

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI SOLİD TÜMÖRLERİNDE
RETİNOİK ASİTİN PI3K/AKT ve RAS/MAPK
YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN WESTERN
BLOT YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

Özde Elif GÖKBAYRAK

TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU:DEU.HSI.MSc-2017970063

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOCUKLUK ÇAĞI SOLİD TÜMÖRLERİNDE
RETİNOİK ASİTİN PI3K/AKT ve RAS/MAPK
YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN WESTERN
BLOT YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**

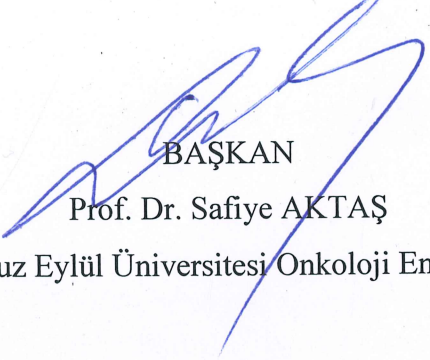
TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

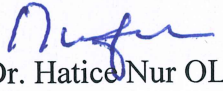
Özde Elif GÖKBAYRAK

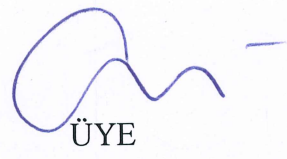
Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

TEZ KODU:DEU.HSI.MSc-2017970063

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Özde Elif GÖKBAYRAK'ın '**ÇOCUKLUK ÇAĞI SOLİD TÜMÖRLERİNDE RETİNOİK ASİTİN PI3K/AKT ve RAS/MAPK YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI**' konulu Yüksek Lisans tezini 11/01/2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


BAŞKAN
Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

ÜYE

Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü


ÜYE
Doç. Dr. Gülten DİNİZ
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi

YEDEK ÜYE
Prof. Dr. Zekiye SULTAN ALTUN
Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü

YEDEK ÜYE
Doç. Dr. Nüket ELİYATKIN
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ŞEKİL DİZİNİ	iv
TABLO DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Çocukluk Çağı Kanseri	2
2.1.1 Hücresel Çeşitlilik	3
2.1.2 Klinik Çeşitlilik	4
2.1.3 Genetik Çeşitlilik.....	5
2.2 Nöroblastom	6
2.2.1 Nöroblastomun Epidemiyolojisi	6
2.2.2 Nöroblastomun Etiyolojisi.....	7
2.2.3 Nöroblastomun Onkogenik Faktörleri ve Transkripsiyonel Ağlar.....	7
2.2.4 MYCN Amplifikasyonu	8
2.2.5 ALK Mutasyonu.....	9
2.2.6 PHOX2B Geni	9
2.2.7 17q Bölgesinde Fazlalık	10
2.2.8 1p Delesyonu (1p LOH)	10
2.2.9 11q Delesyonu (11q LOH)	10
2.3 Evreleme.....	11
2.4 Retinoik Asit	11
2.4.1 Genel Bilgiler	11
2.4.2 Retinoik Asit Reseptörleri	12
2.4.3 Retinoik Asit ve Kanseri	14
2.5 Takrolimus.....	15

2.5.1 Genel Bilgiler	15
2.5.2 Etki Mekanizması	15
2.6 Sisplatin	17
2.7 PI3K /AKT Yolağı	22
2.7.1 PI3K /Akt Yolağı ve Kanser	25
2.8 RAS-MAPK Yolağı	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1 Araştırmanın Tipi	31
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	31
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	31
3.4 Çalışma Materyali	31
3.5 Çalışmanın Değişkenleri	31
3.6 Veri Toplama Araçları	32
3.6.1 Hücre Kültürü	32
3.6.2 Hücre Pasajı	32
3.6.3 <i>In vitro</i> Deneyler	33
3.6.4 MTT ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	34
3.6.5 Toludin Mavisi ile Morfoloji Değerlendirilmesi	34
3.6.6 İmmünohistokimyasal Boyama ile Protein Belirlenmesi	35
3.6.7 İmmünoiblot Yöntemiyle Protein Değişimlerinin Gösterilmesi	36
Tablo 1: Antikor Listesi	38
3.7 Araştırma Planı ve Takvimi:	39
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi:	39
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları:	39
3.10 Etik Kurul Onayı:	40
4.BULGULAR.....	41
4.1 RA'nın Hücre Canlılığına Etkisi.....	41
4.2 Takrolimus'un Hücre Canlılığına Etkisi.....	42
4.3 Toludin Mavisi Boyaması ile Morfoloji Değerlendirmesi.....	44
4.4 İmmünohistokimyasal Boyamalar ile Protein Yüzdelilerinin Belirlenmesi.....	45
4.5 İmmünoiblotlama Yöntemi ile Protein Belirlenmesi	51

5.TARTIŞMA.....	53
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	59
7.KAYNAKLAR	60
8. EKLER.....	70
8.1. EK-1 Etik Kurul Onayı	70
8.2. Özgeçmiş	73



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.4.2.1 Retinoik Asit Reseptörleri ve Aksiyon Mekanizması.....	13
Şekil 2.5.2.1Hücrede Kalsinörin İnhibitörleri ve Etki Mekanizması:.....	16
Şekil 2.6.1 Sisplatinin Hedefleri :.....	19
Şekil 2.7.1 PI3K/Akt sinyal yolunun düzenlenmesi için model	23
Şekil 2.8.1 RAS/MAPK yolağı:.....	29
Şekil 3.6.7 Örneklerin jele yüklenmesi	37
Şekil 4.1.1 Retinoik Asit'in KELLY ve LAN5 Hücre Hatlarında Canlılığa Olan Etkisi .:.....	42
Şekil 4.2.1 Takrolimus'un KELLY ve LAN5 Hücre Hatlarında Canlılığa Olan Etkisi.....	43
Şekil 4.3.1 Toludin Mavisi ile Boyanan NB Hücreleri.....	44
Şekil 4.4.1 KELLY hücrelerinde Akt protein yüzdeleri.....	45
Şekil 4.4.2 LAN5 hücrelerinde Akt protein yüzdeleri.....	46
Şekil 4.4.3 Kelly hücrelerinde Ki67 proliferasyon indeksi.....	47
Şekil 4.4.4 LAN5 hücrelerinde Ki67 proliferasyon indeksi.....	47
Şekil 4.4.5 NB hücrelerinde Akt proteininin immünohistokimyasal değerlendirmesi.....	48
Şekil 4.5.1 LAN5 hücrelerinde Akt protein ekspresyonu.....	51
Şekil 4.5.2 KELLY hücrelerinde Akt protein ekspresyonu	52

TABLO DİZİNİ

TABLO 1: ANTİKOR LİSTESİ	38
--------------------------------	----



KISALTMALAR

AD: Alzheimer Hastalığı
ALK: Anaplastik Lenfoma Kinaz
APL: Akut Promiyelositik Lösemi
ATRA: All- trans Retinoik Asit
CDDP: Sisplatin
CNV: Kopya Sayısı Varyasyonu
CRABP: Hücresel Retinoik Asit Bağlama Proteini
CsA: Siklosporin A
CTMP: Karboksi Terminal Modülasyonlu Protein
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DUSP1: Çift Özgüllük Fosfataz 1
EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FBS: Fötal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum)
FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FKBP-12: Takrolimus Bağlayıcı Protein
FYVE: Fab1, YOTB, Vac1, EEA1
GDP: Guanozin Difosfat
GEF: Guanin Nükleotit Değişim Faktörü
GN: Gangliyonöroma
GNB: Gangliyonöroblastoma
GPCR: G Proteinine Bağlı Reseptör
GSK-3: Glikojen Sentaz Kinaz -3
GTP: Guanozin Trifosfat
IF γ : İnterferon gama

IL-2: İnterlökin-2
IL-4: İnterlökin-4
ILK: İntegrin Bağımlı Kinaz
INSS: Uluslar arası Nöroblastoma Evreleme Sistemi
LD50: Letal doz 50
MAPK: Mitojenle Aktive Protein Kinaz
MHC II: Majör Doku Uyumu Karmaşık Tip II
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
mTOR: Rapamisinin Memeli Hedefi
MTT: 3-(4,5 Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NB: Nöroblastom
NFAT: Aktif T Hücrelerinin Nükleer Faktörleri
NF-κB: Nükleer Faktör Kappa-B
NT: Nöroblastik Tümörler
PBS: Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate buffered saline)
PD: Parkinson Hastalığı
PDK: Fosfoinositide Bağımlı Kinaz
PH: Plekstrin Homoloji
PI3K: Fosfatidilinositol 3 –kinaz
PKA: Protein Kinaz A
PKB: Protein Kinaz B
PKC: Protein Kinaz C
PLC: Fosfolipaz C
PST: Pediatrik Solid Tümör
PTEN: Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RA: Retinoik Asit
RALDH: Retinaldehid Dehidrogenaz
RalGDS: Ral Guanin Nükleotit Ayrılma Uyarıcı
RAR: Retinoik Asit Reseptör
RARα: Retinoik Asit Reseptör α

RARE: Retinoik Asit Yanıt Molekülleri

RARy: Retinoik Asit Reseptör y

RB1: Retinoblastom Protein 1

RDH: Retinaldehid

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

RTK: Reseptör Tirozin Kinaz

RXR: Retinoid X Reseptör

SV: Yapısal Varyasyon

TAC: Takrolimus

TGF β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü β

TIAM1: T Hücre Limfoma İnvazyon ve Metastaz 1

TP53: Tümör Protein 53

TSC2: Tüberküloz Skleroz Kompleksi -2

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansımı tamamlarken bana yardımcı olan, bilgileriyle bana yol gösteren ve örneğim olan danışman hocam Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a, bana tüm imkanları sağlayan enstitü müdürümüz Prof.Dr. Nur OLGUN'a

Deneylerim süresince bana destek olan laboratuvar ekibime ve her koşulda beni destekleyen, birlikte çok şey paylaştığım, birlikte büyüdüğüm, hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, bütün sevgisiyle yanımda olan can dostum Aylin EROL'a,

En değerli varlığım olan aileme, bana her daim destek olan, bana sonsuz güvenen annem Deniz GÖKBAYRAK'a, babam Göktürk GÖKBAYRAK'a, teyzem Filiz MERGEN'e, anneannem Şeküre MERGEN'e ve ortağım İrem GÖKBAYRAK'a,

Benden uzakta olmasına rağmen, bana olan inancını hiç eksiltmeyen, sevgisiyle her daim yanımda olan ve hayatımda olduğu için kendimi her zaman şanslı hissettiğim can kardeşim Erenay ÇERİ'ye teşekkür ediyorum.

Özde Elif GÖKBAYRAK

ÇOCUKLUK ÇAĞI SOLİD TÜMÖRLERİNDE RETİNOİK ASİTİN PI3K/AKT ve RAS/MAPK YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

Özde Elif GÖKBAYRAK, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Nöroblastom (NB) , nöral krestten köken alan embriyonik bir tümördür. 5 yaş altı çocuklarda en sık görülen ekstrakraniyal solid tümördür. İleri evre hastalıkta yoğun protokoller ve alternatif tedavi yaklaşımlarına rağmen iki yıllık sağkalım yüzdesi %30–40'lara ancak ulaşmaktadır. Kanser hücrelerinin ajanlarla uyarılarak diferansiye edilmesi, anti-neoplastik tedavide umut verici bir strateji haline gelmiştir. Retinoik asit (RA) klinik olarak nöroblastomda hücresel diferansiasyonu indükleme özelliği açısından kullanılmaktadır. RA *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda terapötik potansiyelin açısından halen incelenmeye devam eden bir ajandır. Retinoidlerin hücrelerdeki biyolojik etkileri, retinoik asit reseptör (RAR) ve retinoid X reseptör (RXR)'ye bağlanan ligandlar aracılığıyla gerçekleşmektedir. PI3K/AKT ve RAS/MAPK yolları kanserde sırası ile survival ve hücre proliferasyonu ilişkili yollarlardır. Bugüne dek nöroblastom ve medulloblastom hücrelerinde özellikle PI3K/AKT yolu daha yoğun incelenmiştir. Buna karşın NB hücrelerinde RAS/MAPK ve ilişkili ERK1/2 yolu RA ve sisplatin ile ilişkisi incelenmemiştir. Bu çalışmanın amacı çocukluk çağı solid kanserlerinin önemli bir grubunu oluşturan NB iki adet hücre hattı olan KELLY ve LAN5 hücrelerinde hücrelerinde diferansiye edici ajan RA ve sisplatin (CDDP) ve Takrolimus 'un (Tac) etkisini incelemektir.

Bu amaçla hücre kültüründe üretilen KELLY ve LAN5 hücrelerine LD50 saptanarak bu dozlar uygulanmıştır. PI3K/AKT ve RAS/MAPK ilişkili ERK1/2 yolu üzerinde etkisi için Akt, p44 (Erk1/2), Ras ve EGFR protein ekspresyonları immünohistokimyasal ve Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Diferansiyasyon Toluidin Blue boyamasında morfolojik olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak non-parametrik Mann-Whitney U ve Ki- Kare testleri, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde kullanılmıştır.

RA, PI3K/AKT ve RAS/MAPK ilişkili ERK1/2 yolu üzerine istatistiksel anlamlı düzeyde etki etmediği ancak diferansiyasyon ve proliferasyon durdurucu etkisinin ön planda olduğu saptanmıştır.

Tac, Akt ekspresyonunu arttırdığı için NB’de iyi bir tedavi adayı değil gibi gözükmemektedir. RA’nın RA, PI3K/AKT ve RAS/MAPK ilişkili ERK1/2 yolağı üzerine etkili olmaması, aday bir metronomik diferansiye edici ajan olma önemini desteklemektedir. Diferansiye edici bir ajanın bu yolağı anti- kanser yönde etkilemesi beklenmemektedir.

Anahtar Kelimeler: Nöroblastom, Retinoik Asit, Sisplatin, Sinyal Yolakları



DETERMINING THE EFFECT OF RETINOIC ACID ON PI3K/AKT AND RAS/MAPK PATHWAYS ON CHILDHOOD SOLID TUMORS BY USING WESTERN BLOT

Özde Elif GÖKBAYRAK, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences,
Department of Oncology, 35340, Inciralti, İzmir

ABSTRACT

Neuroblastoma is an embryonic tumor originating from the neural crest. It is the most common extracranial solid tumor in children under 5 years of age. Despite intensive protocols and alternative treatment approaches in advanced-stage disease, the two-year survival rate is only 30-40%. Differentiation of cancer cells by stimulation with agents has become a promising strategy in anti-neoplastic therapy. Retinoic acid (RA) has been clinically used to induce cellular differentiation in neuroblastoma. RA is an agent that continues to be investigated in terms of therapeutic potential in in-vitro and in-vivo studies. The biological effects of retinoids in the cells are mediated through ligands that bind to retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR). PI3K/AKT and RAS/MAPK are pathways that associated with survival and cell proliferation in cancer. Up to date, PI3K/AKT pathway has been studied more intensively in neuroblastoma cells. In contrast, the relationship between RAS/MAPK and associated ERK1/2 pathway, RA and cisplatin in NB cells has not been investigated. The aim of this study is to determine the effect of RA, cisplatin and combinations on the protein expressions of AKT, Bcl-2, MAPK (Erk1/2), and Ras related to PI3K/AKT and RAS/MAPK-related ERK1/2 pathways in two childhood solid tumor types of NB cells.

For this purpose, LD50 was detected in KELLY and LAN5 cells produced in cell culture and these doses were applied. For the effect on PI3K / AKT and RAS / MAPK-associated ERK1 / 2 pathway, Akt, p44 (Erk1 / 2), Ras and EGFR protein expressions were evaluated by immunocytochemical and Western Blot method. Differentiation was morphologically evaluated in Toluidin Blue staining. Non-parametric Mann-Whitney U and Chi-square tests were used statistically.

RA showed no significant effect on PI3K / AKT and RAS / MAPK-associated ERK1 / 2 pathway, but differentiation and proliferation inhibiting effect were at the forefront.

Tac appears to be not a good candidate for treatment because it increases Akt expression. The fact that RA is not effective on RA, PI3K / AKT and RAS / MAPK-related ERK1 / 2 pathway supports the importance of being a candidate metronomic differentiation agent. It is not expected that a differentiating agent will affect this pathway in an anti-cancer direction.

Keywords: Neuroblastoma, Retinoic Acid, Cisplatin, Signal Pathways

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöroblastom (NB) , nöral krestten köken alan embriyonik bir tümördür. 5 yaş altı çocuklarda en sık görülen ekstrakraniyal solid tümördür. İleri evre hastalıkta yoğun protokoller ve alternatif tedavi yaklaşımlarına rağmen iki yıllık sağkalım yüzdesi %30–40'lara ancak ulaşmaktadır. Bu çalışmanın amacı NB hücrelerinde diferansiye edici ajan Retinoik Asit (RA) , kalsinörin inhibitörü Takrolimus (Tac) ve sisplatin (CDDP)'in PI3K/AKT ve RAS/MAPK ilişkili ERK1/2 yolağı üzerinde etkisini Akt, Bcl-2, MAPK(Erk1/2) ve Ras protein ekspresyonları aracılığıyla incelenmesidir. Bu çalışma sonucunda elde edilecek bilgiler ışığında özellikle RA, Tac ve CDDP ajanlarının NB hücrelerine etki mekanizmaları daha ayrıntılı olarak ortaya konmuş olacaktır. Bu çalışmanın amacı retinoidlerin terapötik potansiyelini araştırmak ve NB' deki hareket mekanizmalarını anlamaktır.

Hipotezler:

- 1- RA, NB hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder.
- 2- RA , NB hücrelerini diferansiye ederek apoptotik hücre ölümüne sürükler.
- 3- RA, NB hücrelerinde anti proliferatif etkisini PI3K/AKT ve RAS/MAPK ilişkili ERK1/2 yolağı üzerinden gösterir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Çocukluk Çağı Kanserleri

Pediyatrik solid tümörler (PST), pediyatrik kanserlerin yaklaşık %50'sini temsil eden heterojen bir malignite grubudur. Ekstrakraniyal solid tümörler ve merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri olarak ayrılabilirler. Bunlar çocukluk çağı malignitelerinin %20-25'ini oluşturup, çocuklarda en sık görülen solid tümörlerdir. Nöroblastom, Wilms tümörü, rabdomiyosarkom, osteosarkom ve Ewing sarkomu, çocukluk çağında en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörleri temsil eder (Ring, Markert et al. 2017). Çocukluk çağı kanserleri ortak moleküler, hücresel yada genetik özellikler yerine, yaygın olarak anatomik lokasyonları üzerinden sınıflandırılmaktadır (Chen, Pappo et al. 2015). Hematolojik maligniteler kan, kemik iliği ve lenfoid sistemi kanserleridir. Beyin tümörleri merkezi sinir sisteminin intrakraniyal kanserleridir ve katı tümörler ekstrakraniyal non-hematolojik kanserlerdir. PST'ler, epitelyal hücrelerden (örneğin, adrenokortikal karsinom) ve mezenşimal hücrelerden (örneğin Ewing sarkomundan) türetilen sarkomlardan elde edilen karsinomları içerir. Hematolojik malignitelerden veya beyin tümörlerinden farklı olarak, katı tümörler, üç germ hücre soylarından herhangi birinde ortaya çıkabilir: mezoderm, endoderm veya ektoderm (Chen, Bahrami et al. 2014).

PST'lerin genetiği, 1986'da ilk insan tümör baskılayıcı geninin (RB1) tanımlanmasından beri çalışılmaktadır (Friend, Bernards et al. 1986). Yeni nesil sekanslama (NGS) teknolojilerinin tanıtılması ve PST'lerde karmaşık somatik mutasyonların tanımlanmasını mümkün kılan veri analizlerinin geliştirilmesi ile PST genomiklerinde yenilikler yaşanmıştır (Downing, Wilson et al. 2012).

2.1.1 Hücresel Çeşitlilik

PST histolojik özelliklerinde oldukça farklıdır. Örneğin, retinoblastoma tümör hücreleri küreler halinde organize olur ve nöronal süreçleri kürenin merkezine uzatır. Bu süreçler sinaptik veziküller içerir, sinaptik eklemler oluşturur ve nörotransmitterler biriktirir (Johnson, Zhang et al. 2007). Aksine, rabdomiyosarkom tümör hücreleri bol glikojen içerir ve iskelet kasını anımsatan miyofibrillere sahiptir (Chen, Stewart et al. 2013).

Tümör oluşumunu başlatan ve destekleyen onkogenler ve tümör baskılayıcı genler de normal gelişim süreçlerinde önemli rollere sahiptir. Böylelikle, tek tek hücreler, malign dönüşüm geçirdikçe, aynı anda hücre kaderi spesifikasyonu ve farklılaşmasında da değişime uğrayabilirler. Örneğin, RB1 inaktivasyonu, hücre döngüsü ilerlemesini destekleyerek retinoblastomun başlatılmasına katkıda bulunur, fakat RB1 proteini de çubuk fotoreseptör farklılaşması için gereklidir (Zhang, Gray et al. 2004).

Hücresel çeşitlilik ve malign dönüşümdeki bir başka önemli nokta da gelişimsel yeterliliktir. PST'ler kompleks ve dinamik gelişmekte olan dokularda, farklılaşmış hücre tipleri üretmek için kendi içsel yeterliklerinde tek yönlü değişiklikler geçiren çok-noktalı progenitör hücreler olarak ortaya çıkarlar (Cepko, Austin et al. 1996). Spesifik tümör mutasyonları ve farklılaşma programları arasındaki integrasyon, dinamik intrinsik hücresel yeterlilik ile birleştiğinde, ortaya çıkan tümörlerin moleküler veya hücresel özellikleri orijin hücreyi saptamayı zorlaştırır. Bunun yerine, PST'lere potansiyel olarak katkıda bulunan hücresel soylardaki hücre kaderi spesifikasyonu ve farklılaşmasının ve bu soylardaki spesifik genetik lezyonların farklı gelişim aşamalarında etkisinin incelenmesi daha bilgilendiricidir (Hatley, Tang et al. 2012).

2.1.2 Klinik Çeşitlilik

Hücrel çeşitliliğe ek olarak klinik çeşitlilik; PST'lerin gelişimsel kökenleri hakkında da önemli ipuçları sağlayabilir. İlk olarak, tanı yaşı genellikle belirli tümör tipleri için ayırdır. Retinoblastomlar, bebeklerde en sık görülen tümörlerdir ve nadiren, 5 yaşından sonra teşhis edilir. Retinal progenitör hücre proliferasyonu ilk iki trimesterde görülür ve prematüre bebeklerin retinoblastom tanısı aldığı bildirilmiştir (Abramson, Scheffler et al. 2002).

Retinoblastomun aksine, osteosarkom yaygın olarak adolesanlarda teşhis edilir. Osteosarkomun tepe insidansı ergenlik döneminde iskelet sisteminin hızlı büyümesi ile çakışmaktadır (Mirabello, Troisi et al. 2009). Osteoblastlar, bu gelişim döneminde, muhtemelen malign transformasyona ve osteosarkoma oluşumuna daha duyarlı hale geldiklerinde hızlı genişleme geçirebilirler. Bununla birlikte, osteoblastların osteosarkom için orijin hücre olduğu henüz kanıtlanmamıştır. Tamamen farklı bir soyun, somatik mutasyonların bir sonucu olarak bir osteojenik fenotipi benimsemesi mümkündür. Ayrıca, adolesanlarda hormon seviyeleri, sitokinler veya kemokinlerdeki değişiklikler osteosarkomun başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunabilir (Ruza, Sotillo et al. 2003).

Retinoblastomda olduğu gibi, osteosarkomun genomik analizi, hücrel kökenleri ve kemik tümörü oluşumuna katkıda bulunabilecek iç ve dış faktörleri araştırmak için önemli bir temel sağlamıştır. Bütün genom dizileme çalışmaları, p53 yolunun hemen hemen tüm osteosarkomlarda inaktive olduğunu göstermektedir. TP53 inaktivasyonu olağandışı olmamasına rağmen, inaktivasyon mekanizması benzersizdir. Osteosarkomlardaki TP53 mutasyonlarının çoğunluğu, genin ilk intronunda translokasyonlardır. Bu mekanizma o kadar yaygındır ki, bazı osteosarkomlar TP53'te iki bağımsız yapısal varyasyona sahiptir (Chen, Bahrami et al. 2014).

2.1.3 Genetik eřitlilik

Osteosarkom ve retinoblastoma, PST'lerin genomik tablosunun iki ucunu temsil eder. Retinoblastomlar tümör başına 14.5 (medyan) yapısal varyasyona (SVs) sahiptir (aralık 0-96), genomlarının% 10'u kopya sayısı varyasyonlarında (CNV'ler) (% 0-95) yer alır ve kodlama bölgelerinde ortalama 3.5 tek nükleotid varyasyonuna sahiptir (aralık 0–32).Retinoblastomda ereve-füzyon proteinleri üreten translokasyonlar nadirdir. Bunun aksine, osteosarkomlar tümör başına 266 SVs (47-1135), genomlarının% 50'si CNV'lerde (% 3-89) yer alır ve kodlama bölgelerinde 46 (tek aralık) 16- 237) nükleotid varyasyonları vardır (Chen, Pappo et al. 2015).

Genomik veriler arasındaki farklar için bir açıklamalardan birisi, her iki katı tümör tipi de retinoblastomların stabil olduğu genomlar ve osteosarkomlar stabil olmayan genomlara sahip olmasıdır. Ancak genomik veriler kullanılırken genom stabilitesi hakkında kesinlik bulunmamaktadır. Bunun sebebi ise şudur; genellikle bir tümörün genomik görüntüsü, tek bir zaman noktasında ve an ploidide analiz edilir ve tümörlerde bol miktarda SV ve CNV'nin genomik instabilite nedeniyle ortaya çıktığı düşünülür. Özetle, tümör hücreleri sıradan genetik lezyonları normal hücrelerden daha yüksek bir hızda biriktirebilirler (Stephens, Greenman et al. 2011).

2.2 Nöroblastom

Nöroblastom (NB), genç çocukların nöral kresteki embriyonik sempatoadrenal soyundan kaynaklanan gelişimsel bir tümördür. Günümüzde NB, 1-5 yaş arası çocuklarda pediatrik kanserin birincil ölüm sebebidir ve tüm pediatrik kanser mortalitesinin yaklaşık% 13'ünü oluşturur (Louis and Shohet 2015). Nöroblastik tümörler (NT), sempatik sinir sisteminin embriyolojik gelişimi boyunca değişken derecelerde hücre olgunlaşmasına sahip bir spektrumu temsil eder ve 3 ana kategoriye içerir: nöroblastom (NB), gangliyonöroblastoma (GNB) ve gangliyonöroma (GN) (Picarsic and Reyes-Mugica 2015). Malignitenin derecesi, bu tümörlerin hücre ve hücre dışı olgunlaşması derecesi ile belirlenir. Küçük çocuklarda en farklılaşmamış ve agresif NBL sunar. Daha olgun tümör tipi, daha büyük yaş gruplarını etkileyen GN'dir (Papaioannou and McHugh 2005).

Bebeklikte kendiliğinden gerileme eğilimi olan NB'nin prognozu, tümör proto-onkojenleri, DNA içeriği ve katekolamin sentezi gibi çeşitli parametrelerden etkilenir. Bu parametrelerin kullanımı tümör sınıflandırmasını düşük, orta veya yüksek riskli hale getirir (Rha, Byun et al. 2003).

NB, spontan regresyondan standart ve anti-kanser tedavisine yanıt vermeyen yüksek derecede agresif metastatik hastalıklara kadar uzanan biyolojik heterojenliği ve klinik davranış aralığı nedeniyle diğer katı tümörlerden farklı kalır (Monclair, Brodeur et al. 2009).

2.2.1 Nöroblastomun Epidemiyolojisi

NB ilk olarak 1863'te Virchow tarafından tanımlandı(Lonergan, Schwab et al. 2002). NB, Wilms tümörü ve genel olarak üçüncü en yaygın pediatrik maligniteyi takiben lösemi ve santral sinir sistemi tümörleri sonrası çocuklarda en sık görülen ikinci abdominal neoplazmdır (Kushner 2004). Çocukluk çağı kanser ölümlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur, bu da saldırgan doğasını ve tanı anında metastatik hastalık sıklığını yansıtan bir sayıdır. Çoğu NBkaynaklı ölüm, 2 yıllık tanı sırasında ortaya çıkar (Boubaker and Bischof Delaloye 2003). Tanıdaki ortalama yaş 22 aydır. Teşhis edilen vakaların %90'ından fazlası, 5 yaşından büyük, 2-3

yaşlarında en yüksek insidansı olan, yenidoğan veya hatta antenatal NB'nin ortaya çıktığı; birçok yenidoğan vakası benign lezyonlara kendiliğinden gerileme veya matürasyon nedeniyle kaçmayı saptamaktır (Lonergan, Schwab et al. 2002).

NB, herhangi bir gelişimsel, konjenital veya kalıtsal sendromun bir parçası olarak kabul edilmez ve başka herhangi bir malignite ile ilişkili değildir. Ekzojen nedensel faktörler epidemiyolojik olarak tanımlanmamıştır. Genetik tümör genezi teorisi muhtemelen NB için geçerlidir, kromozom 1'in kısa kolu (kromozom 1p36) ve kromozom 16p12-13 olası predispozisyon lokusları olarak bilimsel ilgi odağıdır (Kushner 2004).

2.2.2 Nöroblastomun Etiyolojisi

NB'ler, Zuckerkandl'in organı olan adrenal bezlerden ya da sempatik ganglionların boyundan pelvise kadar paraspinal bölgeler boyunca dağılımını izler. NB gelişimi için en yaygın primer alan retroperiton, adrenal medulla (%35) ve ekstra adrenal paraspinal gangliyonlar (%30–%35), %20'sinde mediastinum izlenmektedir (Rha, Byun et al. 2003). NB, periferik sempatik sinir sisteminin nöronal gangliyonlarında ortaya çıkan gelişimsel bir malignitedir. Bu nöronal yapılar, embriyogenez sırasında nöral tüpün uzağından göç eden ventrolateral nöral krest hücrelerinden türemektedir (Betters, Liu et al. 2010).

Uzun süreli sağkalım öncelikle farklılaşma derecesine bağlıdır, daha ilkel krest benzeri tümörler sergileyen hastalar daha olumlu sonuçlar veren daha farklı tümörlere sahip hastalardan daha kötüdür (Fredlund, Ringner et al. 2008). Bu malignitenin yaygın klinik ve patolojik heterojenliği, nöral krestin gelişimsel biyolojisini yansıtmaktadır (Takahashi, Sipp et al. 2013).

2.2.3 Nöroblastomun Onkogenik Faktörleri ve Transkripsiyonel Ağlar

NB tümör oluşumunun kökenleri nöral krest prekürsörlerinin gelişiminin bozulmasından kaynaklanırken, 1000'den fazla vakanın DNA'sı ve RNA dizilemesinden sonra, tüm NB vakalarını hesaba katmak için hiçbir genetik veya epigenetik mutasyon bulunmamıştır (Pugh, Morozova et al. 2013). Benzer şekilde, yapısal genomik değişiklikler NB tümörögenezine bağlanmamıştır. Örneğin, 1 p delesyonu, MYCN amplifikasyonu veya 17q kazanımı nöroblastomun alt tiplerini ve çarpışma sağkalımını tanımlayabilir, ancak yaygın bir

nöroblastomaya özgü genomik değişiklik, LOH veya tüm yüksek riskli nöroblastom tümörlerine tek tip olarak verilen genetik translokasyon yoktur (Theissen, Oberthuer et al. 2014). Dolayısıyla, bu geniş moleküler heterojenite, nöroblastomun bir hastalık spektrumunu temsil ettiği kavramını desteklemektedir. Klinik olarak, bu, fenotipik ve morfolojik olarak çok benzer olan tümörler, tedaviye son derece farklı tepkiler verebildikleri için zorluk meydana gelir. Sonuç olarak yoğun çabalar, en agresif ve ölümcül alt türlerde aktif olan transkriptomları ve onkojenik yolları karakterize etmeye odaklanmıştır (De Preter, Vermeulen et al. 2010).

2.2.4 MYCN Amplifikasyonu

MYCN geni ikinci kromozomun kısa kolunda bulunan 2p24 bölgesinde bir gendir. MYCN onkojen, nöroblastoma tümör oluşumunda önemli bir rol oynar ve agresif bir tümör alt kümesini tanımlar. Genel olarak vakaların yaklaşık% 20'sinde MYCN'nin amplifikasyonu (10'dan fazla kopya olarak tanımlanmıştır) bulunur ve özellikle kötü bir prognoz sağlar. İyi tanımlanmış transgenik fare modelleri, nöral kresti hedef alan deregüle MYCN ekspresyonunun, yüksek penetrans ile tümör oluşumunu ilerletmek için yeterli olduğunu doğrulamaktadır(Hansford, Thomas et al. 2004). Bu transkripsiyon faktörü, dolaylı protein / protein etkileşim mekanizmalarının yanı sıra, doğrudan DNA bağlanması yoluyla genetik hedefleri (örneğin mRNA, miRNA'lar, lncRNA'lar) aktive eder ve bastırır (Schramm, Koster et al. 2013). Hem MYCN hem de MYCC (C-MYC), anti-p53, pro-proliferatif fonksiyonları ve pro-EMT fonksiyonlarını iyi tanımlamıştır (Huang and Weiss 2013). Normal embriyogenez ve nöral krest gelişmesi sırasında, MYCN geçici olarak sempatik gangliyon haline gelen ventral-lateral migrasyon kret hücrelerinde ifade edilir. Bu nedenle, kötü diferansiye agresif nöroblastomaların bir alt kümesinde yüksek MYCN seviyelerini bulmak şaşırtıcı değildir (Wakamatsu, Watanabe et al. 1997).

2.2.5 ALK Mutasyonu

ALK'nin (anaplastik lenfoma kinaz) aktive edici mutasyonları da nöroblastomun onkojenik sürücüleri olarak rol oynamaktadır. Mutasyonlar hemen hemen tüm ailesel nöroblastoma vakalarında (toplam NB vakalarının <% 1'i) ve kendiliğinden vakaların% 6-10'u arasında bulunur. Bu reseptör tirozin kinaz (RTK), tipik olarak bir yer değiştirmiş füzyon geni (ALK-NPM) olarak bulunduğu lenfoma ve akciğer kanserlerinde bir onkojen olarak rol oynamaktadır(Ardini, Magnaghi et al. 2010).

Son zamanlardaki çalışmalar, Zebra balığı modellerinde nörogenez için gerekli olmasının yanı sıra, sempatik nöron gelişimini ve göç nöron krest hücrelerinin hayatta kalmasını ALK ile ilişkilendirmektedir. Bu gen, STAT3'e bağımlı kendini yenileme de dahil olmak üzere kök hücre fonksiyonlarının önemli bir düzenleyicisidir ve MYCN'nin transkripsiyonel hedefi olarak yüksek ekspresyon, kötü sonucu öngörmektedir (Wang, Zhou et al. 2013).

Genetik olarak tasarlanan nöroblastoma fare modellerinden elde edilen son veriler ALK ve MYCN'nin tümör oluşumunu teşvik etmek için işbirliği yaptığını doğrulamaktadır. Not olarak, bu kinaz ilaç hedeflemeye uygundur ve güçlü ALK inhibitörleri ALK mutanları nöroblastoma için halihazırda klinik çalışmalarda bulunmaktadır (Schulte, Lindner et al. 2013).

2.2.6 PHOX2B Geni

Ailesel nöroblastomun bir alt kümesinde ve sporadik vakaların yaklaşık% 4'ünde Eşlenik benzeri Homeobox 2B'nin (PHOX2B) mikrop hattı mutasyonları bulunur (Trochet, Bourdeaut et al. 2004). PHOX2B ve PHOX2A, nöral krest öncüllerinin sempatik nöronlara doğru farklılaşmasını sağlar. Bu yoldaki mutasyonlar, Hirschsprung hastalığı ve merkezi hipoventilasyon sendromu gibi sempatik ve parasempatik soyları içeren nörokristopatiler ile ilişkilidir (Wang, Zhong et al. 2014).

Son zamanlarda, PHOX2B fonksiyon kaybı mutasyonlarının, kalsiyum regülasyonunu bozarak nöroblastoma farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir (Di Lascio, Bachetti et al. 2013). PHOX2B ayrıca nöroblastomda ALK ifadesini de inhibe edebilir; Ayrıca PHOX2B

fonksiyonunun kaybının, nöroblastoma tümörlerinin bir alt kümesinin patojenezine katkıda bulunduğunu ileri sürmektedir (Bachetti, Di Paolo et al. 2010).

2.2.7 17q Bölgesinde Fazlalık

NB'da 17. kromozom uzun kolunda allelik fazlalığı saptanmaktadır. Tek başına (+17q) veya t (1;17) şeklinde ortaya çıkabilir. Agresif tümör ve kötü prognozla ilişkilidir (Butler Tjaden and Trainor 2013).

2.2.8 1p Delesyonu (1p LOH)

Tanı sırasında tümör dokusunda % 25-35 oranında saptanmaktadır. İleri evre hastalarda daha sık görülür. Ayrıca MYCN amplifikasyonu ile birlikteliği fazladır (Mosse, Laudenslager et al. 2004). 1p36 bölgesinde oluşan delesyon, bu bölgedeki tümör supresör genin kaybına neden olur ve hastalarda mental gerilik, kranio-fasiyal belirtiler görülür. Varlığı kötü prognozla ilişkilidir (Butler Tjaden and Trainor 2013).

2.2.9 11q Delesyonu (11q LOH)

Tanıda olguların % 35'inde vardır. Enterasan olarak 11qLOH delesyonu var ise MYCNamplifikasyonu bulunmaz. Fakat yine de yüksek risk özellikleri (büyük yaş, ileri evre, kötüpatoloji) ile birliktelik göstermekte olup ve kötü prognostik bir gösterge olarakdeğerlendirilmektedir(Pei, Luther et al. 2013).

2.3 Evreleme

İlk kez 1988 yılında yayınlanan Uluslararası Nöroblastoma Evreleme Sistemi (INSS), hastanın evresini tanımlamak için ilk cerrahi prosedürün kapsamını kullanmıştır (Brodeur, Seeger et al. 1988). Tamamen kesip çıkartılan küçük lokalize tümörler Evre I lezyonlar olarak kabul edilmiştir. Evre II tümörler küçüktür, lenf nodu tutulumu olduğu kesin değildir ancak tamamen çıkartılmamıştır. Evre III lezyonlar, hastanın anatomik orta hattını geçen ve tamamen kesilemeyen büyük tümörlerdir. Son olarak, evre IV ve IVS metastatik tümörler, IVS hastalarının karaciğerde, deride ve kemik iliğinin % 10'undan azında bulunan metastatik hastalığı olan <1 yaşından büyük olmasıyla farklılaşmıştır (Owens and Irwin 2012).

2.4 Retinoik Asit

2.4.1 Genel Bilgiler

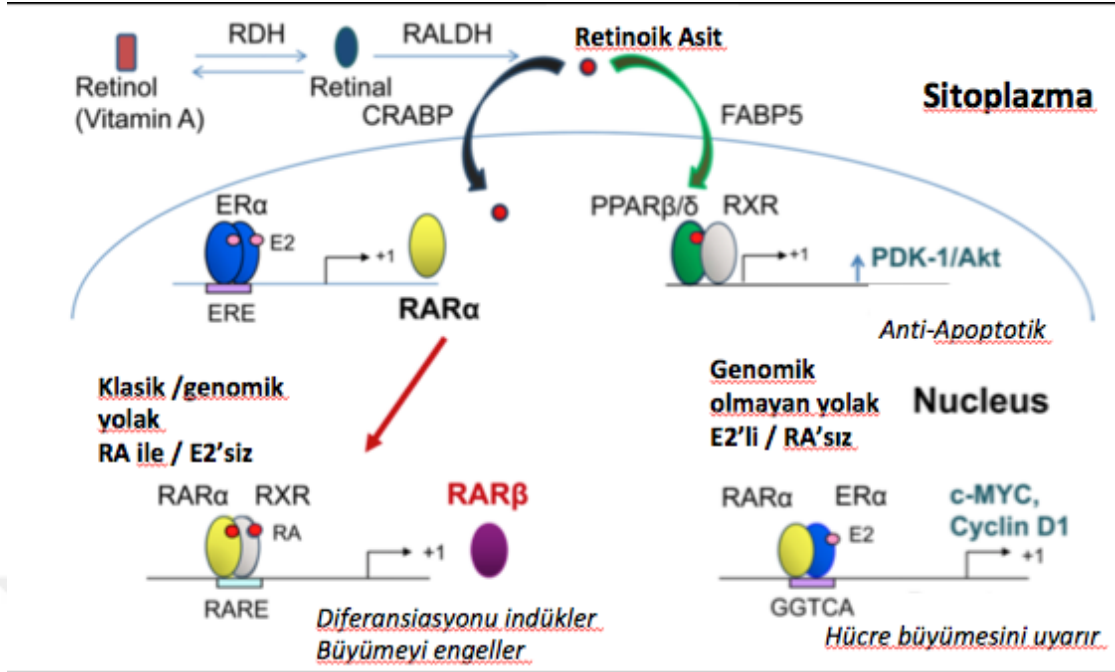
All-trans retinoik asit (ATRA), vücudun işlev göstermesi ve sağlıklı kalması için küçük miktarlarda ihtiyaç duyduğu bir besin olan A vitamininin aktif bir metabolitidir. ATRA, özellikle embriyonik dönemde hücrelerin büyümesine ve gelişmesine yardımcı olur. Laboratuvarlarda üretilen sentetik retinoik asit formları, ciltteki akne gibi bir takım sorunları tedavi etmekte, ayrıca farklı kanser türlerinde tedavide kullanılır. Aynı zamanda retinoik asit, tretinoin ve A vitamini asidi olarak da anılır. All-trans retinoik asit, anti-kanser kemoterapi ilacı olarak kabul edilir ve Retinol (alkol formu), Retinal (aldehit formu), Retinoik asit (asit formu) ve retinil ester (ester formu) içeren “retinoid ailesi” altında sınıflandırılır. Bu bileşiklerin hepsi vitamin A'nın başlıca metabolik formları olan Retinoidler olarak bilinmektedir. Yapısal olarak, retinoidler bir β -iyon halkasına ve bir alkol, aldehit, bir karboksilik asit grubu veya bir ester grubuyla çoklu doymamış yan zincire sahiptir (Siddikuzzaman, Guruvayoorappan et al. 2011). Yan zincir, “trans-” veya “cis-” konfigürasyonunda bulunabilen bir dizi konjuge çift bağa sahip dört izoprenoid birimden oluşur. Bilinen diğer retinoik asit türleri olan 9-cis retinoik asit ve 13-cis retinoik asit, ATRA'nın doğal izomerleridir. Retinoidlerin aksiyonları, steroid / tiroid / retinoid hormon reseptör ailesinin üyeleri olan nükleer retinoid reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirilir (Bouriez, Giraud et al. 2018).

2.4.2 Retinoik Asit Reseptörleri

Retinoid reseptörleri, retinoid-cevabı veren genlerin promoter bölgesindeki retinoik asit yanıt moleküllerine (RARE) bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu güçlendiren ligandla indüklenebilir transkripsiyon faktörleri olarak hareket eder (Tate, Levin et al. 1994).

C domaini, iki tane çinko- parmak yapısı içeren, sistein açısından zengin olan DNA-bağlanma bölgesidir. E domaini, ligand (retinoid) bağlama bölgesini içerir ve ayrıca diğer reseptörler ile dimerizasyon için gerekli bir bölgeye sahiptir. C ve E alanlarının amino asit sekansları, retinoid reseptörleri boyunca yüksek ölçüde korunurken, A, B ve F bölgeleri, reseptörler arasında daha az korunmuş olmakla birlikte, farklı türler boyunca aynı reseptörler için yüksek ölçüde korunmuş halde kalmaktadır (Siddikuzzaman, Guruvayoorappan et al. 2011).

Retinoid nükleer RAR ve RXR olmak üzere iki reseptör ailesi tanımlanmıştır. Her sınıf üç farklı alt tür içermektedir: α , β ve γ (Alvarez, Germain et al. 2007). ATRA ve fenretinide, RAR, 13-cis RA ve sadece beksaroten ve RAR veya RXR'ye bağlanan 9-cis RA'ya spesifik olarak bağlanabilir (Bushue and Wan 2010). Bu reseptörlerin ifadesi, ya reseptörlerin kendileri tarafından, ya $ER\alpha$ gibi diğer nükleer reseptörler tarafından ya da aynı reseptör ailesine ait farklı alt tipler tarafından düzenlenmektedir (Ross-Innes, Stark et al. 2010). Ligandların bağlanmasının ardından RARs ve RXR'ler heterodimerleri oluşturur ve RA alt-akış genlerinin 5' bölgesinde bulunan RARE'lere bağlanarak aşağı akım efektörlerini aktive etmek için ligand-bağımlı transkripsiyon faktörleri olarak rol oynarlar (Bushue and Wan 2010). RAR veya RXR'lerin RARE'ye bağlanma yoluyla işlev görmesi, RA klasik veya genomik yolu olarak kabul edilir (Connolly, Nguyen et al. 2013). Klasik yolun aktivasyonu, hücre farklılaşmasını, hücre tutuklanmasını ve apoptozu tetikler (Tang and Gudas 2011).



Şekil 2.4.2.1: Retinoik Asit Reseptörleri ve Aksiyon Mekanizması. Şekildeki enzimatik adımlarda, Vitamin A (retinol) retinaldehid (RDH) 'nin retinaya oksitleyici etkisi ve retinaldehid dehidrogenaz (RALDH) ile RA'ya metabolize edilir. RA, all-trans, 9-cis ve 13-cis-retinoik asitleri içeren üç farklı izomere sahiptir. Retinoik asit, proteine Hücre Retinoik Asit Bağlama Proteini (CRABP) tarafından çekirdeğe nakledilir ve retinoik asit reseptörü a'ya (RARα) iletilir. RARα, heterodimerize olur ve çoğunlukla gen promotorlerinde bulunan RA duyarlı elementlere (RARE) bağlanır. RA mekanizmasının klasik yolunda, RA, RARα dahil olmak üzere aşağı doğru hedef genlerinin ifadesini indüklemek için RARα ve retinoid reseptörlerinin (RXRα, γ, veya γ) dimerlerine bağlanır. Aktivasyon üzerine, RARα kendi ifadesini ve esas olarak hücre büyümesini inhibe eden fonksiyonun aşağı akış genlerini düzenleyebilir. Alternatif olarak, RA, FABP5 gibi başka faktörler tarafından çekirdeğe bağlanabilir ve nakledilebilir. Bu, RA'yı PDK-1 / Akt veya E2 yolu gibi genomik olmayan yolları aktive eden PPARγ / P ve E2 gibi diğer klasik olmayan reseptörlere sunar. Klasik yola atfedilen farklılaşma fonksiyonlarının aksine, genomik olmayan yollar kanser hücreleri üzerinde güçlü antiapoptotik ve proliferatif etkiler gösterir. Klasik ve genomik olmayan yolların kendi ligandlarının nispi bolluğu tarafından kontrol edildiğine inanılmaktadır. RA, RAR'lar için diğer reseptörlere kıyasla daha güçlü bir afiniteye sahiptir ve klasik yol, genomik olmayan yollar üzerinde dominant bir rol oynar. Böylece, eğer RA, östrojen gibi başka ligandlarla mevcutsa, klasik yoldan sinyal vermek, hücre farklılaşması ve büyüme inhibisyonu

ile sonuçlanmak üzere tercih edilir. (Bu şekil “Molecular Pathways: current roles and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment, Conolly ve ark., 2013” makalesinden uyarlanmıştır.)

2.4.3 Retinoik Asit ve Kanser

Retinoidler, ağırlıklı olarak hücrel farklılaşmayı indüklemeye ve proliferasyonu durdurma yeteneklerinden dolayı kanserin önlenmesi ve tedavisi açısından potansiyel birer ajan olarak tanımlanmıştır (Connolly, Nguyen et al. 2013). Ayrıca yapılan çalışmalarda retinoidlerin, hücreleri apoptoza sürükleyerek de anti kanser etki sağladığı gösterilmiştir (Hofmann 1992). RA ile düzenlenen tümör baskılayıcı genler, eksprese edildiği zaman tümör büyümesini inhibe edebilir (Houle, Rochette-Egly et al. 1993). Retinoidler, bazı hematolojik malignitelerin tedavisinde, kutanöz T hücreli lenfoma ve APL'de kullanım için FDA onayı almıştır. Yapılan çalışmalarda Bexarotene (bir RXR-selektif retinoid veya rexinoid), refrakter ileri evre miyozis fungoidesli bir kutanöz T hücresi lenfoması olan hastalarda yaklaşık % 50'lik bir genel yanıt oranı ile ilişkili bulunmuştur (Duvic, Hymes et al. 2001). Yapılan bir çalışmada Tallman ve arkadaşları sentetik bir retinoid olan ATRA'nın, sadece APL'de kemoterapi ile karşılaştırıldığında hastalıksız ve genel sağkalımda prognozu iyi etkilediği ve vakaların yaklaşık %70'inde uzun süreli remisyonlar ortaya çıkardığı gösterilmiştir (Tallman, Andersen et al. 1997). Yapılan birçok çalışmada, akciğer kanseri prevensiyonunda tek ajan olarak retinoidlerin rolü araştırmıştır; yüksek seviyede akciğer kanseri riski olanlarda (primer kemoprevensiyon), bronş epitelinde veya balgamda varolan ön-malign değişikliklere sahip olanlar (sekonder kemoprevensiyon) ve akciğer kanseri öyküsü olan hastalarda (tersiyer kemoprevensiyon) literatürde yoğun çalışmalar bulunmaktadır (Lippman, Lee et al. 2001).

All-trans retinoik asit (RA, tretinoin), lenfoma, lösemi, serviks kanseri, akciğer kanseri, böbrek kanseri, nöroblastoma ve glioblastoma gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisi için geliştirilmiştir. Benzer olarak 13-cis RA (izotretinoin) tiroid kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, baş-boyun kanseri gibi çeşitli kanser türleri için klinik deneyde olmuştur. Ayrıca, farklı kanser türlerinin tedavisi için klinik denemede bulunan birkaç sentetik retinoid vardır (Das, Thapa et al. 2014). RA türevleri nöroblastom tedavisinde kullanılmakta ve umut verici klinik sonuçlar göstermektedir (Reynolds, Wang et al. 2000).

NB'nin güncel tedavisi sonrasında sağ kalım, beklenenin altındadır. Bu sebepten dolayı, RA ile indüklenmiş nöroblastom hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayan moleküler mekanizmaların açığa çıkarılması önemlidir. Bu mekanizmalara daha spesifik bakıldığında, hücrenin hayatta kalması ve hücreyi apoptoza sürükleyen RA aracılı dengeleyici sinyal yolları, şaşırtıcı klinik sonuçlar doğurabilecek potansiyel bir rol oynayabilir.

2.5 Takrolimus

2.5.1 Genel Bilgiler

Takrolimus (diğer adıyla FK506), *Streptomyces tsukubaensis*'in fermantasyon et suyundan izole edilen 23 üyeli bir makrolid laktonudur (Tanaka, Kuroda et al. 1987). Ek olarak, siklosporin gibi takrolimus da, katı organ transplantasyonunu takiben siklosporine değerli bir terapötik alternatif olarak ortaya çıkan kalsinörin inhibitör grubuna ait bir immünosupresif ajandır (Plosker and Foster 2000). Kalp (Crespo-Leiro, Paniagua et al. 2002), ince bağırsak (Reyes, Mazariegos et al. 2005), pankreas (Bottino, Trucco et al. 2002), kemik iliği (Corry, Chakrabarti et al. 2001), akciğer, karaciğer (Treede, Klepetko et al. 2001) ve böbrek (Borrows, Chusney et al. 2005) alıcılarında reddinde ve otoimmün hastalıkların tedavisinde etkilidir (Heneghan and McFarlane 2002).

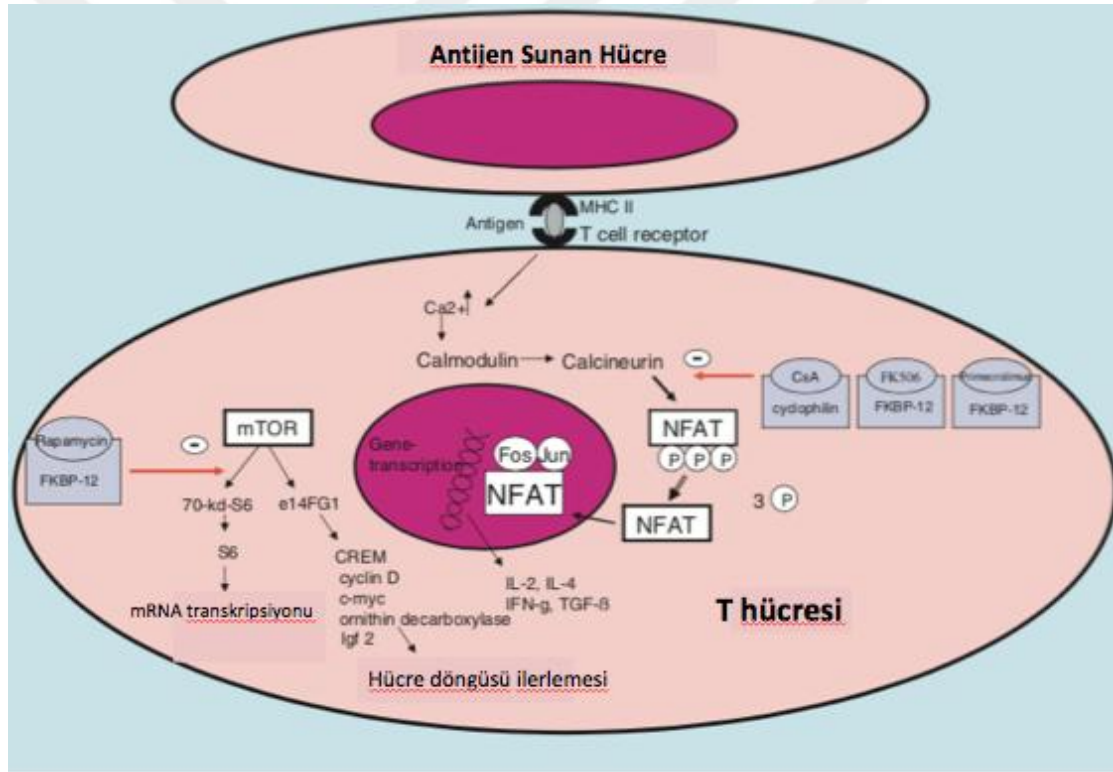
Bu ajan, 1984 yılında Fujisawa Pharmaceutical Co Ltd. tarafından bulunmuştur. Tac, T-lenfositlerin aktive olması için önemli bir molekül olan kalsinörini inhibe eden uzun salınlı bir madde şeklinde formüle edilmiştir (Wallemacq, Goffinet et al. 2009).

2.5.2 Etki Mekanizması

Kalsinörin inhibitörleri dermatolojide sıklıkla T-hücre yanıtını değiştirme özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır (Weischer, Rocken et al. 2007).

Tac, sinyal transdüksiyonundan sorumlu bir immünofilin olan FKBP-12'ye bağlanır ve Ca^{2+} , kalmodulin ve kalsinörin ile bir pentamerik kompleks oluşturur (Kalt 2017). Normalde T hücrelerinin aktivasyonu, kalsiyum konsantrasyonunda intrasitoplazmik bir artışa yol açar

(Bultynck, De Smedt et al. 2002). Artmış Ca^{2+} seviyeleri bu defa “kalmodulin” denilen bir molekülü aktifleştirir. Kalsinörin ise kalmodulin aktivasyonu ile aktive olmuş olur. Kalsinörin molekülü iki adet alt üniteden oluşmaktadır; birincisi katalitik bölge, ikincisi oto-inhibitör bölge (Kalt 2017). Bu bölgeler Ca^{2+} ’a ve kalmodulin bağlanmasına göre konum değiştirebilir. Kalsinörin, “NFAT” denilen (nuclear factors of activated T cells) molekülü defosforile eder. Defosforile olan NFAT nukleusa girer ve nüklear alt üniteler ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleks bazı genlerin promotor bölgelerine bağlanabilmektedir. Örneğin, IL-2, IL-4, IF γ ve TGF β gibi pro-inflamatuar sitokinlerin transkripsiyonu ve ifade edilmesi gerçekleşir (Marsland and Griffiths 2002).



Şekil 2.5.2.1: Hücrede Kalsinörin İnhibitörleri ve Etki Mekanizması. Kalsinörin inhibitörlerinin hücre içi etki mekanizması: Hücrede CsA, pimekrolimus, takrolimus ve rapamisin, immünofilinler adı verilen intrasitoplazmik proteinler ile bütün bir şekilde kompleks oluşturur. Siklosporin A, siklofilin, pimekrolimus, takrolimus ve rapamisinebağlanarak, takrolimus bağlayıcı protein (FKBP12) olarak adlandırılan bir 12-kDa proteinine bağlanır. Böylece CsA, pimekrolimus ve takrolimus, defosforilasyon ile NFAT'ı

inaktifleştirir. Bu durum da IL -2, IL-4, interferon-gama ve TGF-B'nin gen transkripsiyonuna neden olur. (Bu şekil “Tacrolimus: a review of laboratory detection methods and indications for use, Kalt, 2017” makalesinden uyarlanmıştır.

Kalsinörin inhibitörleri hücreye verildiğinde hepsi kalsinörin aktivitesi ile immunofilinlere ve interferlere bağlanırlar. Böylece NFAT'ın defosforile olması engellenir. Aynı zamanda sitokinlerin üretimi de etkilenir (Kalt 2017). Ayrıca T hücresi, antijen sunan hücreler tarafından yapılan aktivasyona cevap veremez hale geleceğinden, T hücre aktivasyonu baskılanmış olur (Jain, McCaffrey et al. 1992). Yapılan çalışmalarla immun baskılayıcı ajanların, genel olarak malignitelerin ve özellikle de cilt kanserinin görülme sıklığıyla doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir. Kalp nakli yapılmış hastalara operasyon sonrası immune baskılayıcı ajanlar verilmektedir. Bu nedenle transplante hasta grupları malinitelere daha yatkındırlar (Weischer, Rocken et al. 2007). Nakil hastalarına yaklaşık 5 yıllık yapılan takip sonrasında hastaların %17'sinde deri kanseri vakası görülmüştür. Bu tümörlerin lokalizasyonuna bakıldığında yaklaşık yüzde yetmiş baş ve boyun tümörü, %17'si üst ekstremitelerde iken alt ekstremitelerde ve batin kısmında yalnızca %4'lük bir orana rastlanmıştır (Caforio, Fortina et al. 2000).

2.6 Sisplatin

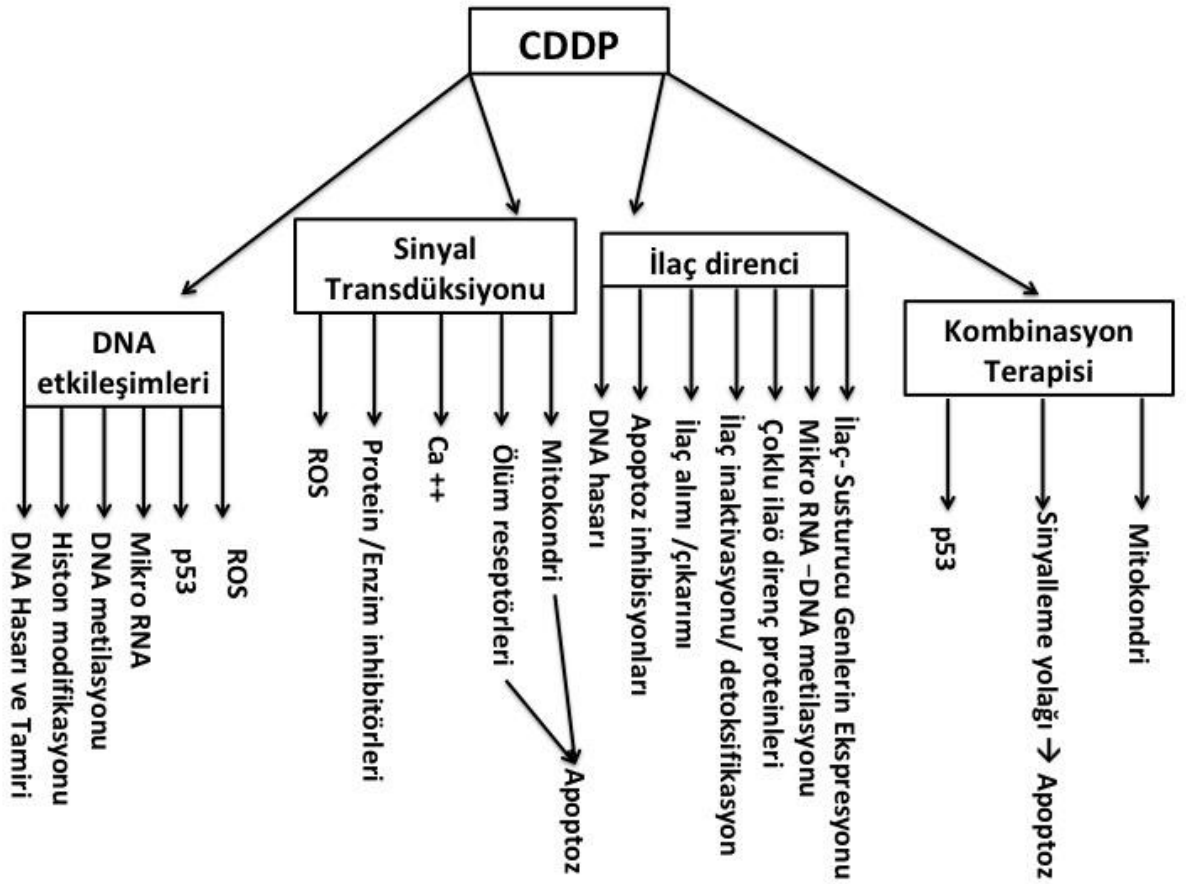
Sisplatin (CDDP) ilk olarak 1844 yılında M. Peyrone tarafından geliştirilmiştir ve kimyasal yapısı ilk olarak 1893 yılında Alfred Werner tarafından açığa kavuşturulmuştur (Dasari and Tchounwou 2014). CDDP iyi bilinen platinyum bazlı bir kemoterapötik ajandır. Mesane, baş-boyun, akciğer, over ve testis kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda insan kanserinin tedavisinde aktif rol oynamaktadır. Karsinomlar, germ hücreli tümörler, lenfomalar ve sarkomlar dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerine karşı etkilidir (Dasari and Tchounwou 2014).

CDDP hücre içine girdiği zaman aktifleşir. Sitoplazmada, CDDP üzerindeki klorür atomları, su molekülleri tarafından yer değiştirir. Bu sayede oluşan hidrolize ürün, nükleik asitler üzerindeki protein ve azot verici atomlar üzerindeki sülfhidril grupları dahil olmak üzere

herhangi bir nükleofil ile reaksiyona girebilen güçlü bir elektrofil halini almış olur. CDDP, pürin kalıntıları üzerinde N7 reaktif merkezine bağlanır ve bu nedenle kanser DNA'sında bir hasara yol açar. Ayrıca hücre bölünmesini bloke eder ve apoptotik hücre ölümüne neden olur (Dasari and Tchounwou 2014).

CDDP'nin ciddi şekilde yan etki gösterdiği de bilinmektedir. Bir yandan kanser hücresinin DNA'sını hasarlarlarken, bir yandan da hücrede oksidatif stresi indükler ve hücre ölümüne yol açar. ROS oluşumu, cis-diamminedikloro platin (II) konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlıdır (Brozovic, Ambriovic-Ristov et al. 2010). Sisplatin primer olarak apoptoz yoluyla hücre ölümüne sebebiyet verir. Bununla birlikte hücrede oluşabilecek herhangi bir mutasyon sonucunda apoptotik sinyalleme engellenmesi, hücre içinde sisplatin mekanizmasına direnç gösterebilir (Dasari and Tchounwou 2014).

CDDP, yüksek düzeyde ve geniş bir anti tümör aktivitesi spektrumuna sahiptir. Bu nedenle, anti kanser aktivitesine ve düşük yan etkilere sahip platinyum içermeyen yeni metal türleri bulmak için, ilaç tasarımı alanında geliştirilmiş kapsamlı araştırmalara imkan sağlamıştır (Lebwohl and Canetta 1998). Aşağıdaki figürde CDDP'nin hedefleri gösterilmektedir.



Şekil 2.6.1 : CDDP'nin Hedefleri: Platin kompleksleri, tümör hücresi ölümünü indüklemeye yönelik kanserlerin adjuvan terapisi olarak klinik olarak kullanılmaktadır. Hücre tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak, sisplatin, örneğin transkripsiyon ve / veya DNA replikasyon mekanizmaları ile etkileşime girerek sitotoksiteyi indükler. Ek olarak sisplatin, apoptozis indüksiyonu yoluyla tümörleri, kalsiyum sinyalleme, ölüm reseptör sinyalleme ve mitokondriyal yolların aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonunun aracılık etmesi ile zarar verir. (Bu makale “Cisplatin As an Anti-Tumor Drug: Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects, Florea, A-M. ve ark., 2011” adlı makalesinden uyarlanmıştır.)

CDDP'nin pediyatrik katı tümör türleri için klinik yararı vardır; bununla birlikte, CDDP'nin verimine sıklıkla sekonder malignitelere yol açan toksik yan etkiler ve tümör direnci eşlik eder (Chen, Milacic et al. 2009).

Oksidatif strese maruz kalmak normal biyolojik fonksiyonları bozduğu bilinmektedir. DNA hasarı dışında, son veriler CDDP'nin de hücre ölümünü tetikleyen reaktif oksijen türlerini (ROS) indüklediğini göstermektedir. Hücre ölümü, çeşitli sinyal yollarının aynı anda aktivasyonu üzerine gerçekleşir, özel yollar ise kanser hücresine bağlıdır. ROS oluşumu CDDP konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağlıdır. Hücre içi redoks homeostazı, tiyol grubu (-SH) içeren moleküller tarafından korunur. Belirli koşullar altında bir tiyol grubu, moleküler oksijen ile etkileşime girebilen ve dolayısıyla ROS üreten tiyol radikallerinin oluşumuna yol açabilir (Brozovic, Ambriovic-Ristov et al. 2010).

Çoğu metal ROS üretebilir. Metallerin neden olduğu serbest radikallerin çeşitli DNA hasarlarına aracılık ettiği, buna ek olarak metallerin DNA onarımını önleyebildiği bulunmuştur. Spesifik fizyolojik seviyeleri aşan metal konsantrasyonları, muhtemelen serbest radikaller üreterek toksiktir. Genellikle, her bir hücre antioksidanlar ve serbest radikaller arasında bir dengeye sahiptir ancak ROS lipid peroksidasyonuna, sülfhidril gruplarının tükenmesine, sinyal transdüksiyon yollarının değişmesine, kalsiyum homeostazisine yol açıp, aynı zamanda DNA hasarını da indükler. Bu durum, yaşlanma veya kansere neden olur (Desoize 2002).

p53 tümör baskılayıcı protein, kanserde CDDP'ye olan duyarlılıkla ilişkilidir. CDDP ile indüklenebilen p53 gen terapisi, yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanların etkinliğini arttırırken bir transgen ekspresyonunun kontrolünü sağlayabilir. Bu, kanserler için umut verici yeni bir tedavi olabilir (Wang, Qian et al. 2006). p53 proteini CDDP ile modifiye edilmiş DNA'yı tanıyabilir. Pivonkova ve meslektaşları, p53 delesyon mutantlarını kullanarak CDDP-DNA'ya bağlanan p53'ü ve protein redoks durumundaki değişikliklerle p53-DNA bağlanmasının modülasyonunu araştırmışlardır. İzole edilmiş p53 C-terminali alanı, modifiye edilmemiş DNA'ya kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bir afinite ile CDDP-DNA'ya bağlanmıştır (Pivonkova, Brazdova et al. 2006).

CDDP'in çeşitli kanserler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Özellikle meme kanserinde, CDDP, taksanlar, vinka alkaloidler ve 5-fluorourasil (Florea and Busselberg 2011) gibi sinerjik veya ilave etkilerle sonuçlanan diğer ilaçlarla birlikte kullanılmıştır. CDDP, 1,2-intrastrand çapraz bağlantısında Pt-DNA eklentileri oluşturarak DNA sinyallerine neden olarak

bilinir ve çeşitli sinyal iletim yollarının aktivasyonuna yol açar (Ding, Yuan et al. 2011). Bununla birlikte, kesin eylem mekanizması ve özgüllük hala iyi oluşturulmamıştır. CDDP'nin meme kanseri hücrelerini kemoterapiye duyarlı hale getirdiği mekanizmalara ışık tutmak için, CDDP'nin meme kanserinin farklı moleküler ve farklılaşma alt tiplerini temsil eden dört insan kanseri hücre çizgisi kullanılarak hücre fenotipi ve hayatta kalma üzerindeki etkilerini incelenmiştir (Prabhakaran, Hassiotou et al. 2013). CDDP'nin meme kanseri hücre sağkalımını azalttığı ve hücre dizileri içinde kök / progenitör hücre alt popülasyonlarının farklılaşmasını indüklediği sonucuna varılmıştır. Bu etkiler, bu ilacın bir tümör içindeki spesifik kemoterapiye dirençli hücreleri hedef alması potansiyelini gösterir (Prabhakaran, Hassiotou et al. 2013).

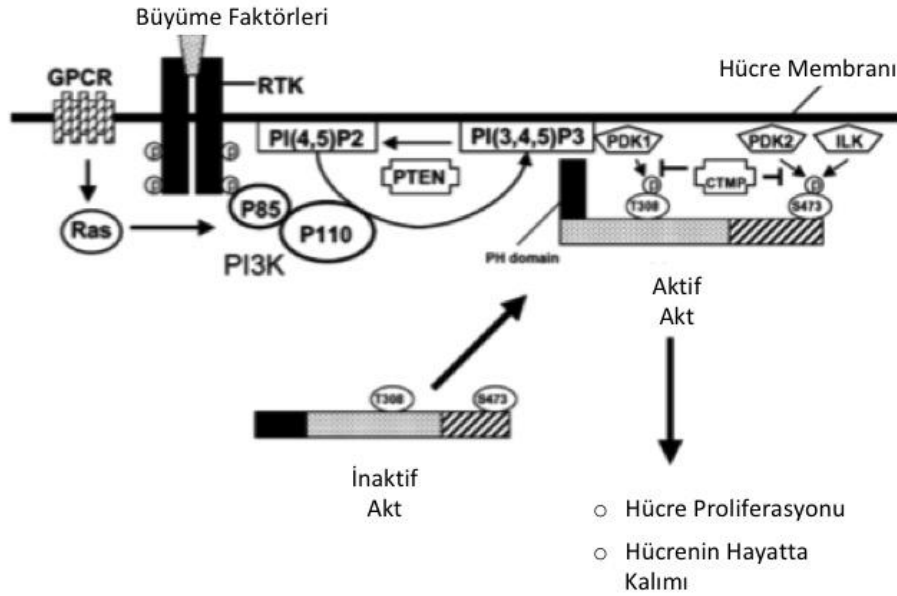
CDDP'nin ana sitotoksik etkisi DNA hasarı olarak bilinir. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalar CDDP'nin apoptotik sürece dahil olan olaylar zincirini oluşturduğunu kanıtlamıştır. Sıçan nöroblastom B50 hücrelerinde yapılan bir çalışmaya göre, golgi aparatı, endoplazmik retikulum ve lizozom organellerinin CDDP'nin hedefi olduğu gösterilmiştir. Çalışmada hem konfokal mikroskopide hem de TEM'de elde edilen sonuçların, bu organellerin 48 saatlik CDDP tedavisine bağlı olarak güçlü bir yeniden düzenlemeye maruz kaldıklarını ve bu değişikliklerin sitoskelet tübülünün yeniden düzenlenmesine bağlı olduğu gösterilmiştir. Böylece tüm sürecin fagositoz için tasarlanmış apoptotik cisimlerin oluşumunun temelinde olduğu belirtilmiştir (Santin, Scietti et al. 2012).

2.7 PI3K /AKT Yolağı

Fosfatidilinositol 3 -kinaz (PI3K) /Akt sinyal yolağı çeşitli tipte hücrel uyarıcı yada toksik bir hasar görmeye bağı olarak aktive edilir ve bu yolak ile hücrede transkripsiyon, translasyon,proliferasyon, büyüme ve sağkalım gibi temel fonksiyonları regüle edilmektedir (Datta, Brunet et al. 1999). PI3K/Akt yolağında meydana gelen bir mutasyon sonucunda oluşan hatalı aktivasyon; başta kanser, diyabet ve otoimmün hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Vivanco and Sawyers 2002). İnsan kanserlerinde PI3K/Akt yolağında sinyalizasyonun aksamaya uğradığı gösterilmiştir (Testa and Bellacosa 2001).

Kanserin gelişmesi ve ilerlemesi, hücre proliferasyonu ve sağkalım arasındaki dengenin başka yöne kaymasıyla yakından ilişkilidir. PI3K/Akt sinyalizasyonu, proliferasyon ve apoptoz ile ilişkilidir ve sadece tümör gelişiminde değil, tümörün tedaviye verdiği potansiyel tepkisini açığa çıkarmakta da önemli bir görev oynamaktadır (Nicholson and Anderson 2002).

PI3K, PI (4, 5) P2'nin inositol halkasının 3 pozisyonunun fosforillenmesinde rol oynar ve hayatta kalma sinyali için gerekli olan bir molekül ve kuvvetli bir sekonder mesajcı olan PI(3, 4, 5) P3 ve insülin aksiyonu için gereklidir (Fruman, Meyers et al. 1998).



Şekil 2.7.1 : PI3K/Akt sinyal yolunun düzenlenmesi için model. Büyüme faktörlerinin reseptör tirozin kinazına (RTK) veya G proteinine bağlı reseptörlere (GPCR) bağlanması, P85 ve P110 alt birimlerinden oluşan fosfatidilinositol 3-kinazın (PI3K) fosforilasyonunu uyarır. PI3K fosfatidilinositole-4,5 bisfosfonat (PI (4,5) P2) PI (3,4,5) P3'e dönüştürürken, PTEN (kromozom 10 üzerinde silinen fosfataz ve tensin homologu) bu reaksiyonu tersine çevirir. Akt, hücre zarına translokasyon yapar ve PH alanından PI (3,4,5) P3 ile etkileşir, fosfoinositide bağımlı kinaz (PDK) 1, PDK2 ve integrin-bağılı kinaz tarafından iki tortuda (Thr308 ve Ser473) fosforillenir (ILK). Karboksi terminal modülasyonlu protein (CTMP) fosforilasyonu inhibe eder. Aktif olduktan sonra Akt, hücre döngüsü ve hücre sağkalımı gibi temel hücresel süreçleri kontrol eder. (Bu figür “ PI3K /AKT Pathway: It’s functions and alterations in human cancer, Osaki,M ve ark., 2004” adlı makaleden uyarlanmıştır.)

PI3K'ler, protein tirozin kinaz aktivitesi (Reseptör Tirozin Kinaz, RTK) ve G protein-aracılı reseptörler (GPCR) tarafından aktive edilen bir katalitik alt birim (P110) ve bir düzenleyici alt birimden (P85) oluşan heterodimer moleküllerdir (Katso, Okkenhaug et al. 2001). Aktifleşen PI3K, plazma membran lipidi olan PI (4,5) P2'yi saniyeler içinde PI (3,4,5) P3'e çevirir. PI (3,4,5) P3'ün hücre üzerine etkisinde, FYVE ve plekstrin homoloji (PH)

alanlarının yanı sıra en az iki farklı protein-lipid bağlama alanına spesifik olarak bağlanarak aracılık eder (Pawson and Nash 2000).

Akt proteini, 57 kD boyutunda bir Ser/Thr kinaz'dır. Farelerde bir lösemi tipinden sorumlu olduğu bilinen viral bir onkoprotein olan v-Akt'ın hücrel homologudur ve bu yüzden c-Akt yada Akt olarak isimlendirilmektedir (Staal 1987). Aynı zamanda PKB (protein kinaz B) veya RAC (protein kinaz A ve C ile ilişkili) olarak da isimlendirilmektedir, çünkü yapılan birkaç çalışmada v-Akt ve c-Akt'ın protein kinaz C'ye (PKC) ve protein kinaz A'ya (PKA) hafif derecede benzerlik gösteren bir protein kinazı kodladığı gösterilmiştir (Jones, Jakubowicz et al. 1991). Memeli genomunda; Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) ve Akt3 (PKB γ) izoformlarını kodlayan üç Akt geni vardır. Bunlardan Akt2 ve Akt3, Akt1 ile amino asit sekansında sırasıyla% 81 ve% 83 homoloji göstermektedir (Vanhaesebroeck and Alessi 2000). Memelilerde bulunan üç Akt geninin tamamı, farklı dokularda geniş ölçüde eksprese edilir, fakat farklı Akt tipleri bazı dokularda daha fazla bulunurlar. Örneğin; Akt1 beyinde, kalpte ve akciğerde daha fazla bulunurken, Akt2 iskelet kası ve embriyonik kahverengi yağ dokusunda baskınlık gösterir. Akt3 tipi ise sıklıkla olarak beyinde, böbrekte ve embriyonik dönemde kalp dokusunda fazlaca mevcuttur (Brodbeck, Cron et al. 1999).

Aktif Akt proteini sayısız fonksiyonunu modüle eder (Lawlor and Alessi 2001). Bunlar;

- Hücre çoğalmasının düzenlenmesi ile ilgili substratlar
- Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3)
- Glikoz taşıyıcısı GLUT4'ün membran translokasyonu
- Sikline bağımlı kinaz inhibitörleri, P21 / Waf1 / Cip1 ve P27 / Kip2,
- Rapamisinin memeli hedefi (mTOR)
- Tübero skleroz kompleksi 2 (TSC2) 'dir (Shin, Yakes et al. 2002).

Hücrelerde aktif PI3K'nin önemli bir fonksiyonu da apoptozisin inhibe edilmesidir (Yao and Cooper 1995). Akt aynı zamanda, PI3K'ya bağımlı hücre sağkalım cevaplarına aracılık etmek için iyi bir adaydır. Akt, hücre dışı sinyal faktörlerinin geri çekilmesi, oksidatif ve ozmotik stres, ışınlama ve kemoterapötik ilaçlar ve iskemik şok ile hücrelerin tedavisi dahil olmak üzere birçok farklı hücre ölüm paradigmasında anti apoptotik bir faktör olarak rol oynar (Downward 1998).

Akt'in fazla ekspresyonu, birçok hücre tipinde anti apoptotik bir etkiye sahiptir, bu da hücre ölümüne direnç veya gecikmeye neden olur. Akt, apoptotik makineyi doğrudan veya dolaylı olarak kontrol eden alt tabakaların fosforilasyonu yoluyla hücresel sağkalımı düzenler (Fresno Vara, Casado et al. 2004).

Akt, IkappaB kinaz a'yı fosforile edebilir ve aktive edebilir; bu da, IkappaB'yi fosforile ederek, bozunmayı hedefler (Ozes, Mayo et al. 1999). Bu, nükleer faktör-kappaB'nin (NF-kB) nükleer translokasyonu ve aktivasyonuna ve Bcl-XL, kaspaz inhibitörleri ve c-Myb dahil olmak üzere NF-kB'ye bağlı prosürivi genlerin transkripsiyonuna yol açar (Lauder, Castellanos et al. 2001). Ayrıca Akt; Bcl-2, Mcl-1 ve Akt'in kendisi gibi anti-apoptotik genlerin transkripsiyonunu arttıran siklik AMP-tepki elementi bağlayıcı proteini fosforile eder ve aktive eder (Osaki, Kase et al. 2004).

Ek olarak, Akt hücresel stresin bir sensörü olarak hareket eden ve stres sinyallerini apoptotik sinyallere dönüştüren tümör baskılayıcı p53 proteinini dolaylı olarak düzenler (Evan and Vousden 2001). Akt, fare Double Minute-2 proteinini, nükleusa translokasyonunu ve p53'ün destabilizasyonunu teşvik eden fosforile eder (Mayo and Donner 2001). p53'ün bozunmasını teşvik ederek, Akt hücresel stres cevabını bozarak hücrelerin hayatta kalma aktivitesini artırır (Zhou, Liao et al. 2001).

2.7.1 PI3K /Akt Yolağı ve Kanser

Bilindiği üzere RTK veya G-proteinine bağlı reseptörlerin ligand bağımlı aktivasyonunun bir sonucu olarak PI3K/Akt sinyali aktive edilir. Hücre yüzeyi reseptörleri, çok sayıda insan kanserinde yaygın olarak fazla eksprese edildiği veya yapısal olarak aktif hale getirildiği için, sonuç olarak aşağı yönde sinyal yolları aktive edilir. En kapsamlı olarak incelenen örneklerden biri, meme ve diğer kanserlerde gen amplifikasyonu sonucu fazla eksprese edilen erbB2 tirozin kinaz reseptörüdür (Blume-Jensen and Hunter 2001). ErbB2, erbB ailesinin diğer üyeleri ile dimer oluşturur. ErbB2 içeren heterodimerler, hücre büyümesi, anti apoptoz ve invazyon ile ilgili çoklu sinyal yollarının güçlü aktivatörleridir (Olayioye, Neve et al. 2000).

Bunun dışında çeşitli çalışmalar insan yumurtalık kanseri, serviks kanseri, baş ve boyun kanseri, mide kanseri ve glioblastomada PIK3C gen amplifikasyonu göstermiştir (Knobbe and Reifemberger 2003).

Ayrıca Akt'ın gen amplifikasyonu ile ilgili raporlar da vardır. İlk olarak Staal, tek bir mide karsinomunda Akt1 geninin amplifikasyonu saptadı (Staal 1987). Diğer çalışmalar da glioblastomda Akt1 gen amplifikasyonu bulmuştur (Woenckhaus, Steger et al. 2002). Ovaryan, pankreatik, mide ve meme kanserlerinde Akt2 gen amplifikasyonu bildirilmiştir (Cheng, Ruggeri et al. 1996). Meme ve prostat kanserinde Akt3 mRNA'nın aşırı ekspresyonu gösterilmiştir (Nakatani, Thompson et al. 1999). Genel olarak, bu çalışmalar PI3K'nin neden olduğu Akt aktivasyonunun kanser ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Osaki, Oshimura et al. 2004).

İnsan kanserlerinde üzerine yapılan in vivo çalışmalarda yine Akt'ın aktif olduğu tespit edilmiştir. Akt izoformlarının fazla ekspresyonu meme, kolon, yumurtalık, pankreatik, prostat ve safra kanalı kanserlerinde tanımlanmıştır (Tanno, Yanagawa et al. 2004). Ayrıca, serin 473-fosforile Akt'e (aktive Akt) karşı spesifik antikorlar kullanılarak yapılan immünohistokimyasal (İHK) çalışmalar, Akt etkinliğinin melanoma, baş ve boyun, meme, kolon, yumurtalık, pankreatik, safra kanalı ve prostat kanserinde saptanabileceğini göstermiştir (Nam, Lee et al. 2003). Genel olarak, bu çalışmalar PI3K-Akt yolunu inhibe etmenin kanserli hastalar için terapötik değere sahip olabileceğini düşündürmektedir (Osaki, Oshimura et al. 2004).

Akt'ın kontrolsüz aktivasyonu sonucu gelişen PI3K/Akt aktivasyonu, PI3K veya Akt gen amplifikasyonu, ya da PTEN mutasyonu, kanserin gelişimine yol açar. Bu sebeple Akt aktivasyonunun inhibisyonu, kanser tedavisi için umut vericidir. Son çalışmalara göre, Wortmannin ve LY294002 adlı iki bileşik PI3K-Akt yolunun inhibitörleri olarak kullanılmıştır (Osaki, Oshimura et al. 2004). Wortmannin, bir fungal metabolit ve tip I PI3K'nin güçlü bir inhibitörüdür (Powis, Bonjouklian et al. 1994). Nanomolar konsantrasyonlarda, Wortmannin P110 katalitik alt ünitesine bağlanarak PI3K'yı geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Wortmannin, in vitro ve in vivo da anti tümör aktivitesine sahiptir (Schultz, Merriman et al. 1995). Birçok in vitro çalışmada, Wortmannin ile ön tedavi veya Wortmannin ve bir büyüme faktörü ile eşzamanlı tedavi, in vitro kinaz analizleri ile ölçüldüğü gibi, PI3K aktivitesini inhibe ederek proliferatif yanıtı güçlü bir şekilde inhibe etmiş veya apoptozisi indüklemiştir (Katso, Okkenhaug et al. 2001). Bir flavonoid türevidir olan LY294002, PI3K'nin ATP bağlama bölgesinin bir inhibitörüdür (Sanchez-Margalet, Goldfine et al. 1994). LY294002, sıklıkla in vitro olarak kullanılmıştır ve anti proliferatif ve pro apoptotik aktiviteleri bulunmaktadır (Osaki, Oshimura et al. 2004). Pankreatik kanser hücrelerinde LY294002 tedavisi, daha yüksek P27 / Kip1 seviyeleri ile ilişkili olan ve Cyclin D ve E seviyelerini azaltan ve ardından Rb

protein hiperfosforilasyonunun inhibisyonu ile G1 tutulmasına neden olmuştur (Parsons, Muilenburg et al. 2010). *In vivo* çalışmalar LY294002'nin tümör büyümesinin inhibisyonu üzerindeki etkisi olduğunu da göstermiştir (Semba, Itoh et al. 2002).

2.8 RAS-MAPK Yolağı

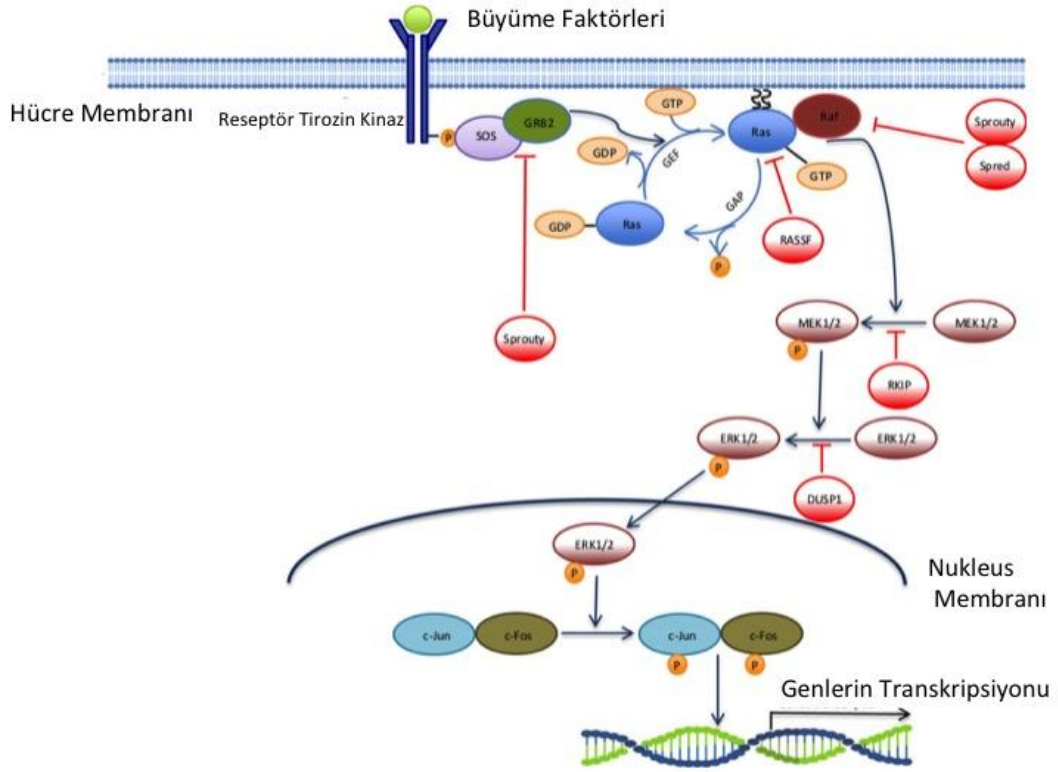
Mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'ler), proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, sağkalım, inflamasyon ve doğuştan gelen bağışıklık gibi çeşitli hücrel aktiviteri düzenleyen serin-treonin protein kinazlardır (Peti and Page 2013). MAPK sinyal yollarının, Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD) ve amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi kanser ve nörodejeneratif bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynadığı bulunmuştur (Seki, Brenner et al. 2012). Memeli hayvanlarda MAPK'lar, her biri birkaç izoformda mevcut olan c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK), p38 MAPK ve hücre dışı işaretli kinaz (ERK) içerir. JNK1 ve JNK2 çoğu dokularda eksprese edilirken JNK3, ağırlıklı olarak nöronal hücrelerde ifade edilir (Sabio and Davis 2014).

Çeşitli MAPK sinyal yolları, hücre yüzey reseptörlerinden (reseptör tirozin kinaz (RTK) veya G-protein-bağı reseptörden (GPCR)) sinyal transdüksiyonunda, çeşitli hücrel süreçlerin aktivasyonuna yol açan nükleusa kadardır (Delire and Starkel 2015). MAPK yollarının çoğu aynı lineer organizasyonu paylaşır: küçük bir GTPaz bir MAP kinaz kinaz kinazı (MAP3K veya MEKK) aktive eder; MAP3K, bir MAP kinazını (MAPK) aktive eden bir MAP kinaz kinazı (MAP2K veya MEK) aktive eder (Delire and Starkel 2015). Genellikle, MAPK yolları hücre fonksiyonlarını bireysel olarak düzenlemez, fakat birbirleriyle ve PI3K / Akt / mTor, TGF β / Smads, Wnt / b-katenin ve Rho / aktin yolları gibi diğer sinyal yolları ile etkileşime girer (Ohnberger, Thavamani et al. 2015).

Ras proteini, küçük GTPazların (21 kDa) süper familyasına aittir ve üç farklı gen tarafından kodlanan 4 izoformu vardır: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A ve K-Ras4B (Schubbert, Bollag et al. 2007). Ras aktivasyonu RTK'lerin büyüme faktörü aracılı aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli hücre dışı uyarılar tarafından tetiklenen ERK 1/2 yolunun ilk hücre içi efektördür. Bu uyarılar, GDP'ye bağlı inaktif hale getirilmiş formdan, hücre çoğalması, hayatta kalma, farklılaşma ve migrasyona karışan yolların aktivasyonunu, çeşitli efektörler aracılığıyla tetikleyen GTP'ye bağlı aktive edilmiş bir forma kadar Ras'ın durumunu değiştirebilir (Rajalingam, Schreck et al. 2007). Aktive edildikten sonra, GTP-Ras Raf-1

kinazını plazma membranına yerleştirir. Aktif Raf-1 MAP2Ks MEK 1 ve MEK 2'yi fosforile eder ve bu da ERK 1/ 2'yi fosforile ve aktive eder. Fosforlu ERK, diğlerleri arasında, AP-1 familyasının iki anahtar transkripsiyon faktörü olan c-Jun ve c-Fos'u aktive ettiğı nükleusa translokasyon yapar (Dhillon, Hagan et al. 2007). Bu iki faktör, hücre döngüsü ilerlemesi veya diğler hücreyel süreçlerde rol oynayan genlerin transkripsiyonunu indüklemek için promotör bölgelerinin AP-1 bağlanma bölgelerine bağlanır (Ito, Sasaki et al. 1998).





Şekil 2.8.1: RAS /MAPK Yolağı: Ras, ERK 1/2 yolunun ilk hücre içi efektördür. Ras yolunun aktivasyonu, RTK'lerin büyüme faktörü aracılı aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli hücre dışı uyarılar tarafından tetiklenir. Bu uyarılar, GDP'ye bağlı inaktive edilmiş formdan GTP'ye bağlı aktive formdan GTP'ye bağlı olan Ras'ın durumunu değiştirir. Aktive edildikten sonra, GTP-Ras Raf-1 kinazı plazma membranına alır. Aktif Raf-1, MEK 1 ve MEK 2'yi fosforile eder ve bu da ERK 1 / 2'yi fosforile eder ve aktive eder. Fosforile edilmiş ERK, AP-1 familyasının, c-Jun ve c-Fos'un iki anahtar transkripsiyon faktörünü aktive ettiği nükleusa translokasyon yapar. Bazı proteinler Ras / MAPK yolunu düzenler. GEF'ler ve GAP'ler Ras-GTP seviyelerini kontrol eder. GEF'ler GTP ve GAP'lar için GDP değişiminin GTP-Ras'ın hidrolizini aktif olarak teşvik etmesine neden olur. RASSF üyeleri Ras proliferatif ve antiapoptotik sinyalleri düzenler. Ayrıca Ras / MAPK yolu, Raf aktivasyonunu inhibe eden Sprad familyasının yanı sıra, Raf-1 tarafından MEK fosforilasyonunun ve aktivasyonunun bir inhibitörü olarak görev yapan RKIP tarafından kontrol edilir. Sprouty proteinleri, GRB2-SOS kompleksini bozarak veya Raf'ı engelleyerek Ras / MAPK yolunu düzenleyebilir. Son olarak, DUSP1 belirli bir ERK düzenleyicisidir. P, ilgili molekülün fosforile formunu belirtir. (Bu makale (The RAS/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications, Benedicte Delire ve ark., 2015" adlı makaleden uyarlanmıştır.)

Ras / MAPK yolu, hücre fonksiyonlarını düzenlemede nadiren tek başına hareket eder, ancak karaciğer kanseri gibi hem sağlıklı hem de hastalıklı koşullarda farklı sinyal yollarıyla etkileşir. Yollar arasındaki etkileşim, Ras proteininin, örneğin, PI3 kinazı, RalGDS, PLCe ve TIAM1 proteinleri gibi diğer bazı aşağı akım efektörlerini aktive etmesiyle ilgilidir. Bu efektörlerin aktivasyonu, hepatokarsinogenezde, artmış bir RalGDS ekspresyonu olarak rol oynayabilir ve bunun aşağı akış efekti RalA, HCC hücre çizgilerinde ve HCC fare modellerinde tarif edilir(Ezzeldin, Borrego-Diaz et al. 2014). Dahası, TIAM1, HCC'li hastalarda kötü prognozla ilişkilidir ve tümör invazyonu ve metastazına katkıda bulunur (Balogh, Victor et al. 2016).

RAS/MAPK yolağı hücre sel büyüme, sağ kalım, farklılaşma ve çeşitli malignitelerde rol oynar (Dhillon, Hagan et al. 2007). Nöroblastomda RAS yolu ile ilişkili mutasyonlar nadiren görülür (Pugh, Morozova et al. 2013). Ancak daha sonar yapılan bir çalışma relaps olmuş nöroblastoma tümörlerinde RAS-MAPK yolunda tanı anında mevcut olmayan aktive edici mutasyonların sıklığını gösterdi(Elevel, Oldridge et al. 2015). Spesifik olarak, mutasyonlar ALK, NF1, BRAF, PTPN11, FGFR1, KRAS, HRAS ve NRAS'da tanımlanmıştır. Böylece, RAS-MAPK yolunun inhibisyonu, relaps / refrakter nöroblastoma popülasyonunda terapötik hedef olarak düşünülmektedir (Applebaum, Desai et al. 2017).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışmamız Ekim 2017’de literatür taraması ile başlayıp Ocak 2019’da tez bitirme sınavı ile sonlandı. Bu çalışma 9 Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı’nda yürütüldü.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmamızın evreni çalışılan nöroblastom, örneklemi ise hücre hatları olan KELLY ve LAN5 hücreleridir.

3.4 Çalışma Materyali

Araştırmada hücre hatları olarak nöroblastom hücre hattı olan KELLY ve LAN5 kullanıldı. Muamele edilen ajanlardan diferansiye edici ajan Retinoik Asit, kalsinörin inhibitörü olan Takrolimus ve kontrol olarak Sisplatin ilaçları kullanıldı.

3.5 Çalışmanın Değişkenleri

Araştırmada bağımlı değişken olarak canlılık değerleri, protein miktarı, protein ekspresyon yüzdeleri, bağımsız değişken olarak NB hücre hatları ve Retinoik Asit, Sisplatin ve Takrolimus olarak tanımlanmıştır.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Hücre Kültürü

Bu çalışmada nöroblastom hücre hatları olarak insan kökenli kötü prognozu yansıtan N-MYC pozitif Kelly hücre hattı (DSMZ no: ACC 355) ve metastaz modeli LAN-5 (DSMZ no: ACC 673) kullanıldı. Hücreler %5 CO₂ içeren ve 37°C sıcaklıkta inkübatörde inkübe edildi. LAN-5, RPMI 1640 ortamına %20 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin ve %1 L-glutamin eklenerek oluşturulan hücre çoğalma ortamları kullanılarak çoğaltıldı. Aynı koşullar altında Kelly hücre hattı ise RPMI-1640 kültür ortamına %10 FBS eklenerek kültüre edildi. Hücrelerin ortamları iki günde bir değiştirilerek çoğalmaları sağlandı. Konflüent olan hücreler Tripsin-EDTA kullanılarak 1/3-1/4 oranında pasajlanarak idame edildi.

3.6.2 Hücre Pasajı

KELLY hücreleri inkübatörden çıkartılıp mikroskop altında yoğunluk oranları kontrol edildi. Yüzde 70'in üzerinde tutunma olduğu ve hücrelerin sağlıklı olduğu görüldükten sonra flask kabinete dik şekilde kondu ve kapağı yavaşça açılarak flaskın yüzeyine değmeden ortam cam pipet ile çekilip atıldı. Aynı şekilde kontrol edilen LAN5 hücreleri, flaskın yüzeyine tam tutunma göstermedikleri için flastaki ortamları atılmadı. KELLY hücrelerinin flaskına beş mL PBS eklendi ve fazla bekletmeden cam pipet ile uzaklaştırılarak yıkama yapıldı. Hücreleri kaldırmak için üzerine bir mL Tripsin/EDTA eklendi. Flask inkübatöre kaldırıldı ve enzimin ısı ile reaksiyon başlatması ve hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için bir yada iki dakika bekletildi. Sürenin sonunda flask inkübatörden çıkartılıp, birkaç defa yüzeye vurarak mekanik etki ile de hücrelerin tamamen kalkması sağlandı. Hücrelerin kalktığı mikroskop ile gözlemledikten sonra flask kabinete dik şekilde konuldu. Tripsini inhibe etmek için komplet ortamdan iki mL eklendi ve beş mL'lik pipetle çok sayıda pipetaj ile yıkama yapıldı. Flask iyice yıkandıktan sonra hücreler 15 mL'lik falcon tüpe aktarıldı. LAN5 hücreleri için ise hücre kazıyıcı kullanılarak hücreler kaldırıldı ve 15mL'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 1300 rpm'de yedi dakika boyunca santrifüjlendi. Steril cam pipet ile hücre pelletine dokunmadan süpernatant çekilip atıldı. Ardından iki mL komplet medium eklendi ve pellet pipetaj ile

      . H  releri saymak için süspansiyondan 10   L alındı ve 1.5 mL'lik ependorf tüplerine, Trypan Blue(Gibco, Kat no: 15250061) boyası ile karıştırıldı. Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. Hücre süspansiyonundan, son hacmi br   mL olan 25 cm²'lik kültür flaskına 3x10⁵ yoğunlukta hücre ekildi. Hücreler mikroskopta incelendi. Daha sonra flask inkübatöre kaldırıldı.

3.6.3 *In vitro* Deneyler

Hücre canlılığını saptamak için kullanılan 3-(4,5Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT), için *in vitro* deneyler 96 kuyucuklu plaklarda yapıldı. Protein belirlenmesi için yapılan immunositokimyasal boyama için 25 cm²'lik flasklarda üretilen hücreler Tripsin/EDTA ile kaldırılarak pasaj uygulandı. Kaldırılan hücrelerden elde edilen pellet bir mL kültür ortamında pipetlendi ve lizinli lamlara 10   L hacimde hücre alınarak yayma yapıldı.

MTT testi için hücre ekim yoğunluğu 96 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 1x10⁴ hücre ve 200   L son hacim olacak şekilde ekildi. 25 cm² lik flasklar için flask başına 1x10⁶ hücre olup, son hacmi be  mL, 75 cm² lik flasklar için flask başına 3x10⁶ hücre olup 10 mL son hacim olacak şekilde ekildi.

MTT testi için kontrol grubuna iki mM L-Glutamin i  erenRPMI 1640 deney ortamından eklendi. Ertesi gün kontrol grubundan 200   L ortam çekildi, 100   L%1 FBS içeren RPMI 1640 deney ortamı verildi. RA grubundan 200   L hücre ortamı uzaklaştırılıp, 0,1   M, 0,2   M, 0,5   M ve 1.0   M dozlarında kuyucuk başına 100   L ajan eklendi. Sisplatin grubundan 200   L hücre ortamı uzaklaştırılıp 0,2   M, 0,5   M, 2,5   M ve 5   M dozlarında kuyucuk başına 100   L ajan eklendi. Tac grubundan 200   L hücre ortamı uzaklaştırılıp 2000 nm, 1000 nm, 500 nm, 100 nm, 10 nm, 1 nm, 0,5 nm ve 0,05 nm dozlarında kuyucuk başına 100   L ajan eklendi ve 37  C 'lik inkübatörde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı.

3.6.4 MTT ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

RA'nın, CDDP'nin ve Tac'ın farklı dozlarının hücre canlılığı üzerine olan etkisi MTT (AppliChem, Lot 5H008900) ile belirlendi. MTT hazırlığı için beş mg toz madde tartıldı ve bir mL steril PBS'nin içinde çözüldü. Deney süresi sonunda, plaktaki 100 µL supernatant üzerine 10 µL MTT eklendi. Hücreler 3,5 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından dimetilsülfoksit (DMSO) yıkaması yapılmak üzere inkübatörden alındı. Kuyucuk başına süpernatantın 50 µL'si çekilip atıldı ve 50 µL hacimde DMSO eklendi. Ardından plak inkübatöre kaldırıldı ve 15 dakika inkübe edildi. Deney sonunda mikropalak okuyucu cihazda 562 nm'de kolorimetrik okutma yapıp absorban değerleri elde edildi. Kontrol grubu %100 canlı kabul edildi ve örneklerin canlılığı kontrole oranlanarak verildi.

3.6.5 Toludin Mavisi ile Morfoloji Değerlendirilmesi

25 cm²'lik flasklardan Tripsin/EDTA ile hücreler kaldırıldı ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, pellet homojenize edildikten sonra süspansiyondan 20 µL kadar alınıp lizinli lam üzerine yayma yapıldı. Havada kuruması beklendikten sonra lamlara metanol damlatılarak fiksasyon sağlandı. Metanol kuruduktan sonra lamalar otomatik boyama cihazı Aerospray'de (Wescor, 09149) boyandı. Morfolojik değerlendirme mikroskop ile yapıldı.

3.6.6 İmmüsitokimyasal Boyama ile Protein Belirlenmesi

25 cm²'lik flasklardan Tripsin/EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet 0,5 ila bir mL kültür ortamında homojenize edildi ve süspansiyondan 10 µL hacim alınarak lizinli lamlara hücre yayması yapıldı. Yayma kuruduktan sonra hücrelerin fiske olması için lamaların üzerine metanol damlatıldı ve kuruduktan sonra %96'lık etanol damlatıldı ve 10 dakika beklendi. Ardından lamalar distile su ile yıkandı. Daha sonra lamalar şale içerisinde %3 H₂O₂ ile 10 dakika bekletildi. Ardından distile su yıkaması yapıldı. Daha sonra lamalar temiz başka bir şale içinde steril olmayan PBS ile bekletildi. Ardından bir damla inhibitör CM (Discovery, Cat no: 760-4840) damlatıldı ve beş dakika beklendi. Daha sonra PBS yıkaması yapıldı. Ardından lamaların üzerine 1:500 oranında seyreltilmiş Akt (Cell Signaling, Cat no: 4691S) primer antikor damlatıldı. Lamaların üzeri lamel yardımıyla kapatılıp bir saat beklendi. Daha sonra PBS yıkaması yapıldı. Sekonder antikor olarak Omni-map anti-Rb HRP (Discovery, Cat no: 760-4311) uygulanması yapıldı ve lamaların üzeri lamel ile kapatılıp yarım saat süreyle beklendi. Chromo DAB Kit (Discovery, Cat no: 760-159) kullanılarak bir damla DAB CM ve bir damla H₂O₂ damlatıldı ve lamaların üzeri kapatılarak sekiz dakika beklendi. Daha sonra lamalar temiz bir şale içinde çeşme suyu ile yıkandı. Ardından lamaların üstüne bir damla Copper CM eklendi ve beş dakika bekleme süresinin ardından PBS ile yıkandı. Daha sonra lamaların üzerine birer damla Hematoksilen boyası kondu (Ventana HE600 Eosin, Cat no: 06544304001) ve 15 dakika boyunca beklendi. Bekleme süresinin ardından çeşme suyu ile yıkama yapıldı. Ardından bir damla Bluing Reagent (Ventana, Cat no: 760-2037) damlatılarak beş dakika boyunca beklendi. Bekleme süresinin ardından sırasıyla çeşme suyu ve distile su ile yıkamalar yapıldı. Daha sonra lamalar artan alkol serilerinde (%20, %40, %60, %80 ve %100) yedişer dakika bekletildi. Ardından alkolün uçması beklendi ve lamalar bir saat süre boyunca temiz bir şale içinde ksilolde bekletildi. Deney süresinin sonunda lamalar ksilolden alındı ve lamalar tam kurumadan entellan yardımı ile üzerlerine lamel kapatılarak mikroskopta bakılmak için hazır hale getirildi. Aynı koşullar için hücreler yayma yapıldıktan ve metanol ile fikse edildikten sonra lamalar Toludin Blue ile boyandı.

3.6.7 İmmunoblot Yöntemiyle Protein Değişimlerinin Gösterilmesi

RA, Tac ve CDDP'nin PI3K/Akt ve Ras/MAPK yolları üzerine olan etkisini protein miktarı açısından göstermek amacıyla, sinyal kaskadında rol alan proteinlerden olan Aktantikoru kullanılarak analiz yapıldı. Akt protein düzeyi için hücre içi formunu tespit edebilen antikor kullanıldı.

In vitro deneyin sonunda, final hacmi 10 mL olan 75 cm²'lik flasklardan hücreler, hücre kazıyıcı yardımıyla kaldırıldı. Kaldırılan hücreler 1300 rpm'de yedi dakika santrifüj edildi. Sonra örneklerin süpernatantı falkonlara aktarıldı ve uzun saklama için -80°C'ye kaldırıldı. Santrifüj sonrası kalan pelletlerin üzerine %1 proteinaz inhibitör içeren 300 µL RIPA solüsyonu eklendi ve iyice pipetaj yapılarak otuz dakika süre boyunca buz üzerinde bekletildi. Örnekler iki dakikada bir vorteks ile karıştırıldı.

Örnekler jele yüklenmeden önce, BCA protein analizi (BCA protein assay kit, Cat: 23225, Thermo Scientific) yapılarak kullanılacak örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi. BCA için örnek hazırlarken lizatlar seyreltilmeden 10 µL hacimde alınıp temiz ependorflara konuldu. Kalan proteinler -80°C'ye kaldırıldı. Öncelikle BCA standartları, daha sonra da örnekler 96 kuyucuklu plaklara konuldu. Bundan sonra, BCA solüsyonu 50:1 oranında hazırlanıp, standart ve örneklerin üzerine eklendi. Mikroplak 60⁰ etüvde inkübasyona bırakıldı. Standartların rengi koyu mora dönene kadar bekletildi, daha sonra mikroplak okuyucuda okutulup, absorbans değerleri elde edildi. Elde edilen standart eğri yardımıyla örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

Örnek başına 500µg/ml yüklenecek olan proteinler, 5X LB yükleme boyası ile karıştırıldı. Daha sonra 95⁰' de beş dakika boyunca bekletildi ve %12'lik SDS-PAGE jele yüklendi. Jelin başına marker olarak Precision Plus WesternC Standarts, (Cat: 161-0376) yüklendi.

SDS-PAGE jel ile ayrılan örnekler daha sonra PVDF (polivinilden diflorür) membranına transfer edildi. Transferin sonunda membran, 1X TBST içerisinde hazırlanmış %5'lik süt solüsyonu ile bloklandı ve söz konusu proteinlere özel primer antikor olan Akt (pan) (C67E7, Cat: 4691) ile inkübe edildi. Daha sonra örnekler, Horseradish Peroxidase (HRP) ile işaretlenmiş sekonder antikor ile muamele edildi. Görüntülemeye kimyasal ışımaya yöntemine dayanan ECL solüsyonu kullanıldı. Görüntüler, Kodak Medical X-Ray film sistemi ile elde edildi.



Şekil 3.6.7 Örneklerin jele yüklenmesi

Tablo 1: Antikor Listesi

Antikoru Adı	Firma Adı	Katalog Numarası	Primer Antikor Dilüsyon Oranı	Antikor Özelliği
Akt (pan)	Cell Signaling	4691S	1:500	Sitoplazmik boyama
P44/42	Cell Signaling	9102S	1:500	Sitoplazmik/ nüklear boyama
Bcl-2	Abcam	Ab59348	1:500	Sitoplazmik boyama
Ras	Cell Signaling	3965S	1:500	Sitoplazmik boyama
Ki 67	Elabscience	EPP14636	1:500	Sitoplazmik boyama
EGFR	Bioss	Bs-0165R	1:500	Sitoplazmik boyama

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi:

2017			2018				2019
AYLAR	10	11-12	02-03	03-04	06	09-10	01
<u>Literatür Tarama Tez Önerisi Hazırlama</u>	X	X					
<u>Ön Çalışma Yapılması</u>				X			
<u>Etik Kurul İzni</u>			X 08.02.2018				
<u>Veri Toplama</u>					X		
<u>Verilerin Analizi ve Rapor Hazırlama</u>						X	
<u>Tez Bitirme Sınavı</u>							X 11.01.19

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi:

Araştırma sonuçlarının analizleri Graphpad Prism 7.0 programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verildi. Gruplar arası karşılaştırma yapmak için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi tüm değerlendirmelerde $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları:

Bu çalışma 2D hücre kültürü ile in vitro gerçekleştirilecektir. In vivo modelinin olmaması araştırmanın sınırlılığını oluşturmaktadır. Çalışmamızda ki diğer bir sınırlılık ise, çalışmalar yapılırken blotlama yöntemi ile sadece Akt(pan) aktivasyonuna bakılmasıdır. Diğer yolak proteinlerinin aktivasyonu araştırılmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda diğer proteinlerin aktivasyonları da incelenmelidir.

3.10 Etik Kurul Onayı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 08.02.2018 tarih, 3793-GO Aprotokol numaralı : 2018/04-14 karar numaralı kararında çalışmamızın etik açıdan uygun olduğu sonucu çıkmıştır.

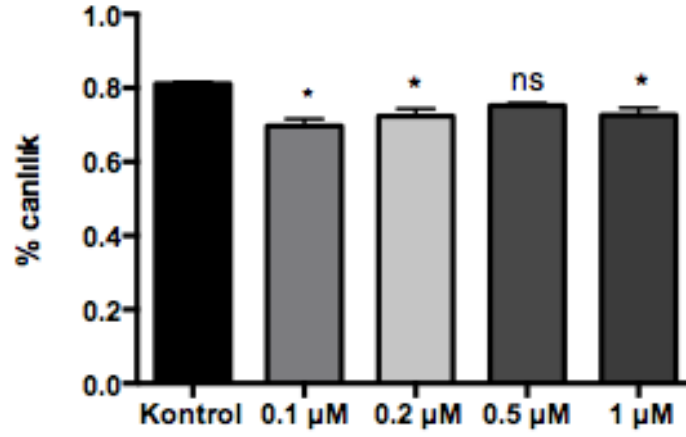
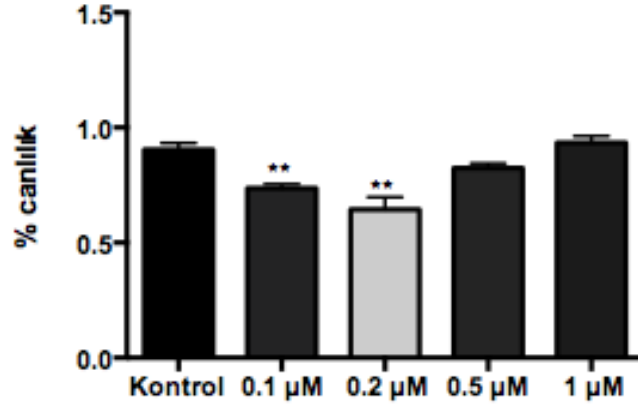


4 BULGULAR

4.1 RA'nın Hücre Canlılığına Etkisi

RA'nın 0,1-1 μM dozlarının hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlendi. Hücre canlılığının oranları, KELLY hücre hattı için kontrol grubunda $\%100 \pm 1$, 0,1 μM 'da $\%97 \pm 3$, 0,2 μM 'da $\%98 \pm 4$, 0,5 μM 'da $\%98 \pm 1$, 1 μM 'da $\%89 \pm 1$ şeklindedir. Grupların p değerleri şöyledir; 0,1 μM için $p=0,2000$, 0,2 μM için $p=0,0952$, 0,5 μM için $p=0,0952$ ve 1 μM için $p=0,0952$.

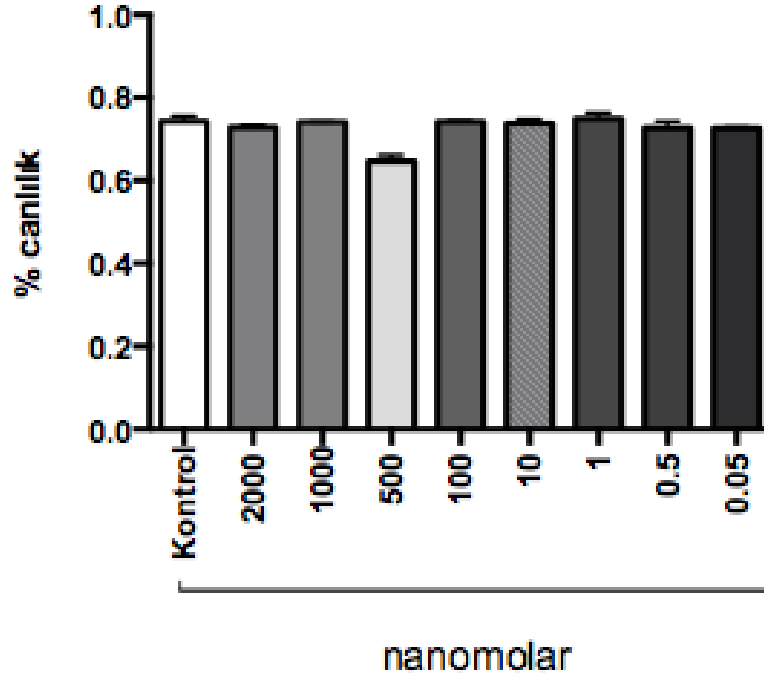
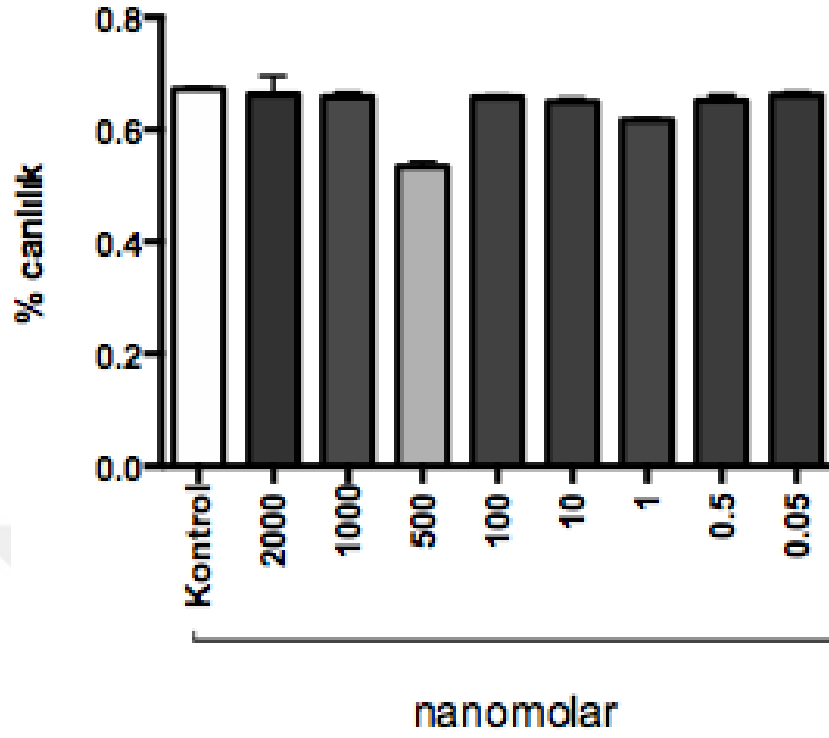




Şekil 4.1.1.Retinoik Asit'in KELLY ve LAN5 Hücre Hatlarında Canlılığa Olan Etkisi

4.2 Takrolimus'un Hücre Canlılığına Etkisi

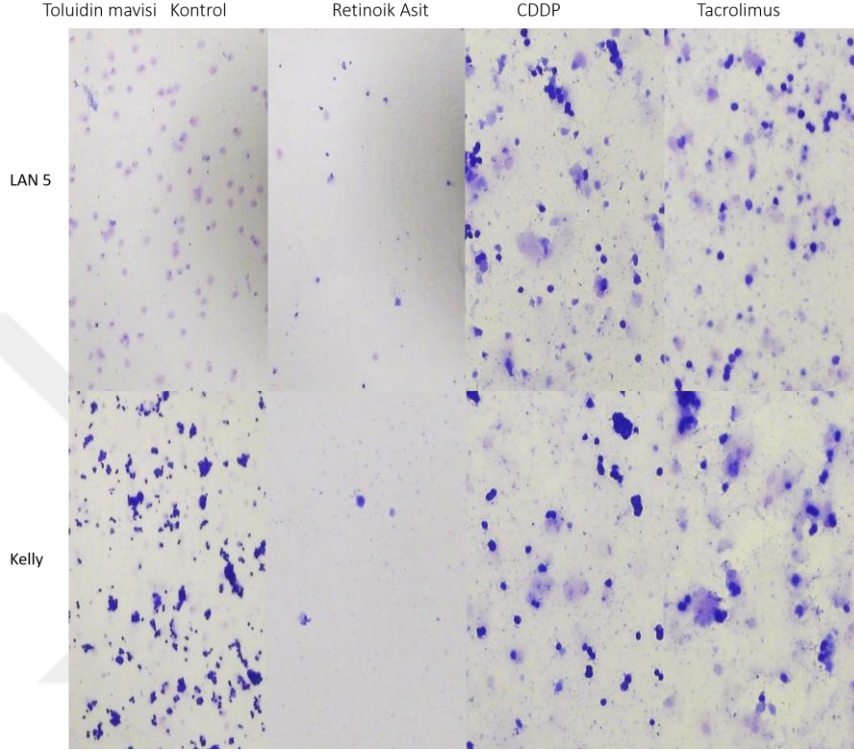
Takrolimus'un 0,05-2000 nM dozlarının hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlendi. Hücre canlılığının oranları, KELLY hücre hattı için kontrol grubunda %100±1, 0,05 µnM'da%97±3, 0,5 nM'da %98±4, 1nM'da %98±1, 10 nM'da %89±1, 100nM şeklindedir.Grupların p değerleri şöyledir; 0,1 µM için p=0.2000, 0,2 µM için p=0.0952, 0,5 µM için p=0.0952 ve 1 µM için p=0.09522



Şekil 4.2.1: Takrolimus'un KELLY ve LAN5 Hücre Hatlarında Canlılığa Olan Etkisi

4.3 Toludin Mavisi Boyaması ile Morfoloji Değerlendirilmesi

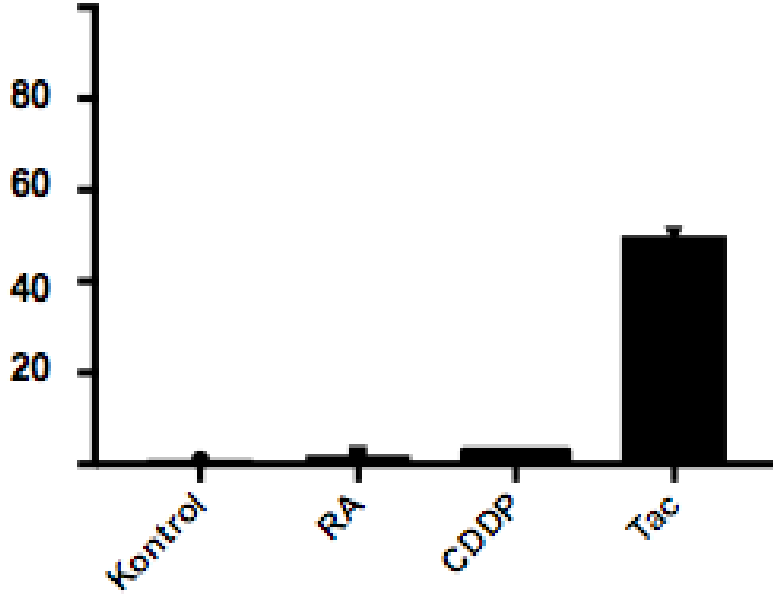
NB hücre hatları KELLY ve LAN5; kontrol, RA 0,2 μ M, CDDP 0,5 μ M ve Tac 500 nm olmak üzere 4 koşul altında incelendi.



Şekil 4.3.1 : Toludin Mavisi ile Boyanan NB Hücreleri

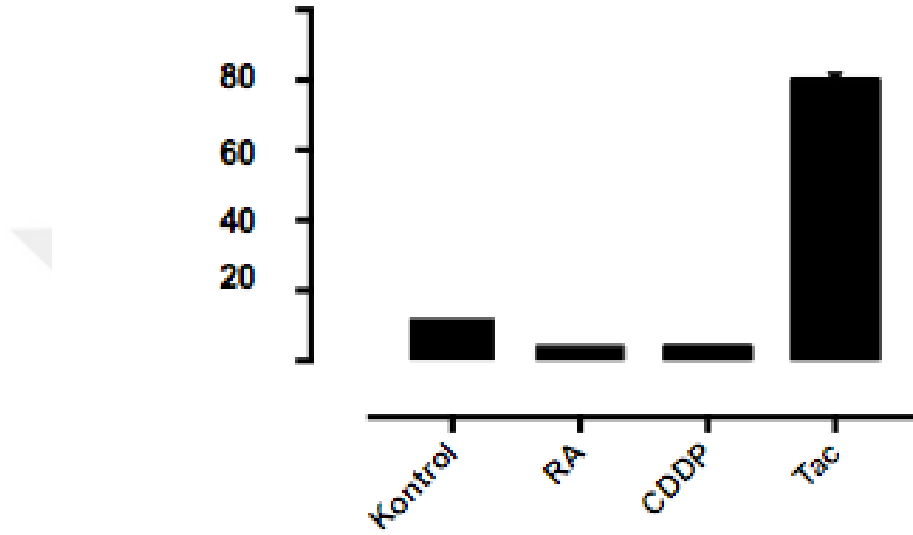
Toludin mavisi, kültür koşullarından alınan lam üzerine yapılan yaymalara uygulandı. Görselde her iki NB hücrelerinde de uygulanan ajanların morfolojik etkileri yer almaktadır. Her iki NB hücresi için kontrolle kıyaslanınca RA grubunun daha az sellüler olduğu, hücre nükleusunda küçülmeler, sitoplazmada genişlemeler olduğu görülmüştür. CDDP ve Tac gruplarında ise hücrelerde apoptotik ve nekrotik değişimler dikkati çekmiştir.

4.4 İmmunositokimyasal Boyamalar ile Protein Yüzdelerinin Belirlenmesi



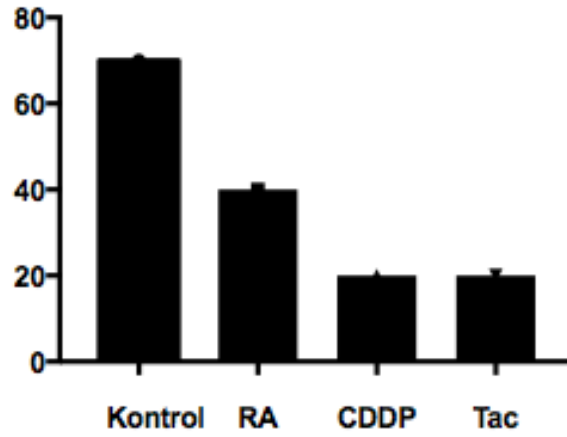
Şekil 4.4.1: KELLY hücrelerinde Akt protein yüzdeleri

KELLY hücrelerinde Akt protein ekspresyonuna bakıldığında kontrol koşulundaki hücreler %1 oranında Akt eksprese ettiği görülmüştür. 0,2 μ M RA verilen hücrelerde %2, 0,5 μ M CDDP verilen hücrelerde %3 oranında protein eksprese edildiği saptanırken, 500 nm Tac koşulu verilen hücrelerde Akt ekspresyonunun arttığı saptanmıştır.



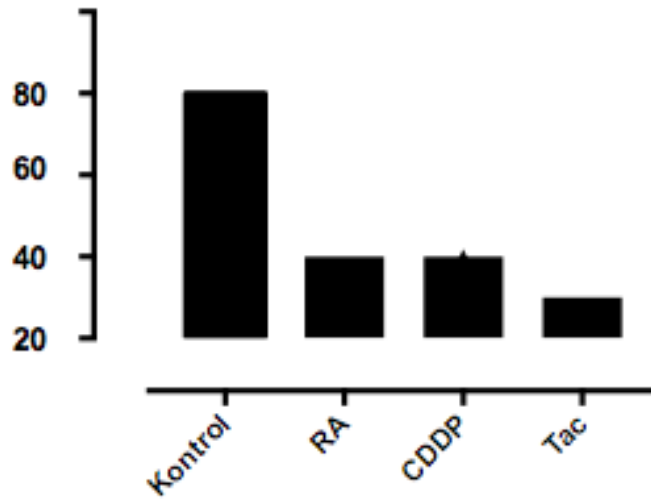
Şekil 4.4.2: LAN5 hücrelerinde Akt protein yüzdeleri

LAN5 hücrelerinde kontrol hücreleri %3 oranında Akt proteini eksprese etmiştir. RA'nın 0,2 μM 'lık dozu verilen hücreler %1, CDDP'nin 0,5 μM dozu %1 ve Tac'ın 500 nm dozu %20 oranında Akt proteinini eksprese etmiştir.



Şekil 4.4.3: Kelly hücrelerinde Ki67 proliferasyon indeksi

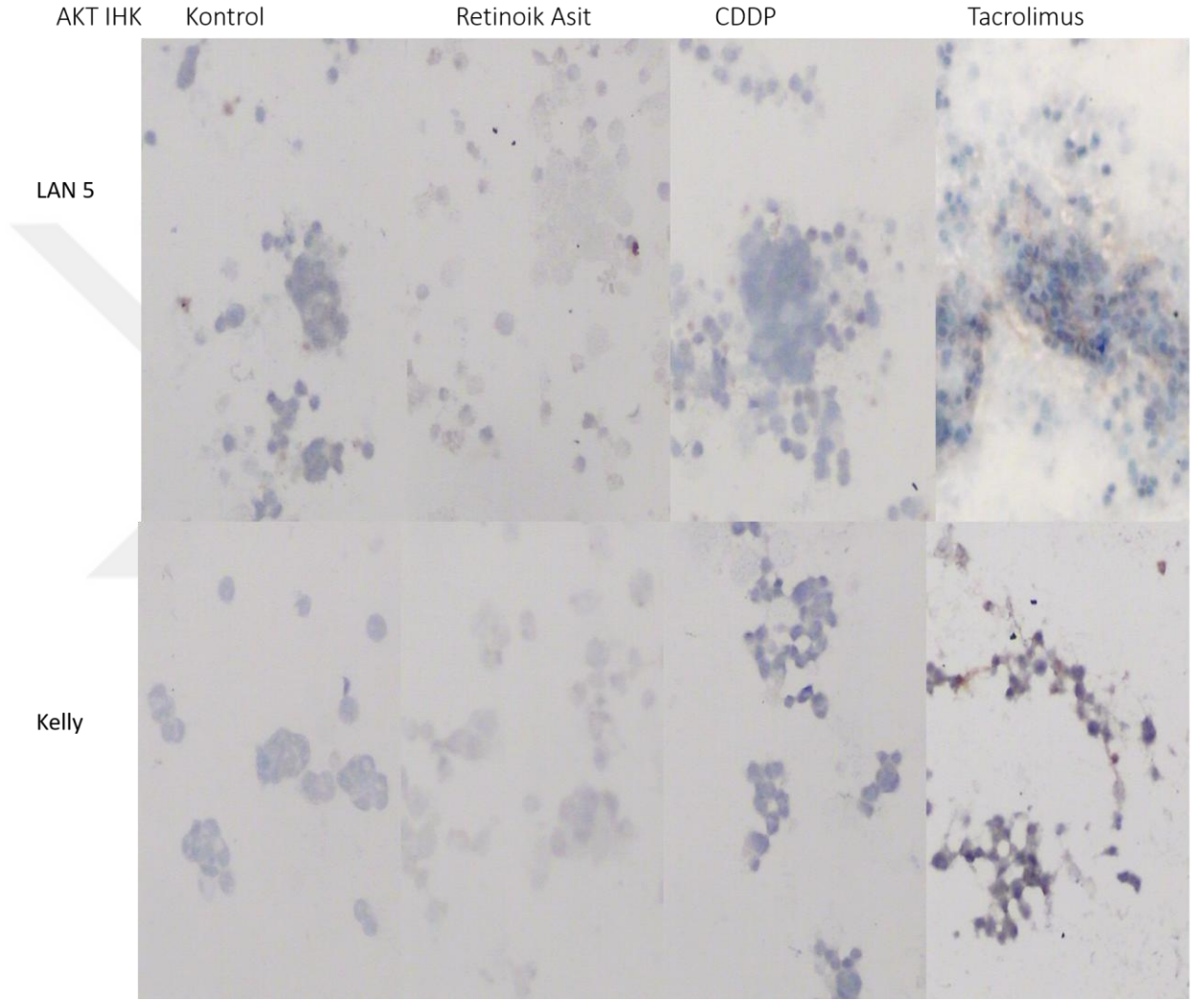
KELLY hücrelerinde kontrol koşulu Ki67 proteinini %70 oranında eksprese ederken, RA'nın 0,2 μM 'lık dozu %40, CDDP'nin 0,5 μM 'lık dozu %20 ve Tac'ın 500 nm'lik dozu %20 oranında Ki67 proteinini eksprese ettiği görülmüştür.



Şekil 4.4.4: LAN5 hücrelerinde Ki67 proliferasyon indeksi

LAN5'in kontrol koşulu Ki 67 proteinini %60 oranında eksprese ettiği görülmüştür.

RA'nın 0,2 μ M verilen dozu LAN5 hücrelerinde Ki 67 proteinini %20, CDDP'nin 0,5 μ M dozu % 20 ve Tac'ın 500 nm'lik dozu %10 oranında eksprese ettiği görülmüştür.



Şekil 4.4.5 : NB hücrelerinde Akt proteininin immunsitokimyasal değerlendirmesi

İmmünsitokimyasal boyama yöntemi ile ekspresyonu bakılan Akt proteininin farklı koşullarda kontrolle karşılaştırmalı LAN5 ve KELLY hücrelerinde mikroskopik görüntüleri şekildeki gibidir (100X, DAB).

Her iki hücre için de, kontrol grubunda, RA grubunda ve CDDP grubunda ekspresyon görülmemiştir. Tac koşulunda ise her iki hücre hattında sitoplazmik ekspresyon dikkati çekmiştir.

Her iki hücre hattında da EGFR, kontrol gruplarında düşük düzeyde ekspresyon gösterirken RA, CDDP ve Tac gruplarında EGFR açısından ekspresyon gözlenmemiştir.

Ras protein ekspresyonu her iki NB hücre hattında da kontrol koşullarında yüksek düzeyde pozitif bulunmuştur. Bu değerler LAN5 hücre hattı için %90 ve KELLY hücre hattı için %100'dür. Her iki NB hücre hattı N-MYC pozitif karakterli olup, kötü diferansiye metastatik NB hücrelerini yansıtmaktadır. Bu hücrelerde Ras yolağının aktif olduğu gösterilmiştir.

Her iki NB hücre hattında RA uygulaması sonrası LAN5 hücreleri için %15, KELLY hücreleri için %10 oranında Ras ekspresyonu saptanmış, RA uygulaması sonrası Ras proteininin ifadesinde belirgin oranda azalma olduğu gösterilmiştir. Diferansiye edici bir ajan olan RA'nın Ras protein ekspresyonunu azaltması, bu yolla RA'nın etkili olduğunu göstermiştir.

CDDP uygulanan koşullarda her iki NB hücre hattı için Ras ekspresyonu gözlenmemiştir. CDDP'nin etki mekanizması gereğince hücredeki sinyal yollarında proliferasyonu indükleyen genlerin negatif geri bildirim ile Ras protein ekspresyonunun azalmasına yol açtığı muhtemeldir.

Tac verilen grupta ise Ras protein ekspresyonu gözlenmemiştir.

Her iki NB hücre hattı için de kontrol koşullarında aktif olmayan ve ekspresyon göstermeyen p44, RA verilen koşullarda LAN5 hücrelerinde %15, KELLY hücrelerinde %30 oranında düşük düzeyde bir ekspresyon artışı göstermiştir.

CDDP koşulu için LAN5 hücrelerinde %5 oranında düşük düzeyde ekspresyon gösterirken , KELLY hücrelerinde ise ekspresyon göstermemiştir.

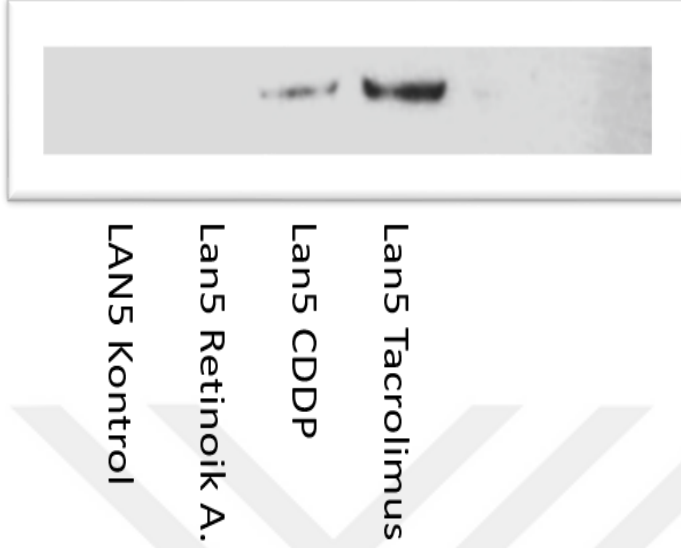
Tac verilen koşullarda LAN5 ve KELLY hücreleri için p44 ekspresyonu gözlenmemiştir.

Proliferasyon ve apoptoz ilişkili olarak Bcl-2'nin immunsitokimyasal bulguları değerlendirilmiştir. LAN5 ve KELLY'nin kontrol hücrelerinde Bcl-2 her ikisinde de %80 oranında eksprese bulunmuştur. Her iki hücre hattına uygulanan RA sonrası Bcl-2 ekspresyon seviyesi %5 olup, Bcl-2 anti apoptotik proteinin ekspresyonunda belirgin şekilde azalma olduğu görülmüştür.

CDDP verilen gruplarda LAN5 hücrelerinde %60 oranında Bcl-2 eksprese edilirken, bu oran KELLY hücreleri için %90'dır.

Tac uygulanan gruplarda her iki NB grubunda da Bcl-2 ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır.

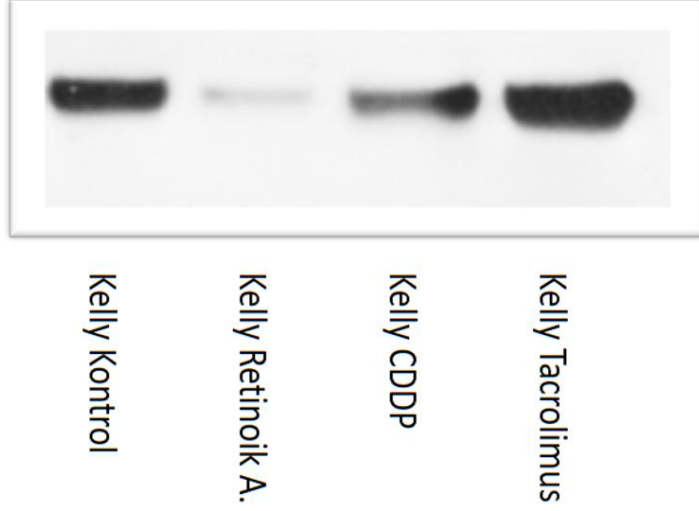
4.5 İmmunblotlama Yöntemi ile Protein Belirlemesi



Şekil 4.5.1 LAN5 hücrelerinde Akt protein ekspresyonu

LAN5 hücrelerinde immunsitokimya ile değerlendirilen Akt protein ekspresyonu, blotlama tekniği olan Western Blot ile de değerlendirilmiştir. Kontrol hücrelerinde Akt proteini eksprese edilmemesi, RA verilen hücrelerde de aynı proteinin ekspresyon seviyesinde bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Buna karşın CDDP'nin 0,5 μ M'lık dozu az da olsa Akt'ın ekspresyon seviyesini artırırken, Tac'ın 500 nm verilen koşulunda protein ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir.

İmmunsitokimya boyamadaki Akt ekspresyonu artışı ile blot yöntemindeki ekspresyon seviyeleri koreledir.



Şekil 4.5.2 KELLY hücrelerinde Akt protein ekspresyonu

KELLY hücrelerinde immunsitokimya ile değerlendirilen Akt protein ekspresyonu, blotlama tekniği olan Western Blot ile de değerlendirilmiştir. Kontrol hücrelerinde Akt'ın eksprese olduğu gözlenmiştir. RA verilen koşulda hücrelerde gözlenen Akt ekspresyonu, kontrol hücrelerine oranla belirgin azalma olduğu görülmüştür. RA uygulamasında hücreler ortamda diferansiye olmaktadır ve bu süreç ile birlikte KELLY hücrelerinde Akt'ın ekspresyon seviyelerinin azalması, RA'nın PI3K/Akt yolağı üzerine baskılayıcı bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. CDDP uygulanan KELLY hücrelerinde Akt'ın ekspresyon seviyesinin, ölüm sonrası kalan hücrelerde sürdüğü düşünülmektedir. Bu durum, CDDP'nin Akt yolağı üzerine etkili olmadığı şeklinde yorumlanmaktadır. Tac verilen grupta ise KELLY hücrelerinde Akt ekspresyonunun kontrol grubuna göre belirgin ölçüde artmış olduğu görülmektedir. Kalsinörin inhibisyon yolu üzerinden mTOR yolağını etkilediği düşünülen bir ajan olan Tac'ın inhibe ettiği yolağın yanında, Akt yolağını aktifleyebileceği şeklinde yorumlanmaktadır.

5 TARTIŞMA

Ras/ERK ve PI3K / mTOR sinyal yolları, hücrenin hayatta kalma, farklılaşma, proliferasyon, metabolizma ve motiliteyi kontrol etmek için hücrenin başlıca mekanizmalarıdır. Aktive edilmiş ERK, RSK (p90 ribozomal S6 kinaz) ve transkripsiyon faktörleri gibi son nokta efektörleri dahil sitoplazmik sinyal proteinlerini fosforile etmektedir (Mendoza, Er et al. 2011).

Bir diğer hücre içi mekanizma olan PI3K/Akt/mTOR yolağı hücre bölünmesi, metabolizması ve hayatta kalmasını kontrol etmektedir. Bunlardan mTOR kompleksi 1 (mTORC1) büyüme faktörleri, enerji seviyeleri, amino asit düzeyleri ve hücrel strese karşı bir yanıt oluşturmaktadır. Akt proteini ise birçok farklı hücre içi sağkalım, proliferasyon ve motilite faktörlerini fosforile etmektedir (Mendoza, Er et al. 2011).

Çalışmamızda, kalsinörin inhibisyon yolu üzerinden mTOR aktivitesini baskıladığı düşünülen Tac'ın etkili bulunan dozları, NB hücre hatları olan KELLY ve LAN5 hücrelerinde denenmiştir. Diferansiye edici özellikte olan RA'nın optimal dozları ise yine aynı hücre hatlarında uygulanmış olup, canlılık üzerine olan etkileri diğer ajanlarla kıyaslanarak gözlenmiştir. NB'nin tedavisinde güncel olarak kullanılan CDDP ise bu deneyde kontrol ajanı olarak kullanılmıştır.

KELLY hücrelerinde Akt protein ekspresyonunu değerlendirdiğimizde immunsitokimya boyamasında RA ve CDDP'nin Akt ekspresyonu üzerine etki etmediğini, Tac uygulanan grupta Akt ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu ekspresyon artışı LAN5 hücrelerinde olduğu gibi kalsinörin inhibitörünün Akt yolağını inhibe edemediği yönünde bir kanıt ortaya sunmaktadır. KELLY hücrelerinde, CDDP'nin Akt yolağına etki etmediği görülmüş olup, bir kalsinörin inhibitörü olan Tac uygulandığında Akt protein ekspresyonunda artış saptanması, mTOR yolağının inhibisyonunda reaktif olarak yolda bir ekspresyon artışı lehine yorumlanır. KELLY için bakıldığında kontrol hücrelerine göre RA ve CDDP'de hafif düzeyde ekspresyonun azaldığı saptanırken, Tac uygulanan grupta Akt ekspresyonundaki artış dikkat çekmektedir. Nöroblastom hücrelerinde Tac uygulaması sonucu Akt proteinindeki ekspresyon artışının, yolağı bloke edemediğinin bir kanıtı olarak düşünebiliriz.

KELLY ve LAN5 hücrelerinde de Ki67 proliferasyon indeksinde kontrol grubuna göre azalma söz konusudur. Ancak bu azalma LAN5 hücrelerinde, KELLY hücrelerinde olduğundan biraz daha fazladır. RA'nın bir diferansiye edici ajan olarak Ki67 proliferasyon indeksini azaltması hücreleri G0 evresinde stabilize etmesi yönünde diferansiyasyon uyarıcı rolü nedeniyle karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanında CDDP ve Tac'ta proliferasyon indeksinin düşük saptanması bu ajanların sitotoksik etkisi yanında proliferasyonu azalttığı yönünde olumlu bir bulgu olarak dikkatimizi çekmiştir.

PI3K'in aracılarının, Akt dahil olmak üzere hücre ölümünü inhibe ederken, proliferasyon, metabolik süreçler veya anjiyogenezin uyarılmasıyla sağkalımı desteklediği bildirilmiştir (Vivanco and Sawyers 2002).

Doku mikrodizileme yöntemi ile yapılan analizlerde, primer nöroblastom vakaları incelendiğinde PI3K / Akt / mTOR yolağının aktivasyonu serin 473 (S473) ve / veya treonin 308'in (T308) fosforile olduğu, ayrıca S6 ribozomal proteinin fosforilasyonunun ve hücre dışı sinyal-regüle kinaz (ERK)'in nöroblastomda önemli rol oynadığı ve Akt fosforilasyonunun nöroblastomda genel sağ kalımın azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Opel, Poremba et al. 2007).

Benzer şekilde, yapılan başka bir çalışmada ise aktive olmuş Akt ve mTOR ekspresyonu, çalışmadaki bütün primer nöroblastom örneklerinde anlamlı bulunurken, malign olmayan adrenal medüller için anlamlılık göstermemiştir (Johnsen, Segerstrom et al. 2008).

PI3K / Akt / mTOR'un anormal aktivasyonu anlaşılabilir şekilde bir sağkalım sinyali oluşturduğundan, bu kaskada ait moleküllerin incelenmesi terapötik müdahale için umut verici hedefler sağlamaktadır. *In vitro* çalışmalarda PI3K / Akt / mTOR sinyal transdüksiyon inhibitörlerinin, tek ajan olarak verildiği zaman sitostatik bir etki gösterdiği düşünülmektedir.

Bununla birlikte, kombine terapiler özellikle daha efektif bir sonuca varılması için bir yöntem olabilir. Bu şekildeki kombinasyonel yaklaşımlar, hücresel inhibisyonda maksimuma ulaşmak yada negatif geri besleme döngülerine müdahale etmek için yukarı akış ve aşağı akış yolundaki moleküllerin eş zamanlı olarak hedeflenmesi şeklinde düşünülmektedir.

KELLY ve LAN5 hücre hatlarında EGFR ekspresyonu değerlendirildiğinde her iki hücre hattı için de kontrol gruplarında düşük düzeyde ekspresyon göstermiş, RA, CDDP ve Tac gruplarında ekspresyon izlenmemiştir. NB patogeneğinde EGFR reseptörleri çok fazla önem taşımamakla birlikte, bu çalışmada hücre koşullarını EGFR reseptörleri açısından değerlendirmemizin temel sebebi, RAS/MAPK yolağı açısından değerlendirmede bulunulması sebebiyle, sinyal kaskadını hücre yüzeyi açısından kontrol etmektir.

Ras protein ekspresyonu her iki hücre hattımızda yüksek oranda ekspresyon gözlenmiştir. Her iki hücre hattı da N-MYC pozitif olup, kötü diferansiye NB hücrelerini yansıtmaktadır. Her iki NB hücresinin kontrol koşullarında Ras yolağı açısından aktiflik olduğu görülmüştür. RA'nın Ras yolağı ile ilişkili proteinlerin ekspresyon seviyelerini etkileyip etkilemediği sorusu bu çalışmanın temel amaçlarından biridir. Her iki NB hücresinde de RA uygulaması sonrası Ras ekspresyonunda bariz şekilde azalma tespit edilmiştir. Diferansiye edici ajan olan RA'nın Ras protein ekspresyonunu azaltması, ajanın bu yolak açısından etkili olduğunun göstergesidir. Çalışmamızın hipotezini önemli ölçüde doğrulayan bir bulgu olarak kabul edilmiştir.

CDDP uygulaması sonrasında Ras protein ekspresyonu, ajanın uygulama sonrasında canlı kalan hücrelerde negatif olarak gözlenmiştir. CDDP'nin etki mekanizması içinde DNA üzerinde oluşturduğu hasar sonucu hücreye gelen sinyal yolaklarında proliferasyonu indükleyen genlerin de negatif geri dönüşümle Ras protein ekspresyonunun azalması, muhtemel mekanizması arasında yer alabilir. Mutasyon ilişkili olmadan protein ekspresyonlarındaki değişimler, kemoterapötik ajanların uygulanmasında önem taşımaktadır.

Tac verilen grupta Ras protein ekspresyonu gözlenmemiş olup, sinyal kaskadı açısından Tac ile inhibe olan mTOR, rölatif olarak bir sonraki basamakta Akt'ın ekspresyonunu arttırmasına karşın, kaskadın daha üst basamağında yer alan Ras proteinindeki ekspresyonu azaltması Tac'ın NB tedavisinde çok etkili bir ajan olamayabileceği yolunda bir sinyal vermektedir. Bu sinyal kaskadında daha alt basamağın aktiflenmesi, nüklear proliferasyon genlerinin aktiflenerek proliferasyonu indüklemesi ile sonuçlanmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı Ras yolağının tek başına inhibe edilmesi NB'de bir tedavi ajanı olma olasılığını düşündürmemiştir. Bu çalışmada yer verilmesinin sebebi ise RA'nın RAS/MAPK ve Akt/mTOR yolağındaki etkisini sorgularken, mTOR inhibisyonuna neden olan bir ajan olması sebebiyle Tac'ın RA ile kıyaslanması amaçlıdır.

P44 proteini, ERK1/2 yolağını yansıtan bir proteindir ve RA ile Ras protein ekspresyonunun düştüğünü gözlemledikten sonra, aslında hücrelerde eksprese olmayan ERK proteini, RA uygulaması sonrasında her iki NB hücre hattında da düşük düzeyde bir ekspresyon artışına sebep olmuştur. Bu sonuca göre ERK yolağının rölatif olarak aktiflenmesi söz konusudur. Sonuç olarak RA uygulaması, RAS/RAF/MAPK/ERK proteinlerinin düzeylerini değiştirmektedir ancak tamamen bloke etmemektedir. Ras proteininin ekspresyonu düşerken Akt ekspresyonu artmakta ve p44 'te daha düşük oranda artış göstermektedir.

Proliferasyon ve apoptoz ilişkili olarak Ki67 ve Bcl-2 protein ekspresyonları değerlendirmesi ile; her iki NB kontrol hücresinde Bcl-2 açısından yüksek seviyede ekspresyon görülmekte olup, Ki67 açısından bakıldığında her iki NB hücresinin kontrol koşulunda da yine yüksek yüzdede ekspresyon izlenmiştir. RA uygulaması sonrası doz bağımlı olarak proliferasyon indeksini düşürmektedir, doz arttıkça proliferasyon azalmaktadır. Bununla birlikte, Bcl-2 yüzdelerini bariz şekilde azaltmakta olup, hücreleri kemoterapötiklere daha duyarlı hale getirme olasılığı bulunmaktadır.

CDDP grubunda ve Tac uygulanan gruplarda her iki NB hücrelerinde de Bcl-2 ekspresyon seviyelerinde istatistiksel anlamda değişiklik gözlenmemiştir ($p < 0,05$).

Patolojik immün tepkimeleri kontrol altında tutmak için terapötik ajanlara gereklilik olduğu bilinmektedir. İlaç piyasasında sayıları giderek artan çeşitli immün baskılayıcı ajanlar geliştirilmiştir. Bununla birlikte, ilk uygulamalarından itibaren immün baskılayıcıların karsinogenezi tetiklediği yönündeki kaygılar mevcudiyetini korumaktadır (Weischer, Rocken et al. 2007).

Farelerde *in vivo* yapılan çalışmalarda böbrek tümörü, H3 hepatosellüler karsinom, aktive edilmiş T hücreleri, akciğer adenokarsinom hücreleri, periferik kan mononükleer hücreleri incelendiğinde, TGF-B düzeyinin takrolimusa bağlı olarak arttığı ve bu sebeple ilişkili tümör progresyonu ve metastazında artış görüldüğü saptanmıştır. Etkinin doza bağlı olarak anlamlılık ifade etmekte olduğu bildirilmiştir (Maluccio, Sharma et al. 2003).

İmmün baskılayıcıların uzun süre kullanımı klinik açıdan karsinogenezi destekleyen kanıtlar sunsa da, bunun tam tersini göstere raporlar mevcuttur. Bilinen immün baskılayıcılar olan Siklosporin A, Takrolimus ve rapamisin, bazı tümör tiplerinde koruma göstermektedir (Weischer, Rocken et al. 2007).

Yapılan *in vitro* bir çalışmada, insan karaciğer kanser hücrelerinde takrolimusun inhibitör etkisi ortaya konmuştur (Sakai, Miyake et al. 2004). Aynı zamanda CD-1 farelerinde 12-O-tetradekanoilphorbol-13-asetat indüklemesiyle deri papilloma oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Jiang, Yamamoto et al. 1993).

Ön çalışmalarda kalsinörin inhibitörlerinin kullanımının anti kanser tedavi mekanizmasındaki yeri araştırılmaktadır. Lenfoma ve lösemi hücre hatları kullanılarak yapılan bir çalışmada CsA ile muamele sonrası hücreler apoptoza sürüklenirken, T- hücreli akut lenfoblastik lösemi modeli olan farelere verilen CsA ve Tac ile farelerde sağ kalımın arttığı ve hızlı tümör klirensi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Medyouf, Alcalde et al. 2007).

Aynı şekilde başka bir çalışmada CsA ve Tac'ın hem *in vitro* hem de *in vivo* ksenograft modeller ile yapılan deneylerinde mesane ve prostat tümörlerinde hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Kawahara, Kashiwagi et al. 2015). Bir başka *in vivo* çalışmada fare meme kanseri modeli üzerinde takrolimus ile tedavide tümör büyümesini ve tümör içi anjiyogenezi azalttığı gösterilmiş olup, *in vitro* koşullarda hem meme tümöründe hem de endotelial hücrelerde hücre göçünü azalttığı bildirilmiştir (Siamakpour-Reihani, Caster et al. 2011).

Her iki hücre hattında da blotlama tekniği ile değerlendirilen Akt protein ekspresyonu, LAN5 hücrelerinde kontrol koşulunda eksprese edilmediği gözlenmiştir. Aynı şekilde RA uygulaması yapılan LAN5 hücre grubunda Akt ekspresyonu gözlenmemiştir. Bu durum, immünohistokimyasal sonuçlar ile koreledir ve Akt proteininin LAN5 hücreleri tarafından eksprese edilmediği düşünülmektedir. Öte yandan LAN5 hücrelerinde, bir kalsinörin inhibitörü olan Tac uygulanan gruplarda Akt protein ekspresyonunda artış saptanması, dolaylı olarak mTOR yolğunun inhibisyonunda negatif etki yaptığının ve Akt yolğını bloke edemediğinin bir kanıtıdır.

Agresif özellikteki NB hücre tipini yansıtan KELLY hücrelerinin Akt ekspresyonu blotlama tekniği ile gösterilmiştir. Buna göre, Akt'ın kontrol koşulunda ekspresyon göstermesi,

bu hücreler tarafından ifade edildiğinin kanıtıdır. RA uygulanan grupta kontrole oranla Akt ekspresyon seviyelerindeki belirgin azalma, bu ajanın yolak üzerinde etkili olduğunu düşündürmüştür. RA, diferansiye edici bir ajan olduğundan, ajan uygulandığı zaman hücreler ortamda yaşamakta ancak diferansiye olmaktadır. Bu diferansiyasyon sürecinde KELLY hücrelerinde Akt ekspresyon düzeylerindeki azalma, RA'nın yolak üzerine baskılayıcı bir etkisi olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Öte yandan, konvansiyonel kemoterapide kullanılan CDDP uygulanan KELLY hücrelerinde birçok hücrede ölüm gerçekleşmiş olup, kalan canlı hücreler üzerinden Akt'ın protein ekspresyonunun Western Blot düzeyinde halen devam ettiği görülmüştür. Bu durum CDDP'nin Akt yolağı üzerinden etkin olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Tac ajanının, kalsinörin inhibisyonu ile mTOR yolağına etki edebileceği düşünülmekte ve bazı tümör tiplerinde koruyuculuğu çalışmalarla gösterilmektedir (Jiang, Yamamoto et al. 1993). Bazı tümör tipleri için hücre proliferasyonunda ve migrasyonunda azalma gösterdiği bilinen Tac'ın NB hücreleri olan KELLY'ye uygulandığında Akt proteininin ekspresyon seviyelerini kontrole göre arttırdığı gözlenmiştir ve Akt yolağını aktifleyebileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, RA ve Tac'ın, konvansiyonel tedavi edici ajan ile kıyaslanarak hücre canlılığı üzerine etkileri ve PI3K/Akt ve RAS/MAPK yolaklarında önemli gen ürünleri olan p44, Ras, Akt ve apoptozda önemli bir protein olan Bcl-2 aktivasyonu incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda KELLY ve LAN5 hücre hatlarına RA ve Tac uygulanarak, canlılık üzerine etkilerine bakılmıştır. Öncelikle RA ve Tac'ın değişik dozları denenerek efektif doz bulunmuştur. Daha sonra RA ve Tac'ın hücre canlılığına olan etkisi MTT testiyle analiz edilmiş ve RA ve Tac'ın hücre canlılığını azaltıcı etkisi gösterilmiştir. Sonuç olarak, RA ve Tac kullanılarak oluşturulan hücre canlılığı modeli ile KELLY ve LAN5 hücre hatlarında canlılığın azaldığı, her iki ajanın da KELLY hücre hattında, LAN5 hücrelerinde olduğundan daha etkili bir canlılık azaltıcı özelliği olduğu gösterilmiştir.

İmmünohistokimyasal boyamalar ile değerlendirilen Akt proteini, dikkat çekici bir bulgu olarak Tac koşulunda hücreler üzerinde proliferatif bir etki göstererek, NB hücreleri için bu yolak üzerinde baskılayıcı bir özellikte olmadığı kanıtlanmıştır. Aynı bulgular blot yöntemi ile de doğrulanmıştır.

Bir başka yolak proteini olan Ras, kontrol hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edilirken RA koşullarında çok belirgin azalma göstermesi, ajanın yolak açısından etkili olduğunu göstermiştir. RAS/MAPK(Erk1/2) yolağına dahil p44 ise RA uygulanan gruplarda düşük düzeyde bir ekspresyon artışı göstermiştir.

Apoptoz belirteci olarak NB kontrol hücrelerinde Bcl-2 seviyelerinin yüksek olup, uygulanan 0,2 μ M'lık RA dozu sonrası bu yüzdelerin belirgin şekilde azalması, RA'nın hücreleri apoptotik yoldan etkilediğini göstermektedir.

İmmünohistokimyasal tekniği olan Western Blot analizleri sonucunda immünohistokimya boyama ile korele sonuçlar alınmıştır. Normal koşullarda Akt proteinini eksprese etmeyen LAN5 hücreleri CDDP'nin 0,5 μ M'lık dozuyla ve Tac'ın 500 nm'lık dozuyla kontrole oranla bariz olarak ekspresyon seviyelerinde artış göstermiştir. KELLY hücrelerinde ise kontrole kıyasla RA'nın 0,2 μ M'lık dozu, belirgin şekilde ekspresyonu azaltmıştır.

7 KAYNAKLAR

1. Abramson, D. H., A. C. Scheffler, K. L. Beaverson, I. S. Rollins, M. S. Ruddat and C. J. Kelly (2002). "Rapid growth of retinoblastoma in a premature twin." *Arch Ophthalmol* 120(9): 1232-1233.
2. Alvarez, S., P. Germain, R. Alvarez, F. Rodriguez-Barrios, H. Gronemeyer and A. R. de Lera (2007). "Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor." *Int J Biochem Cell Biol* 39(7-8): 1406-1415.
3. Applebaum, M. A., A. V. Desai, J. L. Glade Bender and S. L. Cohn (2017). "Emerging and investigational therapies for neuroblastoma." *Expert Opin Orphan Drugs* 5(4): 355-368.
4. Ardini, E., P. Magnaghi, P. Orsini, A. Galvani and M. Menichincheri (2010). "Anaplastic Lymphoma Kinase: role in specific tumours, and development of small molecule inhibitors for cancer therapy." *Cancer Lett* 299(2): 81-94.
5. Bachetti, T., D. Di Paolo, S. Di Lascio, V. Mirisola, C. Brignole, M. Bellotti, I. Caffa, C. Ferraris, M. Fiore, D. Fornasari, R. Chiarle, S. Borghini, U. Pfeffer, M. Ponzoni, I. Ceccherini and P. Perri (2010). "PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: in vitro identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma." *PLoS One* 5(10).
6. Balogh, J., D. Victor, 3rd, E. H. Asham, S. G. Burroughs, M. Boktour, A. Saharia, X. Li, R. M. Ghobrial and H. P. Monsour, Jr. (2016). "Hepatocellular carcinoma: a review." *J Hepatocell Carcinoma* 3: 41-53.
7. Betters, E., Y. Liu, A. Kjaeldgaard, E. Sundstrom and M. I. Garcia-Castro (2010). "Analysis of early human neural crest development." *Dev Biol* 344(2): 578-592.
8. Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." *Nature* 411(6835): 355-365.
9. Borrows, R., G. Chusney, M. Loucaidou, S. Singh, A. James, J. Stichbury, J. Van Tromp, T. Cairns, M. Griffith, N. Hakim, A. McLean, A. Palmer, V. Papalois and D. Taube (2005). "Tacrolimus monitoring in renal transplantation: a comparison between high-performance liquid chromatography and immunoassay." *Transplant Proc* 37(4): 1733-1735.
10. Bottino, R., M. Trucco, A. N. Balamurugan and T. E. Starzl (2002). "Pancreas and islet cell transplantation." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16(3): 457-474.
11. Boubaker, A. and A. Bischof Delaloye (2003). "Nuclear medicine procedures and neuroblastoma in childhood. Their value in the diagnosis, staging and assessment of response to therapy." *Q J Nucl Med* 47(1): 31-40.
12. Bouriez, D., J. Giraud, C. Gronnier and C. Varon (2018). "Efficiency of All-Trans Retinoic Acid on Gastric Cancer: A Narrative Literature Review." *Int J Mol Sci* 19(11).
13. Brodbeck, D., P. Cron and B. A. Hemmings (1999). "A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain." *J Biol Chem* 274(14): 9133-9136.
14. Brodeur, G. M., R. C. Seeger, A. Barrett, F. Berthold, R. P. Castleberry, G. D'Angio, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot, A. I. Freeman and et al. (1988). "International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma." *J Clin Oncol* 6(12): 1874-1881.

15. Brozovic, A., A. Ambriovic-Ristov and M. Osmak (2010). "The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin." *Crit Rev Toxicol* 40(4): 347-359.
16. Bultynck, G., H. De Smedt, J. B. Parys, G. Callewaert and L. Missiaen (2002). "Washing out of lipophilic compounds induces a transient increase in the passive Ca(2+) leak in permeabilized A7r5 cells." *Cell Calcium* 31(5): 229-233.
17. Bushue, N. and Y. J. Wan (2010). "Retinoid pathway and cancer therapeutics." *Adv Drug Deliv Rev* 62(13): 1285-1298.
18. Butler Tjaden, N. E. and P. A. Trainor (2013). "The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease." *Transl Res* 162(1): 1-15.
19. Caforio, A. L., A. B. Fortina, S. Piaserico, M. Alaibac, F. Tona, G. Feltrin, E. Pompei, L. Testolin, A. Gambino, S. D. Volta, G. Thiene, D. Casarotto and A. Peserico (2000). "Skin cancer in heart transplant recipients: risk factor analysis and relevance of immunosuppressive therapy." *Circulation* 102(19 Suppl 3): Iii222-227.
20. Cepko, C. L., C. P. Austin, X. Yang, M. Alexiades and D. Ezzeddine (1996). "Cell fate determination in the vertebrate retina." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2): 589-595.
21. Chen, D., V. Milacic, M. Frezza and Q. P. Dou (2009). "Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy." *Curr Pharm Des* 15(7): 777-791.
22. Chen, X., A. Bahrami, A. Pappo, J. Easton, J. Dalton, E. Hedlund, D. Ellison, S. Shurtleff, G. Wu, L. Wei, M. Parker, M. Rusch, P. Nagahawatte, J. Wu, S. Mao, K. Boggs, H. Mulder, D. Yergeau, C. Lu, L. Ding, M. Edmonson, C. Qu, J. Wang, Y. Li, F. Navid, N. C. Daw, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. R. Downing, J. Zhang and M. A. Dyer (2014). "Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma." *Cell Rep* 7(1): 104-112.
23. Chen, X., A. Pappo and M. A. Dyer (2015). "Pediatric solid tumor genomics and developmental pliancy." *Oncogene* 34(41): 5207-5215.
24. Chen, X., E. Stewart, A. A. Shelat, C. Qu, A. Bahrami, M. Hatley, G. Wu, C. Bradley, J. McEvoy, A. Pappo, S. Spunt, M. B. Valentine, V. Valentine, F. Krafchik, W. H. Lang, M. Wierdl, L. Tsurkan, V. Tolleman, S. M. Federico, C. Morton, C. Lu, L. Ding, J. Easton, M. Rusch, P. Nagahawatte, J. Wang, M. Parker, L. Wei, E. Hedlund, D. Finkelstein, M. Edmonson, S. Shurtleff, K. Boggs, H. Mulder, D. Yergeau, S. Skapek, D. S. Hawkins, N. Ramirez, P. M. Potter, J. A. Sandoval, A. M. Davidoff, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. Zhang, J. R. Downing and M. A. Dyer (2013). "Targeting oxidative stress in embryonal rhabdomyosarcoma." *Cancer Cell* 24(6): 710-724.
25. Cheng, J. Q., B. Ruggeri, W. M. Klein, G. Sonoda, D. A. Altomare, D. K. Watson and J. R. Testa (1996). "Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3636-3641.
26. Connolly, R. M., N. K. Nguyen and S. Sukumar (2013). "Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment." *Clin Cancer Res* 19(7): 1651-1659.
27. Corry, R. J., P. Chakrabarti, R. Shapiro, M. L. Jordan, V. P. Scantlebury and C. A. Vivas (2001). "Comparison of enteric versus bladder drainage in pancreas transplantation." *Transplant Proc* 33(1-2): 1647-1651.
28. Crespo-Leiro, M. G., M. J. Paniagua, I. Mosquera, T. Tabuyo, L. De la Fuente, B. Bouzas, J. A. Rodriguez, L. F. Hermida, A. Juffe and A. Castro-Beiras (2002). "Replacement of cyclosporine by tacrolimus for immunosuppression in heart transplant patients: safety and efficacy." *Transplant Proc* 34(1): 113-114.

29. Das, B. C., P. Thapa, R. Karki, S. Das, S. Mahapatra, T. C. Liu, I. Torregroza, D. P. Wallace, S. Kambhampati, P. Van Veldhuizen, A. Verma, S. K. Ray and T. Evans (2014). "Retinoic acid signaling pathways in development and diseases." *Bioorg Med Chem* 22(2): 673-683.
30. Dasari, S. and P. B. Tchounwou (2014). "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action." *Eur J Pharmacol* 740: 364-378.
31. Datta, S. R., A. Brunet and M. E. Greenberg (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." *Genes Dev* 13(22): 2905-2927.
32. De Preter, K., J. Vermeulen, B. Brors, O. Delattre, A. Eggert, M. Fischer, I. Janoueix-Lerosey, C. Lavarino, J. M. Maris, J. Mora, A. Nakagawara, A. Oberthuer, M. Ohira, G. Schleiermacher, A. Schramm, J. H. Schulte, Q. Wang, F. Westermann, F. Speleman and J. Vandesompele (2010). "Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature." *Clin Cancer Res* 16(5): 1532-1541.
33. Delire, B. and P. Starkel (2015). "The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications." *Eur J Clin Invest* 45(6): 609-623.
34. Desoize, B. (2002). "Cancer and metals and metal compounds: part I--carcinogenesis." *Crit Rev Oncol Hematol* 42(1): 1-3.
35. Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath and W. Kolch (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." *Oncogene* 26(22): 3279-3290.
36. Di Lascio, S., T. Bachetti, E. Saba, I. Ceccherini, R. Benfante and D. Fornasari (2013). "Transcriptional dysregulation and impairment of PHOX2B auto-regulatory mechanism induced by polyalanine expansion mutations associated with congenital central hypoventilation syndrome." *Neurobiol Dis* 50: 187-200.
37. Ding, L., C. Yuan, F. Wei, G. Wang, J. Zhang, A. C. Bellail, Z. Zhang, J. J. Olson and C. Hao (2011). "Cisplatin restores TRAIL apoptotic pathway in glioblastoma-derived stem cells through up-regulation of DR5 and down-regulation of c-FLIP." *Cancer Invest* 29(8): 511-520.
38. Downing, J. R., R. K. Wilson, J. Zhang, E. R. Mardis, C. H. Pui, L. Ding, T. J. Ley and W. E. Evans (2012). "The Pediatric Cancer Genome Project." *Nat Genet* 44(6): 619-622.
39. Downward, J. (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 262-267.
40. Duvic, M., K. Hymes, P. Heald, D. Breneman, A. G. Martin, P. Myskowski, C. Crowley and R. C. Yocum (2001). "Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma: multinational phase II-III trial results." *J Clin Oncol* 19(9): 2456-2471.
41. Eleveld, T. F., D. A. Oldridge, V. Bernard, J. Koster, L. Colmet Daage, S. J. Diskin, L. Schild, N. B. Bentahar, A. Bellini, M. Chicard, E. Lapouble, V. Combaret, P. Legoix-Ne, J. Michon, T. J. Pugh, L. S. Hart, J. Rader, E. F. Attiyeh, J. S. Wei, S. Zhang, A. Naranjo, J. M. Gastier-Foster, M. D. Hogarty, S. Asgharzadeh, M. A. Smith, J. M. Guidry Auvil, T. B. Watkins, D. A. Zwiijnenburg, M. E. Ebus, P. van Sluis, A. Hakkert, E. van Wezel, C. E. van der Schoot, E. M. Westerhout, J. H. Schulte, G. A. Tytgat, M. E. Dolman, I. Janoueix-Lerosey, D. S. Gerhard, H. N. Caron, O. Delattre, J. Khan, R. Versteeg, G. Schleiermacher, J. J. Molenaar and J. M. Maris (2015). "Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations." *Nat Genet* 47(8): 864-871.
42. Evan, G. I. and K. H. Vousden (2001). "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer." *Nature* 411(6835): 342-348.

43. Ezzeldin, M., E. Borrego-Diaz, M. Taha, T. Esfandyari, A. L. Wise, W. Peng, A. Rouyanian, A. Asvadi Kermani, M. Soleimani, E. Patrad, K. Lialyte, K. Wang, S. Williamson, B. Abdulkarim, M. Olyaei and F. Farassati (2014). "RasA signaling pathway as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma (HCC)." *Mol Oncol* 8(5): 1043-1053.
44. Florea, A. M. and D. Busselberg (2011). "Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects." *Cancers (Basel)* 3(1): 1351-1371.
45. Fredlund, E., M. Ringner, J. M. Maris and S. Pahlman (2008). "High Myc pathway activity and low stage of neuronal differentiation associate with poor outcome in neuroblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(37): 14094-14099.
46. Fresno Vara, J. A., E. Casado, J. de Castro, P. Cejas, C. Belda-Iniesta and M. Gonzalez-Baron (2004). "PI3K/Akt signalling pathway and cancer." *Cancer Treat Rev* 30(2): 193-204.
47. Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja (1986). "A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma." *Nature* 323(6089): 643-646.
48. Fruman, D. A., R. E. Meyers and L. C. Cantley (1998). "Phosphoinositide kinases." *Annu Rev Biochem* 67: 481-507.
49. Hansford, L. M., W. D. Thomas, J. M. Keating, C. A. Burkhart, A. E. Peaston, M. D. Norris, M. Haber, P. J. Armati, W. A. Weiss and G. M. Marshall (2004). "Mechanisms of embryonal tumor initiation: distinct roles for MycN expression and MYCN amplification." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34): 12664-12669.
50. Hatley, M. E., W. Tang, M. R. Garcia, D. Finkelstein, D. P. Millay, N. Liu, J. Graff, R. L. Galindo and E. N. Olson (2012). "A mouse model of rhabdomyosarcoma originating from the adipocyte lineage." *Cancer Cell* 22(4): 536-546.
51. Heneghan, M. A. and I. G. McFarlane (2002). "Current and novel immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis." *Hepatology* 35(1): 7-13.
52. Hofmann, S. L. (1992). "Retinoids--"differentiation agents" for cancer treatment and prevention." *Am J Med Sci* 304(3): 202-213.
53. Houle, B., C. Rochette-Egly and W. E. Bradley (1993). "Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(3): 985-989.
54. Huang, M. and W. A. Weiss (2013). "Neuroblastoma and MYCN." *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(10): a014415.
55. Ito, Y., Y. Sasaki, M. Horimoto, S. Wada, Y. Tanaka, A. Kasahara, T. Ueki, T. Hirano, H. Yamamoto, J. Fujimoto, E. Okamoto, N. Hayashi and M. Hori (1998). "Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma." *Hepatology* 27(4): 951-958.
56. Jain, J., P. G. McCaffrey, V. E. Valge-Archer and A. Rao (1992). "Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun." *Nature* 356(6372): 801-804.
57. Jiang, H., S. Yamamoto, K. Nishikawa and R. Kato (1993). "Anti-tumor-promoting action of FK506, a potent immunosuppressive agent." *Carcinogenesis* 14(1): 67-71.
58. Johnsen, J. I., L. Segerstrom, A. Orrego, L. Elfman, M. Henriksson, B. Kagedal, S. Eksborg, B. Sveinbjornsson and P. Kogner (2008). "Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth in vitro and in vivo." *Oncogene* 27(20): 2910-2922.

59. Johnson, D. A., J. Zhang, S. Frase, M. Wilson, C. Rodriguez-Galindo and M. A. Dyer (2007). "Neuronal differentiation and synaptogenesis in retinoblastoma." *Cancer Res* 67(6): 2701-2711.
60. Jones, P. F., T. Jakubowicz, F. J. Pitossi, F. Maurer and B. A. Hemmings (1991). "Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(10): 4171-4175.
61. Kalt, D. A. (2017). "Tacrolimus: A Review of Laboratory Detection Methods and Indications for Use." *Lab Med* 48(4): e62-e65.
62. Katso, R., K. Okkenhaug, K. Ahmadi, S. White, J. Timms and M. D. Waterfield (2001). "Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 615-675.
63. Kawahara, T., E. Kashiwagi, H. Ide, Y. Li, Y. Zheng, H. Ishiguro and H. Miyamoto (2015). "The role of NFATc1 in prostate cancer progression: cyclosporine A and tacrolimus inhibit cell proliferation, migration, and invasion." *Prostate* 75(6): 573-584.
64. Knobbe, C. B. and G. Reifenberger (2003). "Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas." *Brain Pathol* 13(4): 507-518.
65. Kushner, B. H. (2004). "Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies." *J Nucl Med* 45(7): 1172-1188.
66. Lauder, A., A. Castellanos and K. Weston (2001). "c-Myb transcription is activated by protein kinase B (PKB) following interleukin 2 stimulation of Tcells and is required for PKB-mediated protection from apoptosis." *Mol Cell Biol* 21(17): 5797-5805.
67. Lawlor, M. A. and D. R. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" *J Cell Sci* 114(Pt 16): 2903-2910.
68. Lebewohl, D. and R. Canetta (1998). "Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update." *Eur J Cancer* 34(10): 1522-1534.
69. Lippman, S. M., J. J. Lee, D. D. Karp, E. E. Vokes, S. E. Benner, G. E. Goodman, F. R. Khuri, R. Marks, R. J. Winn, W. Fry, S. L. Graziano, D. R. Gandara, G. Okawara, C. L. Woodhouse, B. Williams, C. Perez, H. W. Kim, R. Lotan, J. A. Roth and W. K. Hong (2001). "Randomized phase III intergroup trial of isotretinoin to prevent second primary tumors in stage I non-small-cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst* 93(8): 605-618.
70. Lonergan, G. J., C. M. Schwab, E. S. Suarez and C. L. Carlson (2002). "Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation." *Radiographics* 22(4): 911-934.
71. Louis, C. U. and J. M. Shohet (2015). "Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy." *Annu Rev Med* 66: 49-63.
72. Maluccio, M., V. Sharma, M. Lagman, S. Vyas, H. Yang, B. Li and M. Suthanthiran (2003). "Tacrolimus enhances transforming growth factor-beta1 expression and promotes tumor progression." *Transplantation* 76(3): 597-602.
73. Marsland, A. M. and C. E. Griffiths (2002). "The macrolide immunosuppressants in dermatology: mechanisms of action." *Eur J Dermatol* 12(6): 618-622.
74. Mayo, L. D. and D. B. Donner (2001). "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11598-11603.
75. Medyouf, H., H. Alcalde, C. Berthier, M. C. Guillemin, N. R. dos Santos, A. Janin, D. Decaudin, H. de The and J. Ghysdael (2007). "Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Nat Med* 13(6): 736-741.

76. Mendoza, M. C., E. E. Er and J. Blenis (2011). "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." *Trends Biochem Sci* 36(6): 320-328.
77. Mirabello, L., R. J. Troisi and S. A. Savage (2009). "Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program." *Cancer* 115(7): 1531-1543.
78. Monclair, T., G. M. Brodeur, P. F. Ambros, H. J. Brisse, G. Cecchetto, K. Holmes, M. Kaneko, W. B. London, K. K. Matthay, J. G. Nuchtern, D. von Schweinitz, T. Simon, S. L. Cohn and A. D. Pearson (2009). "The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report." *J Clin Oncol* 27(2): 298-303.
79. Mosse, Y. P., M. Laudenslager, D. Khazi, A. J. Carlisle, C. L. Winter, E. Rappaport and J. M. Maris (2004). "Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma." *Am J Hum Genet* 75(4): 727-730.
80. Nakatani, K., D. A. Thompson, A. Barthel, H. Sakaue, W. Liu, R. J. Weigel and R. A. Roth (1999). "Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines." *J Biol Chem* 274(31): 21528-21532.
81. Nam, S. Y., H. S. Lee, G. A. Jung, J. Choi, S. J. Cho, M. K. Kim, W. H. Kim and B. L. Lee (2003). "Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis." *Apmis* 111(12): 1105-1113.
82. Nicholson, K. M. and N. G. Anderson (2002). "The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy." *Cell Signal* 14(5): 381-395.
83. Ohrnberger, S., A. Thavamani, A. Braeuning, D. B. Lipka, M. Kirilov, R. Geffers, S. E. Autenrieth, M. Romer, A. Zell, M. Bonin, M. Schwarz, G. Schutz, P. Schirmacher, C. Plass, T. Longerich and A. Nordheim (2015). "Dysregulated serum response factor triggers formation of hepatocellular carcinoma." *Hepatology* 61(3): 979-989.
84. Olayioye, M. A., R. M. Neve, H. A. Lane and N. E. Hynes (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." *Embo j* 19(13): 3159-3167.
85. Opel, D., C. Poremba, T. Simon, K. M. Debatin and S. Fulda (2007). "Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma." *Cancer Res* 67(2): 735-745.
86. Osaki, M., S. Kase, K. Adachi, A. Takeda, K. Hashimoto and H. Ito (2004). "Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45." *J Cancer Res Clin Oncol* 130(1): 8-14.
87. Osaki, M., M. Oshimura and H. Ito (2004). "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer." *Apoptosis* 9(6): 667-676.
88. Owens, C. and M. Irwin (2012). "Neuroblastoma: the impact of biology and cooperation leading to personalized treatments." *Crit Rev Clin Lab Sci* 49(3): 85-115.
89. Ozes, O. N., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer and D. B. Donner (1999). "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." *Nature* 401(6748): 82-85.
90. Papaioannou, G. and K. McHugh (2005). "Neuroblastoma in childhood: review and radiological findings." *Cancer Imaging* 5(1): 116-127.
91. Parsons, C. M., D. Muilenburg, T. L. Bowles, S. Virudachalam and R. J. Bold (2010). "The role of Akt activation in the response to chemotherapy in pancreatic cancer." *Anticancer Res* 30(9): 3279-3289.
92. Pawson, T. and P. Nash (2000). "Protein-protein interactions define specificity in signal transduction." *Genes Dev* 14(9): 1027-1047.

93. Pei, D., W. Luther, W. Wang, B. H. Paw, R. A. Stewart and R. E. George (2013). "Distinct neuroblastoma-associated alterations of PHOX2B impair sympathetic neuronal differentiation in zebrafish models." *PLoS Genet* 9(6): e1003533.
94. Peti, W. and R. Page (2013). "Molecular basis of MAP kinase regulation." *Protein Sci* 22(12): 1698-1710.
95. Picarsic, J. and M. Reyes-Mugica (2015). "Phenotype and immunophenotype of the most common pediatric tumors." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 23(5): 313-326.
96. Pivonkova, H., M. Brazdova, J. Kasparkova, V. Brabec and M. Fojta (2006). "Recognition of cisplatin-damaged DNA by p53 protein: critical role of the p53 C-terminal domain." *Biochem Biophys Res Commun* 339(2): 477-484.
97. Plosker, G. L. and R. H. Foster (2000). "Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation." *Drugs* 59(2): 323-389.
98. Powis, G., R. Bonjouklian, M. M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W. F. Matter, J. Dodge, G. Grindey and et al. (1994). "Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase." *Cancer Res* 54(9): 2419-2423.
99. Prabhakaran, P., F. Hassiotou, P. Blancafort and L. Filgueira (2013). "Cisplatin induces differentiation of breast cancer cells." *Front Oncol* 3: 134.
100. Pugh, T. J., O. Morozova, E. F. Attiyeh, S. Asgharzadeh, J. S. Wei, D. Auclair, S. L. Carter, K. Cibulskis, M. Hanna, A. Kiezun, J. Kim, M. S. Lawrence, L. Lichtenstein, A. McKenna, C. S. Peadarallu, A. H. Ramos, E. Shefler, A. Sivachenko, C. Sougnez, C. Stewart, A. Ally, I. Birol, R. Chiu, R. D. Corbett, M. Hirst, S. D. Jackman, B. Kamoh, A. H. Khodabakshi, M. Krzywinski, A. Lo, R. A. Moore, K. L. Mungall, J. Qian, A. Tam, N. Thiessen, Y. Zhao, K. A. Cole, M. Diamond, S. J. Diskin, Y. P. Mosse, A. C. Wood, L. Ji, R. Sposto, T. Badgett, W. B. London, Y. Moyer, J. M. Gastier-Foster, M. A. Smith, J. M. Guidry Auvil, D. S. Gerhard, M. D. Hogarty, S. J. Jones, E. S. Lander, S. B. Gabriel, G. Getz, R. C. Seeger, J. Khan, M. A. Marra, M. Meyerson and J. M. Maris (2013). "The genetic landscape of high-risk neuroblastoma." *Nat Genet* 45(3): 279-284.
101. Rajalingam, K., R. Schreck, U. R. Rapp and S. Albert (2007). "Ras oncogenes and their downstream targets." *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1177-1195.
102. Reyes, J., G. V. Mazariegos, K. Abu-Elmagd, C. Macedo, G. J. Bond, N. Murase, J. Peters, R. Sindhi and T. E. Starzl (2005). "Intestinal transplantation under tacrolimus monotherapy after perioperative lymphoid depletion with rabbit anti-thymocyte globulin (thymoglobulin)." *Am J Transplant* 5(6): 1430-1436.
103. Reynolds, C. P., Y. Wang, L. J. Melton, P. A. Einhorn, D. J. Slamon and B. J. Maurer (2000). "Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide." *Med Pediatr Oncol* 35(6): 597-602.
104. Rha, S. E., J. Y. Byun, S. E. Jung, H. J. Chun, H. G. Lee and J. M. Lee (2003). "Neurogenic tumors in the abdomen: tumor types and imaging characteristics." *Radiographics* 23(1): 29-43.
105. Ring, E. K., J. M. Markert, G. Y. Gillespie and G. K. Friedman (2017). "Checkpoint Proteins in Pediatric Brain and Extracranial Solid Tumors: Opportunities for Immunotherapy." *Clin Cancer Res* 23(2): 342-350.
106. Ross-Innes, C. S., R. Stark, K. A. Holmes, D. Schmidt, C. Spyrou, R. Russell, C. E. Massie, S. L. Vowler, M. Eldridge and J. S. Carroll (2010). "Cooperative interaction between retinoic acid receptor-alpha and estrogen receptor in breast cancer." *Genes Dev* 24(2): 171-182.

107. Ruza, E., E. Sotillo, L. Sierrasesumaga, C. Azcona and A. Patino-Garcia (2003). "Analysis of polymorphisms of the vitamin D receptor, estrogen receptor, and collagen Ialpha1 genes and their relationship with height in children with bone cancer." *J Pediatr Hematol Oncol* 25(10): 780-786.
108. Sabio, G. and R. J. Davis (2014). "TNF and MAP kinase signalling pathways." *Semin Immunol* 26(3): 237-245.
109. Sakai, M., H. Miyake, S. Tashiro, Y. Okumura and H. Kido (2004). "Inhibitory effect of FK506 and cyclosporine A on the growth and invasion of human liver cancer cells." *J Med Invest* 51(1-2): 63-69.
110. Sanchez-Margalet, V., I. D. Goldfine, C. J. Vlahos and C. K. Sung (1994). "Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294002." *Biochem Biophys Res Commun* 204(2): 446-452.
111. Santin, G., L. Scietti, P. Veneroni, S. Barni, G. Bernocchi and M. G. Bottone (2012). "Effects of Cisplatin in neuroblastoma rat cells: damage to cellular organelles." *Int J Cell Biol* 2012: 424072.
112. Schramm, A., J. Koster, T. Marschall, M. Martin, M. Schwermer, K. Fielitz, G. Buchel, M. Barann, D. Esser, P. Rosenstiel, S. Rahmann, A. Eggert and J. H. Schulte (2013). "Next-generation RNA sequencing reveals differential expression of MYCN target genes and suggests the mTOR pathway as a promising therapy target in MYCN-amplified neuroblastoma." *Int J Cancer* 132(3): E106-115.
113. Schubbert, S., G. Bollag and K. Shannon (2007). "Deregulated Ras signaling in developmental disorders: new tricks for an old dog." *Curr Opin Genet Dev* 17(1): 15-22.
114. Schulte, J. H., S. Lindner, A. Bohrer, J. Maurer, K. De Preter, S. Lefever, L. Heukamp, S. Schulte, J. Molenaar, R. Versteeg, T. Thor, A. Kunkle, J. Vandesompele, F. Speleman, H. Schorle, A. Eggert and A. Schramm (2013). "MYCN and ALK1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells." *Oncogene* 32(8): 1059-1065.
115. Schultz, R. M., R. L. Merriman, S. L. Andis, R. Bonjouklian, G. B. Grindey, P. G. Rutherford, A. Gallegos, K. Massey and G. Powis (1995). "In vitro and in vivo antitumor activity of the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor, wortmannin." *Anticancer Res* 15(4): 1135-1139.
116. Seki, E., D. A. Brenner and M. Karin (2012). "A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches." *Gastroenterology* 143(2): 307-320.
117. Semba, S., N. Itoh, M. Ito, M. Harada and M. Yamakawa (2002). "The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells." *Clin Cancer Res* 8(6): 1957-1963.
118. Shin, I., F. M. Yakes, F. Rojo, N. Y. Shin, A. V. Bakin, J. Baselga and C. L. Arteaga (2002). "PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization." *Nat Med* 8(10): 1145-1152.
119. Siamakpour-Reihani, S., J. Caster, D. Bandhu Nepal, A. Courtwright, E. Hilliard, J. Usary, D. Ketelsen, D. Darr, X. J. Shen, C. Patterson and N. Klauber-Demore (2011). "The role of calcineurin/NFAT in SFRP2 induced angiogenesis--a rationale for breast cancer treatment with the calcineurin inhibitor tacrolimus." *PLoS One* 6(6): e20412.

120. Siddikuzzaman, C. Guruvayoorappan and V. M. Berlin Grace (2011). "All trans retinoic acid and cancer." *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33(2): 241-249.
121. Staal, S. P. (1987). "Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(14): 5034-5037.
122. Stephens, P. J., C. D. Greenman, B. Fu, F. Yang, G. R. Bignell, L. J. Mudie, E. D. Pleasance, K. W. Lau, D. Beare, L. A. Stebbings, S. McLaren, M. L. Lin, D. J. McBride, I. Varela, S. Nik-Zainal, C. Leroy, M. Jia, A. Menzies, A. P. Butler, J. W. Teague, M. A. Quail, J. Burton, H. Swerdlow, N. P. Carter, L. A. Morsberger, C. Iacobuzio-Donahue, G. A. Follows, A. R. Green, A. M. Flanagan, M. R. Stratton, P. A. Futreal and P. J. Campbell (2011). "Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development." *Cell* 144(1): 27-40.
123. Takahashi, Y., D. Sipp and H. Enomoto (2013). "Tissue interactions in neural crest cell development and disease." *Science* 341(6148): 860-863.
124. Tallman, M. S., J. W. Andersen, C. A. Schiffer, F. R. Appelbaum, J. H. Feusner, A. Ogden, L. Shepherd, C. Willman, C. D. Bloomfield, J. M. Rowe and P. H. Wiernik (1997). "All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia." *N Engl J Med* 337(15): 1021-1028.
125. Tanaka, H., A. Kuroda, H. Marusawa, M. Hashimoto, H. Hatanaka, T. Kino, T. Goto and M. Okuhara (1987). "Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*." *Transplant Proc* 19(5 Suppl 6): 11-16.
126. Tang, X. H. and L. J. Gudas (2011). "Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer." *Annu Rev Pathol* 6: 345-364.
127. Tanno, S., N. Yanagawa, A. Habiro, K. Koizumi, Y. Nakano, M. Osanai, Y. Mizukami, T. Okumura, J. R. Testa and Y. Kohgo (2004). "Serine/threonine kinase AKT is frequently activated in human bile duct cancer and is associated with increased radioresistance." *Cancer Res* 64(10): 3486-3490.
128. Tate, B. F., A. A. Levin and J. F. Grippo (1994). "The discovery of 9-cis retinoic acid: a hormone that binds the retinoid-X receptor." *Trends Endocrinol Metab* 5(5): 189-194.
129. Testa, J. R. and A. Bellacosa (2001). "AKT plays a central role in tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 10983-10985.
130. Theissen, J., A. Oberthuer, A. Hombach, R. Volland, F. Hertwig, M. Fischer, R. Spitz, M. Zapatka, B. Brors, M. Ortmann, T. Simon, B. Hero and F. Berthold (2014). "Chromosome 17/17q gain and unaltered profiles in high resolution array-CGH are prognostically informative in neuroblastoma." *Genes Chromosomes Cancer* 53(8): 639-649.
131. Treede, H., W. Klepetko, H. Reichenspurner, A. Zuckermann, B. Meiser, T. Birsan, W. Wisser and B. Reichert (2001). "Tacrolimus versus cyclosporine after lung transplantation: a prospective, open, randomized two-center trial comparing two different immunosuppressive protocols." *J Heart Lung Transplant* 20(5): 511-517.
132. Trochet, D., F. Bourdeaut, I. Janoueix-Lerosey, A. Deville, L. de Pontual, G. Schleiermacher, C. Coze, N. Philip, T. Frebourg, A. Munnich, S. Lyonnet, O. Delattre and J. Amiel (2004). "Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma." *Am J Hum Genet* 74(4): 761-764.
133. Vanhaesebroeck, B. and D. R. Alessi (2000). "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB." *Biochem J* 346 Pt 3: 561-576.

134. Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer* 2(7): 489-501.
135. Wakamatsu, Y., Y. Watanabe, H. Nakamura and H. Kondoh (1997). "Regulation of the neural crest cell fate by N-myc: promotion of ventral migration and neuronal differentiation." *Development* 124(10): 1953-1962.
136. Wallemacq, P., J. S. Goffinet, S. O'Morchoe, T. Rosiere, G. T. Maine, M. Labalette, G. Aimo, D. Dickson, E. Schmidt, R. Schwinzer and R. W. Schmid (2009). "Multi-site analytical evaluation of the Abbott ARCHITECT tacrolimus assay." *Ther Drug Monit* 31(2): 198-204.
137. Wang, H., H. Qian, J. Yu, X. Zhang, L. Zhang, M. Fu, X. Liang, Q. Zhan and C. Lin (2006). "Administration of PUMA adenovirus increases the sensitivity of esophageal cancer cells to anticancer drugs." *Cancer Biol Ther* 5(4): 380-385.
138. Wang, M., C. Zhou, Q. Sun, R. Cai, Y. Li, D. Wang and L. Gong (2013). "ALK amplification and protein expression predict inferior prognosis in neuroblastomas." *Exp Mol Pathol* 95(2): 124-130.
139. Wang, W., Q. Zhong, L. Teng, N. Bhatnagar, B. Sharma, X. Zhang, W. Luther, 2nd, L. P. Haynes, R. D. Burgoyne, M. Vidal, S. Volchenboum, D. E. Hill and R. E. George (2014). "Mutations that disrupt PHOXB interaction with the neuronal calcium sensor HPCAL1 impede cellular differentiation in neuroblastoma." *Oncogene* 33(25): 3316-3324.
140. Weischer, M., M. Rocken and M. Berneburg (2007). "Calcineurin inhibitors and rapamycin: cancer protection or promotion?" *Exp Dermatol* 16(5): 385-393.
141. Woenckhaus, J., K. Steger, E. Werner, I. Fenic, U. Gamerding, T. Dreyer and U. Stahl (2002). "Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma." *J Pathol* 198(3): 335-342.
142. Yao, R. and G. M. Cooper (1995). "Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor." *Science* 267(5206): 2003-2006.
143. Zhang, J., J. Gray, L. Wu, G. Leone, S. Rowan, C. L. Cepko, X. Zhu, C. M. Craft and M. A. Dyer (2004). "Rb regulates proliferation and rod photoreceptor development in the mouse retina." *Nat Genet* 36(4): 351-360.
144. Zhou, B. P., Y. Liao, W. Xia, Y. Zou, B. Spohn and M. C. Hung (2001). "HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation." *Nat Cell Biol* 3(11): 973-982.

8. EKLER

2.2. 8.1. EK-1 Etik Kurul Onayı

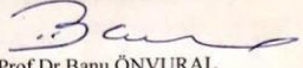
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk. 08.02.2018
Sayı : 130

Sayın Prof.Dr.Safiye AKTAŞ,

Kurulumuz tarafından 08.02.2018 tarih ve 3793-GOA protokol numaralı 2018/04-14 karar numarası ile görüşülen “Çocukluk Çağı Solid Tümörlerinde Retinoik Asitin P13K/AKT ve RAS/MAPK Yolakları Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Saptanması” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Inciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3793-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Çocukluk Çağı Solid Tümörlerinde Retinoik Asitin P13K/AKT ve RAS/MAPK Yolakları Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Saptanması	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Safiye AKTAŞ Onkoloji Enstitüsü	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/04-14	Tarih:08.02.2018
	Prof.Dr.Safiye AKTAŞ'ın sorumlusu olduğu "Çocukluk Çağı Solid Tümörlerinde Retinoik Asitin P13K/AKT ve RAS/MAPK Yolakları Üzerine Etkisinin Western Blot Yöntemi ile Saptanması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Gül Ergör</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Katılamadı</i>
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılamadı</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Katılamadı</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Müge</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>S. Özkardeşler</i>
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Sülen</i>
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Bilge</i>
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>S. Kızıldağ</i>
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Ayhan</i>
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>M. Arıcı</i>
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	<i>M. Bektaş</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Ahmet Can</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	<i>M. Erhan</i>

8.2.Özgeçmiş



ÖZDE ELİF GÖKBAYRAK

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	26050458516
Doğum Tarihi	14/04/1994
İletişim Adresi	Evka 3 Mahallesi, Şehitler Caddesi, Turan Apt. Kat:1
Telefon	(539) 881 60 30
E-posta	ozdegokbayrak@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Temmuz 2017 - Şu Anda (1 yıl 6 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.69 / 4.0

01 Eylül 2012 - 01 Ocak 2017 (4 yıl 5 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLÖJİ BÖLÜMÜ
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.47 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

FRANSIZCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

Ar-Ge Yetkinlik

Bildiriler

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, Ö. BEKÇİOĞLU, H. E. KOLATAN, Ö. E. GÖKBAYRAK, A. EROL, O. YILMAZ, Z. S. ALTUN & S. AKTAŞ, Optimisation Of Xenograft Cancer Modelling In Mice, Sözlü Sunum, 7. Multidisipliner Kanser Araştırma Ve 1. Temel Onkoloji Kongresi, 11 Ekim 2018, 14 Ekim 2018.

A. EROL, Ö. E. GÖKBAYRAK, S. AKTAŞ, E. Ö. SERİNAN, H. KAYALAR & H. N. OLGUN, The Effect Of Dehydroleucodine On Neuroblastoma, Sözlü Sunum, 7. Multi?di?si?pli?ner Kanser Araştırma Ve 1. Temel Onkoloji? Kongresi?, 11 Ekim 2018, 14 Ekim 2018.

T. AKTAŞ, E. Ö. SERİNAN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, M. AYDIN, Ö. E. GÖKBAYRAK, A. EROL, S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN & H. N. OLGUN, Molecular Heterogenity In Neuroblastoma (on Behalf Of Turkish Paediatric Oncology Group), Poster Sunumu, 25th Biennial Congress Of The European Association For Cancer Research,, 30 Haziran 2018, 03 Temmuz 2018.

Ö. E. GÖKBAYRAK, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. EROL, E. KAYAR DOĞAN & S. AKTAŞ, Silymarin'in Ewing Sarkom Kök Hücrelerindeki Etkisi, Sözlü Sunum, 1.temel Onkoloji Sempozyumu Tümör Biyolojisi Ve Genetiği, 09 Mayıs 2018, 11 Mayıs 2018.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0