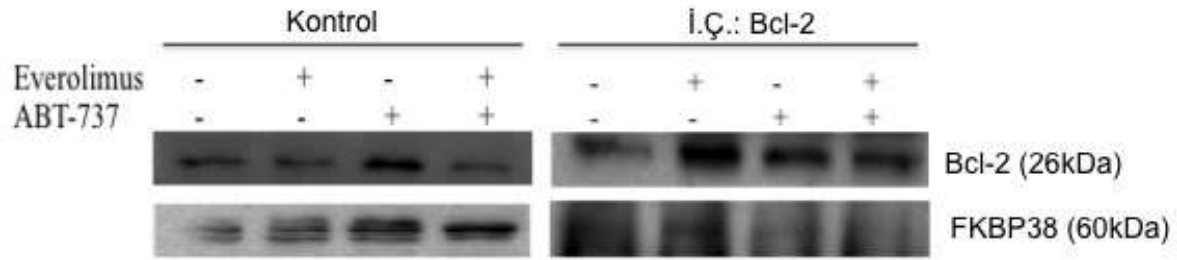


Şekil 52. A-498 hücrelerinde immün çökeltme yöntemi kullanılarak proteinlerinin (a) FKBP38 antikoruna ya da (b) mTOR antikoruna ile çöktürülmesi sonrasında FKBP38-mTOR protein-protein etkileşiminin Western Emdirimi yöntemi kullanılarak belirlenmesi.

Bcl-2 proteini ile etkileşime girdiğini gösterdiğimiz FKBP38 proteininin mTOR proteini ile de etkileşime girdiği hiçbir ilaç muamelesi uygulanmamış A-498 hücrelerinde yukarıda izlenen yaklaşımla iki yönlü olarak yapılan eş-immün çökeltme yöntemi ile kanıtlanmıştır (Şekil 52A ve B).

4.20 İlaç uygulanan A-498 hücrelerinde FKBP38 proteinin Bcl-2 ve mTOR proteinleri ile etkileşiminin incelenmesi

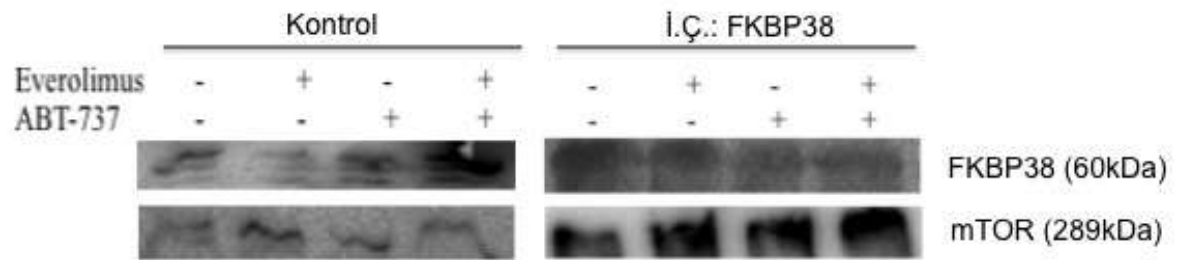
Projemizin bir sonraki aşamasında Everolimus ve ABT-737 kombinasyon muamelesinin FKBP38 proteininin Bcl-2 proteini ile olan etkileşimine nasıl etki ettiği eş-immün çökeltme yöntemi kullanılarak incelenmiştir (Bölüm 3.7). Yapılan deneylerde A-498 hücreleri kullanılmıştır.



Şekil 53. A-498 hücrelerinin ilaç muamelesi sonrasında proteinlerinin Bcl-2 antikoruna ile çöktürülmesi sonrasında FKBP38 ile olan ilişkisinin Western Emdirimi yöntemi kullanılarak belirlenmesi.

Şekil 53'te görüleceği üzere kontrol ve Everolimus uygulanan A-498 hücrelerinde Bcl-2-FKBP38 protein-protein etkileşimi ABT-737 mono ve kombine muamelesine göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, Everolimus mTOR kinazına bağlandığı için serbest kalan FKBP38'in Bcl-2'yu seçmesiyle açıklanabilir.

İlaç muamelesi görmeyen A-498 hücrelerinde gösterilen FKBP38 ve mTOR etkileşimine, kombinasyon tedavisinin nasıl etki ettiği eş-immün çökeltme yöntemi yapılarak incelenmiştir (Bölüm 3.7).

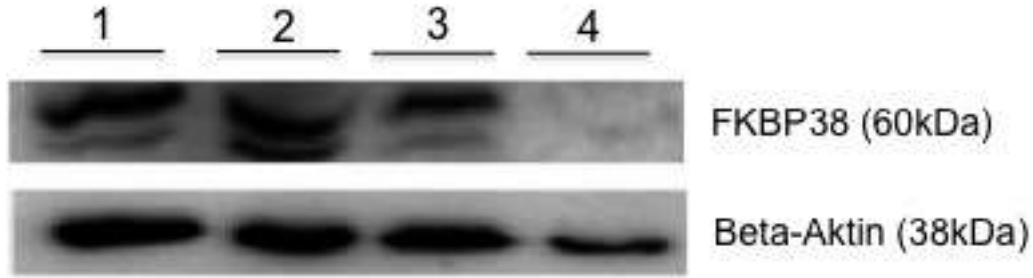


Şekil 54. A-498 hücrelerinin ilaç muamelesi sonrasında proteinlerinin FKBP38 antikoruna ile çöktürülmesi sonrasında mTOR ile olan ilişkisinin Western Emdirimi yöntemi kullanılarak belirlenmesi.

A-498 hücrelerinde everolimus ve ABT-737 tek başına uygulandığında FKBP38-mTOR protein etkileşimini arttırmıştır (Şekil 54). En fazla eş-çökeltmesi gerçekleşen mTOR proteini ise kombinasyon muamelesi sonucunda görülmüştür.

4.21 A-498 hücrelerinde FKBP38 proteininin susturulması

FKBP38 proteinin Bcl-2/Bcl-xL güdümlü apoptotik direnç mekanizmasındaki rolünü anlamak için FKBP38 proteini A-498 hücrelerinde shRNA yöntemi ile sessizleştirilmiştir. FKBP38 proteinin sessizleştirip sessizleştirilemediğini A-498 hücrelerinden elde edilen protein lizatlarında FKBP38 proteininin miktarının tayini ile teyit edilmiştir. Bunun için Western Emdirimi yöntemi kullanılmıştır (Bölüm 3.6).

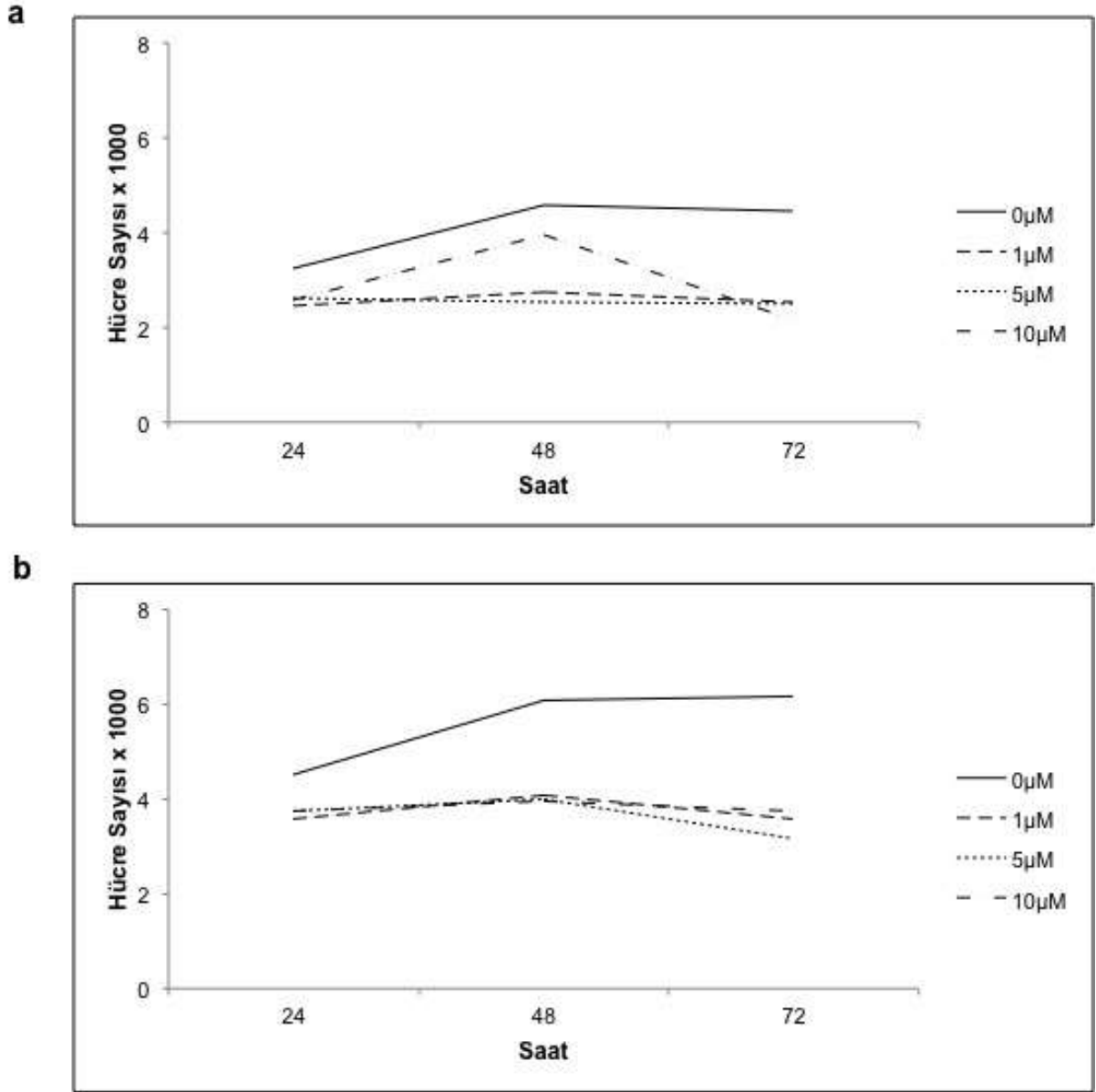


Şekil 55. A-498 hücrelerinde shFKBP38 aktarımı sonrasında FKBP38 protein ifadesinin Western Emdirimi ile tespit edilmesi. (1) shRNA aktarımı yapılmamış kontrol hücreleri; (2) Kontrol shRNA aktarımı yapılmış hücreler; (3) MOI=1 ile shFKBP38 aktarımı yapılmış hücreler; (4) MOI=2 ile shFKBP38 aktarımı yapılmış hücreler.

Şekil 55’de shFKBP38 aktarımı sonrasında FKBP38 protein miktarının (4. şerit) kontrol (1. Şerit) ve kontrol shRNA (2. Şerit) ile enfekte edilen hücrelere kıyasla ciddi oranda azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuç FKBP38’in A-498 hücrelerinde başarılı bir şekilde susturulduğunu kanıtlamaktadır.

4.22 Susturulmuş FKBP38 proteininin Everolimus muamelesi sonucunda hücre canlılığına etkisinin incelenmesi

FKBP38 proteininin Everolimus direnç mekanizmasındaki rolünü tespit etmek için A-498-shFKBP38 hücrelerine farklı dozlarda Everolimus muamelesi uygulanmış ve FKBP38 proteininin eksikliğinin Everolimus direnç mekanizmasındaki rolü hücre canlılık testi kullanılarak incelenmiştir (Bölüm 3.3).



Şekil 56. Farklı dozlardaki Everolimus'un 24 saat boyunca muamelesinin, (a) kontrol shRNA ve (b) shFKBP38 aktarımı yapılmış A-498 hücre canlılığına etkisinin WST-1 testi ile belirlenmesi.

Şekil 56'da 24, saat boyunca uygulanan farklı dozlardaki Everolimus'un hücre canlılığına etkisi gösterilmiştir. Önceki sonuçlarımızı destekler şekilde FKBP38'i susturulmamış kontrol hücrelerinde ve kontrol shRNA ile enfekte edilmiş hücrelerde Everolimus sitotoksik bir düşüşe yol açmamış olup FKBP38'in hücre canlılığı üzerinde bir etki göstermediği gözlemlenmiştir. shFKBP38 aktarımı yapılmış A-498 hücrelerinin bakteriyel kontaminasyona daha hassas hale gelmelerinden dolayı deney bir kez tekrar edilebilmiş olup yayın aşaması için 3 tekrar daha yapılması planlanmaktadır.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

HIF ve PI3K/AKT/mTOR yolakları Böbrek Hücreli Karsinomanın oluşumu ve gelişimde önemli rol oynamaktadırlar. Bu sebeple ileri evre BHK hastalarının tedavilerinde bu yolakları moleküler olarak hedef alan ilaçlar kullanılmaktadır (Lieberthal ve Levine 2009, Banumathy ve Cairns 2010). Bu ilaçlardan biri olan Everolimus'un metastatik BHK tedavisinde ikinci basamak olarak kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Everolimus tedavisinde progresyonsuz sağkalım oranının düşük olması ve tümörlerin Everolimus'a direnç göstermeleri BHK tedavisinde uygulanmak üzere yeni stratejilerin geliştirilmesini zaruri kılmıştır (Voss vd. 2011). Pek çok kanser tipinde görülen ilaç direnci anti-apoptotik Bcl-2 protein seviyesindeki artışla bağlantılıdır. Aynı şekilde BHK tümörlerinin de Everolimus'a karşı kazandığı direncin bir geri bildirim yolu olarak Bcl-2 protein seviyesiyle ilişkilendirilebileceği öne sürülmüştür (Santoni vd. 2014, Giaccone ve Pinedo 1996). Bcl-2 proteininin anti-apoptotik etkisini baskılamak için kullanılan ve BH3 bölgesi taklidi olan ABT-737 küçük hücreli akciğer kanseri ve tiroid kanseri gibi bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılmış ve umut verici sonuçlar doğurmuştur (Hann vd. 2008, Broecker-Preuss vd. 2016). Bu bilgilerin ışığında, projemiz bünyesinde yeni bir BHK tedavisi stratejisi olarak Everolimus ile ABT-737 kombinasyonu kullanılmış ve bu ilaç kombinasyonunun BHK üzerindeki etkisi in-vitro ve in-vivo deneyler aracılığıyla incelenmiştir. Proje kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar Everolimus'a karşı gelişen ilaç direncinin kombinasyon tedavisi ile üstesinden gelinebileceğini göstermişlerdir. Bu sebeple, literatürde ilk defa bu proje bünyesinde uygulanan kombinasyon muamelesinin BHK tedavisinde yeni bir terapötik fayda sağlayabileceği söylenebilir.

Projemizde ilk olarak dört farklı BHK hücre hattındaki anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin protein seviyelerini bakılmıştır. Bu BHK hücre hatları arasında primer bölge A-498 ve metastatik bölge Caki-1 hücreleri Bcl-2 proteinini en yüksek seviyede ihtiva ettikleri için proje kapsamındaki diğer deneylerde de bu iki hücre hattı kullanılmıştır. Öncelikle bahsi geçen hücre hatlarında Everolimus ve ABT-737 ilaçlarının sitostatik dozları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara istinaden A-498 hücreleri için 1µM Everolimus ve 5µM ABT-737, Caki-1 hücreleri için ise 1µM Everolimus ve 10µM ABT-737 konsantrasyonları kombinasyon muamelesi için uygun dozlar olarak belirlenmişlerdir. Hücre canlılık testi sonunda her iki hücre hattında da Everolimus tek başına uygulandığında ilaç direnci gözlemlenmiştir. Bu sonuç literatür ile uyum göstermektedir (Juengel vd. 2014). Everolimus muamelesine kıyasla ABT-737 tek başına 72 saat boyunca uygulandığında primer A-498 hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe yol açarken, ABT-737 muamelesi sonunda Caki-1 hücre canlılığında anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir. Ni ve diğerlerinin hepatosellüler karsinomada gösterdikleri gibi, bunun sebebi olarak yüksek miktarda ifade edilen Bcl-2 proteininin ABT-737 direncine sebep olabileceği söylenebilir (Ni vd. 2014). İlaçların tek başına kullanıma kıyasla, kombinasyon muamelesi 48

ve 72 saatin sonunda hem A-498 hem de Caki-1 hücre canlılığında anlamlı bir düşüşe yol açmıştır.

Hücre canlılığında gözlemlenen bu düşüşün Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hücre döngüsü üzerindeki etkisinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırılmıştır. Kombinasyon muamelesi sonucunda her iki hücre hattında da hücre döngüsünün G1 fazından rol oynayan ve DNA replikasyonunun başlamasından sorumlu olan siklin proteinlerinin ifadelerinde düşüşe yol açması, uygulanan ilaç kombinasyonunun hücre döngüsünü G1 fazında durduğunu göstermektedir.

mTOR kinazı hücre büyümesi ve çoğalmasından sorumlu olduğu için hücre döngüsünde yer alan proteinlerin ifadelerinde görülen artış veya azalış mTOR yolağının aktivitesi ile yakından ilişkilidir. Nitekim mTOR kinazının hücre döngüsü proteinlerinden biri olan siklin D1'in translasyonunda rol oynadığı literatürde gösterilmiştir (Averous vd. 2008). Bu sebeple, ilaç kombinasyonu sonucunda hücre döngüsünde görülen duraklamanın, kombinasyonun mTOR yolağına olan etkisinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında Everolimus muamelesinin mTOR kinazının serin 2448'de fosfatlanarak aktive olmasını engellediği ve bundan mütevellit olarak mTOR kinazı hedef proteini olan p70S6K'nın treonin 389'da fosfatlanmasında bir düşüş gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu durumda p70S6 kinazı kendi hedef proteini olan S6 protein kinazını serin 235/236 ve serin 240/244 bölgelerinde fosfatlayamayarak protein sentezini başlatamamaktadır. Öte yandan mTOR kinazında Everolimus muamelesi sonunda görülen otofosforilasyonun baskılanması, bir diğer mTOR hedef proteini olan 4E-BP1 ve 4E-BP1 fosfatlanmış türevlerinin ifadelerinde de düşüşe yol açmıştır. ABT-737 ilacının tek başına uygulandığında mTORC1 kompleksi üzerinde Everolimus tarafından görülen etkiye yol açmadığı, hedef proteinlerin fosfatlanmış türevlerindeki ifadeleri incelendiğinde görülmüştür. Ancak, iki ilacın kombinasyonunun mTORC1 yolağını Everolimus'a kıyasla en az iki kat daha etkili bir şekilde baskıladığı tespit edilmiştir.

Everolimus ilaç direncine neden olduğu düşünülen bir diğer geri bildirim yolağı mTORC2 yolağıdır. mTORC1 yolağına ek olarak mTORC2 yolağı incelendiğinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun kompleks bünyesinde bulunan mTOR'un serin 2481'de gerçekleşen otofosforilasyonunda ifade düşüşüne yol açtığı görülmüştür. Bu düşüş mTOR'un hedef proteini olan AKT'nin serin 473 (Copp vd. 2009) bölgesinde fosfatlanamamasına sebep olmaktadır. Bu sebeple inaktif olan AKT hem sağkalım yolağını harekete geçiremez hem de apoptoz yolağı üzerindeki inhibitör etkisini kaybeder. Bu bağlamda, elde edilen veriler değerlendirildiğinde Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun mTORC2 yolağını da inaktive edebileceği gösterilmiştir.

Everolimus ve ABT-737 kombinasyonu sonucunda hücre canlılığında gözlemlenen düşüş, kombinasyonun mTOR yolağı üzerindeki baskılayıcı etkisine ek olarak hücre ölüm mekanizmasını harekete geçirmesiyle de ilişkili olabilmektedir. Nitekim yapılan deneyler kombinasyon muamelesinin apoptotik A-498 ve Caki-1 hücre oranlarını anlamlı bir şekilde artırdığını göstermiştir. Hücre ölüm mekanizması moleküler olarak incelendiğinde, ilaç kombinasyonuna tabi tutulan hücrelerde apoptotik aktivatörlerinden olan parçalanmış kaspaz 9 ve kaspaz 3'e rastlanmıştır. İlaç kombinasyonuna ek olarak ABT-737'nin tek başına uygulandığında da apoptozu başlatabildiği iki hücre hattında da gösterilmiştir.

Başlayan apoptoz mekanizmasında Bcl-2 ailesi üyelerinden olan Puma ve Noxa'nın rolü araştırıldığında, ilaç kombinasyonunun A-498 hücrelerinde p53 protein seviyesinde düşüşe yol açtığı ve bu düşüşe paralel olarak Puma proteininin de ifadesinin düştüğü gözlemlenmiştir. p53'ün Puma'nın transkripsiyonundan sorumlu olması bu sonucu açıklamaktadır. Puma'ya kıyasla transkripsiyonu yine p53 tarafından gerçekleştirilen Noxa proteini ifadesinde ABT-737 monoterapi ve kombinasyon terapisi sonunda gözlemlenen artış Noxa'nın Bcl-2 ailesi proteinlerinden sadece Mcl-1 ile etkileşime girmesi ve ABT-737 ilacının Mcl-1 proteinini baskılamaması ile açıklanabilmektedir (Chen vd. 2005, Kuwana vd. 2005).

Bcl-2 ailesi proteinleri, evrimsel olarak korunmuş bölge olan BH3 bölgesi aracılığıyla birbirleriyle etkileşime girerek apoptoz mekanizmasını kontrol ederler. ABT-737'nin Bcl-2 proteininin BH3 bölgesini hedef alarak onun diğer Bcl-2 ailesi proteinleriyle olan etkileşimini engellemesinin, ABT-737 ve Everolimus kombinasyonu sonucunda görülen apoptoz mekanizmasını nasıl etkilediği de moleküler olarak araştırılmıştır. Bcl-2 proteininin esnek bölgesinde bulunan serin 70'de gerçekleşen fosfatlanma, Bcl-2'nun aynı ailedeki diğer proteinlerden olan Bax ve Bim ile olan etkileşimini azaltmakta ve bu sayede apoptoz mekanizmasını harekete geçirmektedir (Shitashige vd. 2001, Bassik vd. 2004). ABT-737 monoterapi ve kombinasyon muamelesi sonucunda yıkıma uğrayan Bcl-2 protein ifadesinde görülen düşüş; aynı proteinin serin 70'de fosfatlanmış türevinde de gözlemlenmiştir. İlaç kombinasyonu sonucunda indüklenen apoptoz mekanizmasının serin 70'de fosfatlanan Bcl-2 türevinde görülen düşüşle karışıklık göstermesi FKBP38 proteininin fosfatlanmanın gerçekleştiği esnek bölgeye bağlanarak fosfatlanmayı engellenmesi ile açıklanabilir (Kang vd. 2005). Nitekim yapılan eş-immün çökeltme sonuçları tek başına uygulanan ABT-737 muamelesi sonunda FKBP38 proteininin kontrol hücrelerine kıyasla daha az Bcl-2 proteinine bağlandığını göstermektedir.

Literatürde Bcl-2 proteininin serin 70'de fosfatlanmasının Bcl-2-Bax ve Bcl-2-Bim protein-protein interaksiyonunu azalttığı ve bu sebeple apoptoz mekanizmasını harekete geçirdiği belirtilmiştir (Shitashige vd. 2001, Bassik vd. 2004). Bu bilgiye dayanılarak ABT-737 veya onun Everolimus ile kombinasyonu sonucunda aktive olan apoptotik yolak, FKBP38 proteini ile

ekileşiminden dolayı serin 70'de fosfatlanması gerçekleşmeyen Bcl-2 proteininin BH3 bölgesinin de ABT-737 tarafından bloklanması sonucunda Bim proteininin Bcl-2'ya bağlanamayarak Bax ile etkileşime girmesiyle açıklanabilir. İlaç kombinasyonu sonunda Bim protein ifadesinde artış gözlemlenmesi bu hipotezi doğrular niteliktedir.

Literatürde önerildiği üzere Bcl-2 ve mTOR proteinlerinin FKBP38 için rekabet içinde olmaları, projede Everolimus ile bloke edilen mTOR yolağı ve ABT-737 ile engellenen Bcl-2 güdümlü apoptik yolak açısından önem taşımaktadır (Ma vd. 2010). Bu sebeple FKBP38 proteininin BHK'da görülen ilaç direnci üzerinde etki sahibi olup olmadığını anlamak için A-498 hücrelerinde FKBP38 proteini susturulmuş ve bu hücreler farklı dozlardaki Everolimus ile muamele edilmişlerdir. Deney sonucunda FKBP38'in hücre canlılığında bir düşüşe yol açmadığı, fakat hücre çoğalmasını durdurduğu gözlemlenmiştir. Bu sonucu kesin olarak kanıtlayabilmek için FKBP38 proteininin hücre döngüsü üzerindeki rolünün detaylıca incelenmesi ve deneylerin tekrarlanması gerekmektedir.

İn-vitro deneyleri ilaç kombinasyonunun mTOR yolağını baskılayarak hücre döngüsünü durdurduğunu ve aynı zamanda hücre ölümünü başlatarak hücre canlılığında ciddi bir düşüşe yol açtığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar in-vivo deneylerin önünü açmıştır. İn-vivo deneylere başlamadan önce bu deneylerde kullanılacak olan RenCa hücrelerinde yapılmış olan Everolimus ve ABT-737 doz çalışmaları, bu hücrelerin özellikle Everolimus'a karşı hassas olduklarını göstermiştir. Sonuçlarımızı destekler şekilde Everolimus muamelesinin RenCa hücrelerinin çoğalmasını ve canlılığını baskılandığı literatürde gösterilmiştir (Hirayama vd. 2016). RenCa hücrelerinin Everolimus'a karşı gösterdiği bu hassasiyetin üstesinden gelmek için projemiz bünyesinde Everolimus'a dirençli RenCa (erRenCa) hücreleri geliştirilmiştir. Bu hücrelere kazandırılan Everolimus direnci hücre canlılık deneyleri ile kanıtlanmıştır. Artan Everolimus konsantrasyonları sonucunda erRenCa hücre canlılığında herhangi bir düşüş gözlemlenmezken, bu hücrelerde mTOR kinazının hedef proteinlerinin fosfatlanmasının tamamen engellendiği görülmüştür. Yapılan kapsamlı deneyler göstermiştir ki, tıpkı Everolimus'a dirençli A-498 ve Caki-1 hücrelerinde olduğu gibi erRenCa hücreleri RenCa hücrelerine kıyasla yüksek oranda anti-apoptotik Bcl-2 proteini ihtiva etmektedir. Bcl-2 proteininde gözlemlenen bu artış, mTOR yolağı baskılanmış olmasına rağmen erRenCa hücrelerine hayatta kalma avantajını sağlamıştır.

erRenCa hücreleri kullanılarak Balb-c farelerinde oluşturulan böbrek kanseri modelinde ilaç kombinasyonunun in-vivo etkisi incelenmiştir. Hiçbir tedaviye maruz bırakılmayan kontrol grubundaki hayvanlar ile Everolimus veya ABT-737 tedavisi alan hayvan gruplarında tümör oluşumu gözlemlenmiştir. İlaç muamelesi ile tedavisi gerçekleştirilen hayvan grubundaki hayvanların hiçbirinde tümör oluşumunun gözlemlenmemesi Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun anti-tümör etkisini kanıtlamaktadır. Bu sonuçlara ek olarak ilaç

kombinasyonunun deney düzeneğinde kullanılan hayvanların hiçbirinde toksisiteye yol açmamış olması uygulanan dozların tolere edilebildiğini göstermiştir. Bu sonuç literatürde hiçbir toksik etki göstermeyen ikili ilaç kombinasyonlarının terapötik yararını gösteren çalışmalarla paralellik sunmaktadır (Zhu vd. 2012, Paoluzzi vd. 2008).

Projemizde FKBP38 proteininin Everolimus ve ABT-737 ilaç kombinasyonunun hedef aldığı moleküler yolakta önemli bir rol oynadığı önerilmiştir. Bu doğrultuda yapılan deney sonuçlarımız A-498 hücrelerinde susturulan FKBP38 proteininin hücre çoğalmasında duraklamaya yol açtığını göstermişlerdir. Sonuçlarımızın teyidi için takibi deneylerde FKBP38'in moleküler olarak hücre döngüsü üzerindeki rolünün detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. Bu bağlamda A-498 hücre hattına ek olarak FKBP38 proteininin önemini metastatik Caki-1 hücre hattında da tespit edilmesi gerekmektedir. Proje çıktılarımızın son iş paketi için yapacağımız makalede bu hücrelerde FKBP38 proteininin shRNA tekniği kullanılarak susturulmasına başlanmıştır.

Proje çıktılarımızdan elde ettiğimiz sonuçların teyidi için diğer bir önerimiz ise; her iki hücre hattında da Everolimus ve/veya ABT-737'nin muamelesi sonrası Bcl-2 proteini ile eş-immün çökeltme yapılarak Bcl-2'nin etkileşimde olduğu farklı proteinlerin kütle spektrometrisi proteomik çalışmaları ile belirlenmesidir. Kütle spektrometrisi aynı zamanda FKBP38'in etkileşimde bulunduğu diğer proteinlerin belirlenmesi için FKBP38 ile eş-immün çökeltme yapılan örnekler üzerinde yapılacaktır. Böylelikle FKBP38 ve Bcl-2 ile etkileşen proteinlerin belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu proteinler içerisinde sağ kalım yolağında görev alan proteinlerin shRNA ile susturulması yapılacak ve mono ve kombine tedavilerden hücre sağ kalımının nasıl etkilendiği tespit edilecektir. Çalışmalarda proje bünyesinde satın aldığımız ve elimizde mevcut olan antikolar ve sarf malzemeler kullanılacak ve Yeditepe Proteomik laboratuvarında bulunan Thermo Dionex™ UltiMate™ 3000 RSLCnano System ve Bruker Compact (CaptiveSpray Nano-Electrospray Ionisation – UHR-quadrupole Time-of- Flight) ile proteomik analiz gerçekleştirilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Adams, J.M., Cory S. 2007. "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy", *Oncogene*, 26(9), 1324-37
- Averous J, Fonseca BD, Proud CG. 2008. "Regulation of cyclin D1 expression by mTORC1 signaling requires eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1", *Oncogene*, 27(8), 1106-13
- Azmi, A.S., Mohammad, R.M. 2009. "Non-peptidic small molecule inhibitors against Bcl-2 for cancer therapy", *J Cell Physiol.*, 218(1),13-21
- Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q.J., Liu, Y., Jiang, Y. 2007. "Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38", *Science*, 318(5852), 977-80
- Bajwa, N., Liao, C., Nikolovska-Coleska, Z. 2012. "Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review", *Expert Opin Ther Pat.*, 22(1), 37-55
- Banumathy, G., Cairns, P. 2010. "Signaling pathways in renal cell carcinoma", *Cancer Biol Ther.*, 10(7), 658-64
- Bassik, M. C., Scorrano, L., Oakes, S. A., Pozzan T. ve Korsmeyer, S. J. 2004. "Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis", *EMBO J.*, 23(5), 1207-1216.
- Billen, L.P., Shamas-Din, A., Andrews, D.W. 2008. "Bid: a Bax-like BH3 protein", *Oncogene*, 27 Suppl 1, S93-104
- Bouillet, P., Strasser, A. 2002. "BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death", *J Cell Sci.*, 115(Pt 8),1567-74
- Bratton, S.B., Cohen, G.M. 2001. "Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego?", *Trends Pharmacol Sci.*, 22(6), 306-15
- Bratton, S.B., Salvesen, G.S. 2010. "Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome", *J Cell Sci.*, 123(Pt 19), 3209-14
- Broecker-Preuss M, Becher-Boveleth N, Muller S, Mann K. 2016. "The BH3 mimetic drug ABT-737 induces apoptosis and acts synergistically with chemotherapeutic drugs in thyroid carcinoma cells", *Cancer Cell Int*, 16, 27
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. 1994. "A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex", *Nature* 369, 756–758
- Calvo, E., Grünwald, V., Belmunt, J. 2014. "Contraversies in renal cell carcinoma: Treatment choice after progression on vascular endothelial growth-factor-targeted therapy", *Eur J Cancer*, article in press

Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T., Green D.R. 2008. "Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(51), 20327-32

Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., Lutz, R.J. 1995. "A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions", *EMBO J.*, 14(22), 5589-96

Choi, B.H., Yoon, H.S. 2011. "FKBP38-Bcl-2 interaction: a novel link to chemoresistance", *Curr Opin Pharmacol.*, 11(4), 354-9

Copp, J., Manning, G., Hunter, T. 2009. "TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2", *Cancer Res.*, 69, 1821-7

Corradetti, M.N., Guan, K.L. 2006. "Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?", *Oncogene*, 25(48), 6347-60

Corrano, L., Korsmeyer, S.J. 2003. "Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members", *Biochem Biophys Res Commun.*, 304(3), 437-44

Cory, S., Adams, J.M. 2002. "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch", *Nat Rev Cancer*, 2(9), 647-56

Cory, S., Adams, J.M. 2005. "Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch", *Cancer Cell*, 8(1), 5-6

Danial, N.N. 2007. "BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death", *Clin Cancer Res.*, 13(24), 7254-63

Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. 2004. "Cell death: critical control points", *Cell*, 116(2), 205-19

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E. 1997 "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery", *Cell.*, 91(2), 231-41

Dibble, C.C., Asara, J.M., Manning, B.D. 2009. "Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1", *Mol Cell Biol.*, 29(21), 5657-70

Faivre, S., Kroemer, G., Raymond, E. 2006. "Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents", *Nat Rev Drug Discov.*, 5(8), 671-88

Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. 2005. "Caspase family proteases and apoptosis", *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 37(11), 719-27

Ferlay, J., Skin, H.R., Bray, F. 2010. "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008", *Int J Cancer*, 15, 2893-917

Figlin, R.A., Kaufmann, I., Brechbiel, J. 2013. "Targeting PI3K and mTORC2 in metastatic renal cell carcinoma: new strategies for overcoming resistance to VEGFR and mTORC1 inhibitors", *Int J Cancer*, 133(4), 788-96

- Ganley, I.G., Lam, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. 2009. "ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy". *J. Biol. Chem.*, 284, 12297–12305
- García-Martínez, J.M., ve Alessi, D.R. 2008. "mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1)", *Biochem. J.*, 416, 375–385.
- Ghiotto, F., Fais, F., Bruno, S. 2010. "BH3-only proteins: the death-puppeteer's wires", *Cytometry A.*, 77(1), 11-21
- Giaccone G, Pinedo HM. 1996. "Drug Resistance", *Oncologist*, 1(1 & 2), 82-87
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. 2006. "Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1", *Dev. Cell*, 11, 859–871.
- Gupta, K., Miller, J.D., Li, J.Z., Russell, M.W., Charbonneau, C. 2008. "Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): a literature review", *Cancer Treat Rev.*, 34(3), 193-205
- Hann CL, Daniel VC, Sugar EA ve diğeleri. 2008. "Therapeutic efficacy of ABT-737, a selective inhibitor of BCL-2, in small cell lung cancer", *Cancer Res*, 68(7), 2321-8
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., Gout, I., Downes, C.P., Lamb, R.F. 2004. "The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins", *J Cell Biol.*, 166(2), 213-23
- Hickey, M.M., Simon, M.C. 2006. "Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors", *Curr Top Dev Biol.*, 76, 217-57
- Hirayama Y, Gi M, Yamano S, vd.. 2016. "Anti-PD-L1 treatment enhances antitumor effect of everolimus in a mouse model of renal cell carcinoma", *Cancer Sci*, 107(12), 1736-44
- Hsu, P.P., Kang, S.A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K.A., Lim, .D, Peterson, T.R., Choi, Y., Gray, N.S., Yaffe, M.B., Marto, J.A., Sabatini, D.M. 2011. "The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling", *Science*, 332(6035), 1317-22
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T. ve Guan, K.L. 2003. "Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling", *Genes Dev.*, 17, 1829– 1834
- Israels, L.G., Israels, E.D. 1999. "Apoptosis", *Oncologist*, 4(4), 332-9
- Juengel, E., Engler, J., Natsheh, I., Jones, J., Mickuckyte, A., Hudak, L., Jonas, D., Blaheta, R.A. 2009. "Combining the receptor tyrosine kinase inhibitor AEE788 and the mammalian

target of rapamycin (mTOR) inhibitor RAD001 strongly inhibits adhesion and growth of renal cell carcinoma cells", *BMC Cancer*, 9, 161

Juengel E, Nowaz S, Makarevi J, vd.. 2014." HDAC-inhibition counteracts everolimus resistance in renal cell carcinoma in vitro by diminishing cdk2 and cyclin A", *Mol Cancer*, 13, 152

Julien, L.A., Carriere, A., Moreau, J., Roux, P.P. 2010. "mTORC1-activated S6K1 phosphorylatesRictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling", *Mol Cell Biol.*, 30(4), 908-21

Kaelin, W.G. Jr. 2009. "Treatment of kidney cancer: insights provided by the VHL tumor-suppressor protein", *Cancer*, 115(10 Suppl), 2262-72

Kang, C. B., Feng, L., Chia, J. ve Yoon, H. S. 2005. "Molecular characterization of FK-506 binding protein 38 and its potential regulatory role on the anti-apoptotic protein Bcl-2", *Biochem Biophys Res Commun*, 337(1), 30-38.

Kelekar, A., Thompson, C.B. 1998. "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis", *Trends Cell Biol.*, 8(8), 324-30

Kinnally, K.W., Antonsson, B. 2007. "A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis", *Apoptosis*12(5), 857-68

Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S. 2006. "Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia", *Cancer Cell*, 10, 375–388

Korsmeyer. S.J., Shutter, J.R., Veis, D.J., Merry, D.E., Oltvai, Z.N. 1993. "Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death", *Semin Cancer Biol.*, 4(6), 327-32

Labi, V., Grespi, F., Baumgartner, F., Villunger, A. 2008. "Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy?", *Cell Death Differ.*, 15(6), 977-87

Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J. 2002. "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics", *Cancer Cell*, 2(3), 183-92

Li, S., Brown, M.S., ve Goldstein, J.L. 2010. "Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 3441–3446

Lieberthal W, Levine JS. 2009. "The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease", *J Am Soc Nephrol*, 20(12), 2493-502

Ljungberg, B., Cowan, N.C., Hanbury, D.C., Hora, M., Kuczyk, M.A., Merseburger, A.S., Patard, J.J., Mulders, P.F., Sinescu, I.C. 2010. "European Association of Urology Guideline Group. EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update", *Eur Urol.*, 58(3), 398-406

Ma, D., Bai, X., Zou, H., Lai, Y., Jiang, Y. 2010. "Rheb GTPase controls apoptosis by regulating interaction of FKBP38 with Bcl-2 and Bcl-XL", *J Biol Chem.*, 285(12), 8621-7

Ma, X.M., ve Blenis, J. 2009. "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 307–318

Maruyama, R., Yamana, K., Itoi, T., Hara, N., Bilim, V., Nishiyama, T., Takahashi, K., Tomita, Y. 2006. "Absence of Bcl-2 and Fas/CD95/APO-1 predicts the response to immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma", *Br J Cancer*, 95(9), 1244-9

Motzer, R., Escudier, B., Oudard, S. 2008. "Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase III trial", *Lancet*, 372(9637), 449-56

Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L., Fesik, S.W. 1996. "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death", *Nature*, 381(6580), 335-41

Murphy, G.P., Hrushesky, W.J. 1973 "A murine renal cell carcinoma", *J Natl Cancer Inst.*, 50(4), 1013-25

Ni Z, Wang B, Dai X, vd.. 2014. " HCC cells with high levels of Bcl-2 are resistant to ABT-737 via activation of the ROS-JNK-autophagy pathway", *Free Radic Biol Med*, 70, 194-203

O'Connor, L., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., Strasser, A. 2000. "Apoptosis and cell division", *Curr Opin Cell Biol.*, 12(2), 257-63

Oh, W.J., Jacinto, E. 2011. "mTOR complex 2 signaling and functions", *Cell Cycle*, 10(14), 2305-16

Oltvai, Z.N., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J. 1993. "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death", *Cell*, 74(4), 609-19

Pellecchia, M., Reed, J.C. 2004. "Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins by natural polyphenols: new avenues for cancer chemoprevention and chemotherapy", *Curr Pharm Des.*, 10(12), 1387-98

Paoluzzi L, Gonen M, Bhagat G, vd.. 2008. "The BH3-only mimetic ABT-737 synergizes the antineoplastic activity of proteasome inhibitors in lymphoid malignancies", *Blood*, 112(7), 2906-16

Raught, B., Gingras, A.C., Gygi, S.P., Imataka, H., Morino, S., Gradi, A., Aebersold, R., Sonenberg, N. 2000. "Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI", *EMBO J.*, 19(3), 434-44

Saci, A., Cantley, L.C., Carpenter, C.L. 2011. "Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size", *Mol Cell*, 42, 50-61

Santoni, M., Pantano, F., Amantini, C., Nabissi, M., Conti, A., Burattini, L., Zoccoli, A., Berardi, R., Santoni, G., Tonini, G., Santini, D., Cascinu, S. 2014. "Emerging strategies to overcome

the resistance to current mTOR inhibitors in renal cell carcinoma”, *Biochim Biophys Acta.*, 1845(2), 221-231

Sato, T., Umetsu, A., Tamanoi, F. 2008. “Characterization of the Rheb-mTOR signaling pathway in mammalian cells: constitutive active mutants of Rheb and mTOR”, *Methods Enzymol.*, 438, 307-20

Semenza, G.L. 2009. “Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1”, *Semin Cancer Biol.*, 19(1), 12-6

Strasser, A., Puthalakath, H., Bouillet, P., Huang, D.C., O'Connor, L., O'Reilly, L.A., Cullen, L., Cory, S., Adams, J.M. 2000. “The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control”, *Ann N Y Acad Sci.*, 917, 541-8

Takeda, K., Naguro, I., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Ichijo, H. 2011. “Apoptosis signaling kinases: from stress response to health outcomes”, *Antioxid Redox Signal.*, 15(3), 719-61

Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., ve Blenis, J. 2003. “Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb”, *Curr. Biol.*, 13, 1259–1268

Tomita, Y. 2006. “Early renal cell cancer”, *Int J Clin Oncol.*, 11(1), 22-7

Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M. 1985. “The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining”, *Science*, 229(4720), 1390-3

van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., Adams, J.M., Roberts, A.W., Huang, D.C. 2006. “The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized”, *Cancer Cell*, 10(5), 389-99

Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Müllauer, F., Böck, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., Strasser, A. 2003. “p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa”, *Science*, 302(5647), 1036-8

Vogler, M., Dinsdale, D., Dyer, M.J., Cohen, G.M. 2009. “Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy”, *Cell Death Differ.*, 16(3), 360-7

Voss MH, Molina AM, Motzer RJ. 2011. “mTOR inhibitors in advanced renal cell carcinoma”, *Hematol Oncol Clin North Am*, 25(4), 835-52

Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., Kluck, R.M. 2011. “Molecular biology of Bax and Bak activation and action”, *Biochim Biophys Acta.*, 1813(4), 521-31

Yang, J., Ikezoe, T., Nishioka, C., Ni, L., Koeffler, H.P., Yokoyama, A. 2010. “Inhibition of mTORC1 by RAD001 (everolimus) potentiates the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) to induce growth arrest and differentiation of AML cells in vitro and in vivo”, *Exp Hematol.*, 38(8), 666-76

Yu, Y., Yoon, S.O., Poulogiannis, G., Yang, Q., Ma, X.M., Villén, J., Kubica, N., Hoffman, G.R., Cantley, L.C., Gygi, S.P., Blenis, J. 2011. "Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling", *Science*, 332(6035), 1322-6

Zall, H., Weber, A., Besch, R., Zantl, N., Häcker, G. 2010. "Chemotherapeutic drugs sensitize human renal cell carcinoma cells to ABT-737 by a mechanism involving the Noxa-dependent inactivation of Mcl-1 or A1", *Mol Cancer*, 9, 164

Zheng, L., Yang, W., Zhang, C., Ding, W.J., Zhu, H., Lin, N.M., Wu, H.H., He, Q.J., Yang, B. 2011. "GDC-0941 sensitizes breast cancer to ABT-737 in vitro and in vivo through promoting the degradation of Mcl-1", *Cancer Lett.*, 309(1), 27-36

Zhu Y, Zhang X, Liu Y, vd.. 2012. "Antitumor effect of the mTOR inhibitor everolimus in combination with trastuzumab on human breast cancer stem cells in vitro and in vivo", *Tumour Biol*, 33(5), 1349-62

Zou, H., Lai, Y., Zhao, X., Yan, G., Ma, D., Cardenes, N., Shiva, S., Liu, Y., Bai, X., Jiang, Y., Jiang, Y. 2013. "Regulation of mammalian target of rapamycin complex 1 by Bcl-2 and Bcl-XL proteins", *J Biol Chem.*, 288(40), 28824-30