



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KÜÇÜK HÜCRE DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE KRAS
G12C SPESİFİK İNHİBİTÖRÜ AMG510'UN HİPPO
YOLAĞIYLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ali Can KOÇ

**2020
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRE DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE KRAS G12C
SPESİFİK İNHİBİTÖRÜ AMG510'UN HİPPO YOLAĞIYLA
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Ali Can KOÇ

Tez DanıŐmanı: Dr. Öğretim Üyesi Aydın DEMİRAY

Denizli 2020

ÖZET

KÜÇÜK HÜCRE DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE KRAS G12C SPESİFİK İNHİBİTÖRÜ AMG 510'UN HIPPO YOLAĞI İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ali Can KOÇ

Yüksek Lisans Tezi, Kanser Moleküler Biyolojisi AD

Tez Yöneticisi: Dr. Öğretim Üyesi Aydın DEMİRAY

Temmuz 2020

Akciğer kanseri dünyada kansere bağlı ölümlerde en baŐta yer almaktadır. Akciğer kanseri teşhisi konmuŐ hastaların %85'i KHDAK hastasıdır. KHDAK'lerinde KRAS mutasyonları çok sıklıkla gözlemlenmektedir bu durumdan dolayı KRAS mutasyonları moleküler hedef haline gelmiştir. Amgen firması tarafından üretilen KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510, KRas G12C mutasyonuna sahip hastalar için büyük öneme sahiptir. Fakat organ boyutu, proliferasyon, doku mimarisi gibi birçok hücrenel olayda rol alan Hippo yolağının kanser tedavilerinde direnç mekanizmaları geliŐtirerek kanserin tedavisini zorlaştırdığı bilinmektedir. Bu çalışmada KRAS G12C mutant KHDAK hücre hattı NCI-H23 ve KRAS WT KHDAK hücre hattı NCI-H1975'te KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510'un kullanılarak KRAS/MAPK yolağı blokajına rağmen Hippo yolağının çekirdek komponentlerinden YAP/TAZ'ın ve Fosfo-YAP (Ser127) protein ifadeleri araŐtırılmıŐtır. Yapılan çalışmada 72 Saat süresince AMG 510 uygulanan hücre hatlarında western blot yöntemiyle protein seviyeleri araŐtırılmıŐtır. 72 saat AMG 510 uygulanan NCI-H23 ve kontrol NCI-H23 hücre hattında YAP/TAZ seviyeleri tayin edilmiş ve AMG 510 uygulanan örneklerde YAP/TAZ ifadelerinin anlamlı Şekilde arttığı tespit edilmiştir. Fonksiyon gösteremeyen Fosfo-YAP ifade seviyeleri ise azalmıŐtır. Bu durum moleküler hedefli KHDAK tedavisinde Hippo yolağından dolayı direnç mekanizması gösterdiğini aŐıklamaktadır.

Anahtar Kelimeler: KHDAK, KRAS, Hippo, AMG 510

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiŐtir (Proje No: 2019SABE030).

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF KRAS G12C SPECIFIC INHIBITOR
AMG 510 WITH HIPPO PATHWAY IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

Koç, Ali Can
M.Sc Thesis in Cancer Molecular Biology
Supervisor: PhD. DEMİRAY, Aydın
July 2020,

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths in the world. 85% of patients diagnosed with lung cancer are NSCLC patients. KRAS mutations are frequently observed in NSCLC, which is why KRAS mutations have become molecular targets. The KRAS G12C specific inhibitor AMG 510, produced by the company Amgen, is of great importance for patients with the KRAS G12C mutation. However, the Hippo pathway, which plays a role in many cellular process such as organ size, proliferation, and tissue architecture, is known to develop resistance mechanisms in cancer treatments, making it difficult to treat cancer. In this study, the KRAS G12C mutant NSCLC cell line NCI-H23 and KRAS WT NSCLC cell line NCI-H1975, using KRAS G12C specific inhibitor AMG 510, despite the blockade of KRAS / MAPK pathway, the core components of the Hippo pathway are YAP / TAZ and Phospho-YAP(Ser127). Protein expressions were investigated. In the study, protein levels were investigated in 72 lines using AMG 510 by western blot experiment. YAP / TAZ levels were determined in the NCI-H23 and control NCI-H23 cell lines, which were administered AMG 510 for 72 hours, and it was found that the expression of YAP / TAZ increased significantly in the samples applied AMG 510. Phospho-YAP expression levels that did not function decreased. This situation explains that it shows resistance mechanism due to Hippo pathway in the treatment of molecular targeted NSCLC.

Keywords: NSCLC, KRAS, Hippo, AMG 510

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Project
Coordination Unit through Project number 2019SABE030.**

TEŞEKKÜRLER

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca deneyim, bilgi ve desteğini benden esirgemeyen, tecrübesi, eleştiri ve fikirleriyle gelişimime yön veren saygı değer ve değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Aydın DEMİRAY'a,

Çalışmalarım boyunca her türlü laboratuvar desteğini sunan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya

Çalışmalarımda her türlü bilgi ve desteğini benden esirgemeyen Doktora öğrencisi Ege Rıza KARAGÜR'e ve laboratuvar arkadaşlarıma,

Tez projeme maddi destek sağlayan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımın her anında yanımda olan ve beni destekleyen ailem ve sevdiklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜRLER.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1 AMAÇ.....	2
2. KURUMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1 AKCİĞER KANSERİ	4
2.1.1 Epidemiyolojisi	4
2.1.2 Etyolojisi	5
2.1.3 Histolojik Sınıflandırılması	6
2.1.4 Evrelendirilmesi	8
2.2 KRİSTEN RAT SARKOMA (KRAS).....	10
2.2.1 KRAS Yapısı	10
2.2.2 KRas Aktivasyonu.....	11
2.2.3. Kras Yolakları	12
2.2.4. KRAS Mutasyonları.....	13
2.3. HIPPO YOLAĞI.....	14
2.3.1. Hippo Yolağının Düzenlenmesi.....	16
2.3.1.1. Mekanik Sinyaller	16
2.3.1.2. Hücre polaritesi ve Hücre adezyonu	18
2.3.2. Hippo yolağı ve Kanser.....	21
2.4. AMG 510.....	23
2.5. HİPOTEZ	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	25
3.1.1. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	26
3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR	26
3.3. SİTOTOKSİSİTE TAYİNİ	27
3.4. WESTERN BLOT	28
3.4.1. Örneklerden Protein Eldesi	28
3.4.2. Protein Miktarının Tayin Edilmesi	28
3.4.3. SDS-Poliakrilamid Jel'in Hazırlanması	29
3.4.4. SDS-PAGE Jel Elektroforezi.....	29
3.4.5. PVDF Membrana Islak Transfer	30

3.4.6. İmmunoblotlama ve Görüntüleme.....	30
3.5 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	32
4.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE HATLARINDA AMG 510 İÇİN IC50 DEĞERLERİNİN TAYİNİ.....	33
4.3. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	35
4.4. NCI-H23 HÜCRE HATTINDA YAP/TAZ PROTEİN TAYİNİ	35
4.5 AMG 510 UYGULANAN NCI-H23 HÜCRE HATTINDA YAP/TAZ PROTEİN TAYİNİ	37
4.6. AMG 510 UYGULANAN NCI-H1975 HÜCRE HATTINDA YAP/TAZ PROTEİN TAYİNİ.....	40
5. TARTIŞMA	43
6.SONUÇLAR	49
7. KAYNAKÇA	50
8.ÖZGEÇMİŞ.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Global sigara tüketimi ve Akciğer kanseri mortalitesi 1990-2030 (Proctor, 2002)	5
Şekil 2.2: Kras geni ekzon yapısı, mutasyonları ve protein bölgeleri (krishnan, 2018) 10	10
Şekil 2.3: Kras proteinin GTPaz döngüsü (P. Liu et al., 2019).....	11
Şekil 2.4: RAS sinyal yolları (Simanshu et al., 2017)	12
Şekil 2.5: 2034 KHDAK hastasında KRAS mutasyonları (Sanger Database) (Wood et al., 2016).....	14
Şekil 2.6 : A: Drosophilla normal Yki ekspresyonu(sol), anormal Yki ekspresyonu (sağ), B: Memelilerde normal YAP/TAZ ekspresyonu(sol), anormal YAP/TAZ ekspresyonu(sağ) (Pan, 2010).....	15
Şekil 2.7: Memelilerde Hippo yolağı (Ma et al., 2019).....	16
Şekil 2.8 : Mekanik sinyallenmede YAP/TAZ ve Hippo yolağı (Ma et al., 2019).....	17
Şekil 2.9: Memelilerde Hippo yolağının düzenlenmesi (F. X. Yu et al., 2015).....	19
Şekil 2.10: İnsan kanserlerinde YAP/TAZ (Zanconato et al., 2016).	21
Şekil 2.11: BRAF ve RAS mutant kanserlerde YAP'ın fonksiyonu (Lin et al., 2015) ...	22
Şekil 2.12: AMG 510'un kimyasal yapısı ve KRAS proteinin ile etkileşimi (Canon et al., 2019)	24
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan hücre hatları H23 (Sol) ve H1975 (Sağ)	26
Şekil 4.1: NCI-H23 Hücre dizisinde AMG 510 IC50 tayini	33
Şekil 4.2: NCI-H1975 Hücre dizisinde AMG 510 IC50 tayini.....	34
Şekil 4.3: Tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarında YAP/TAZ seviyeleri.....	36
Şekil 4.4: AMG 510 uygulanan NCI-H23 hücre hattında YAP/TAZ seviyeleri.....	37
Şekil 4.5: AMG 510 uygulanan NCI-H23 hücre hattında Fosfo-YAP (Ser127) seviyeleri	39
Şekil 4.6: AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında YAP/TAZ protein seviyeleri	40
Şekil 4.7: AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında Fosfo-YAP(Ser127) seviyeleri.....	42
Şekil 5.1: Moleküler hedefli kanser tedavilerinde YAP/TAZ sinyallenmesi ve direnç mekanizmaları (Nguyen & Yi, 2019).46	46
Şekil 5.2: BRAF ve RAS mutant kanserlerde YAP'ın fonksiyonu (Lin et al., 2015)	47

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılı Akciğer kanserinin histopatolojik sınıflandırması (Travis et al., 2015).....	7
Tablo 2.2: Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneği 8. Yayın TNM Evrelendirme Sistemi (Goldstraw et al., 2016).	9
Tablo 2.3: Memeli ve Drosophila'da Hippo yolağının regülatörleri	20
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri	25
Tablo 3.2: H23 ve H1975 Hücre hatlarına uygulanan AMG 510 Konsantrasyonları.....	27
Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan hücre hatlarının population doubling zamanları	32
Tablo 4.2: NCI-H23 Yüzde canlılık grafiği.....	34
Tablo 4.3: NCI-H1975 Yüzde canlılık grafiği.....	35
Tablo 4.4: NCI-H23(Mavi) ve NCI-H1975 Hücre dizilerinde rölatif YAP/TAZ ekspresyon seviyeleri.....	36
Tablo 4.5: NCI-H23 Hücre hattında AMG 510 uygulandıktan sonra rölatif YAP/TAZ seviyeleri.....	38
Tablo 4.6: AMG 510 uygulanan NCI-H23 hücre hattında Fosfo-YAP rölatif seviyeleri	39
Tablo 4.7: AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında rölatif YAP/TAZ protein seviyeleri.....	41
Tablo 4.8: AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında rölatif Fosfo-YAP(Ser127) seviyeleri.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJ.....	Adherens junction
DMSO.....	Dimetil sülfoksit
ECM.....	Ekstrasellüler matris
EGFR.....	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
ERK.....	Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz
HPO.....	Ste20 benzeri protein kinaz Hippo
GAP.....	GTPaz aktive edici protein
GEF.....	Guanin-nükleotit değiştirme faktörü
GRB2.....	Büyüme faktör reseptör bağlanma protein 2
IHC.....	İmmünohistokimyasal
KRAS.....	Kirsten Rat Sarcoma
KOAH.....	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KHAK.....	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK.....	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
MAPK.....	Mitojenle etkileşen protein kinaz
MATS.....	Mob tümör suppressor
MEK.....	Mitojen aktive edici protein kinaz
PI3K.....	Fosfoinositid-3 Kinaz
PIP ₂	Fosfotidilinositol-4,5-bisfosfat
PIP ₃	Fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfat
PH.....	Plekstrin Homolog
RAF.....	Ras ilişkili faktör
RTK.....	Reseptör Tirozin Kinaz
SAV.....	WW domaini içeren Salvador
SOS.....	Son of Sevenless
TNM.....	Tümör-Nodül-Metastaz
TAZ.....	WW-domain içeren transkripsiyon regülatör protein 1
TJ.....	Tight junction
YAP.....	Yes-associated protein
YKİ.....	Yorkie
TP53.....	Protein 53

WHO.....Dünya Sağlık Örgütü

WTS.....NDR ailesi protein kinaz Warts

μgMikrogram

μlMikrolitre

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Artan dünya nüfusu ve gelişen teknoloji ile beraber dünyada sağlık sorunları çok büyük sorun haline gelmeye başlamıştır. Bu sağlık sorunları başında kanser en üst sıralarda yer almaktadır. Artan dünya nüfusu ve gelişen teknolojiyle beraber çevre kirliliği, egzoz gazları, radyasyon, mesleki maruziyet, genetiği değiştirilmiş besin maddeleri ve artan sigara ve alkol tüketimiyle beraber kanser hastalarının sayısı da giderek yükselişe geçmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre 2018 yılında 18,1 milyon yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kanser ilişkili ölüm gerçekleşmiştir. Her 5 erkekten 1'i, her 6 kadından 1'i hayatı boyunca kanser hastalığı ile karşılaşmakta ve her 8 erkekten 1'i, her 11 kadından 1'i kanserden dolayı hayatını kaybetmektedir. Kansere bağlı ölümlerin en yüksek oranda sorumlusu akciğer kanseridir. 2018 yılında kansere bağlı ölümlerin %18,4'ünden 1.8 milyon insanın ölümünden akciğer kanseri sorumludur (Release, 2018).

Akciğer kanseri her yıl dünya çapında 1.6 milyon insanın ölümünden sorumludur (Torre et al., 2015). Çevresel etmenler (Hava kirliliği, radyasyon maruziyeti vb.) ve yaşam biçimine bağlı olarak akciğer kanseri hasta sayıları her geçen gün giderek artmaktadır. Tütün ve tütün ürünlerinin tüketimi akciğer kanserinin en önemli sebeplerindedir. Sigara kullanımı akciğer kanseri vakalarının %85-90 kadarından sorumludur. Sigara kullanımı ve asbest gibi kanserojenlere maruziyet akciğer kanseri riskini çok yüksek oranda arttırmaktadır. Akciğer kanserlerinin iki ana formu bulunmaktadır bu formlar %15 oranıyla küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve en sık ve yaygın gözlenen formu olan %85 oranıyla küçük hücre dışı akciğer kanseridir (KHDAK) (Duma et al., 2019).

KHDAK'larının meydana gelmesinde en yaygın olarak epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) ve Kristen Rat Sarcoma (KRAS) geninde meydana gelen somatik mutasyonlar sebep olmaktadır (Duma et al., 2019). KRAS' geninde meydana gelen mutasyonların batı ülkelerinde görülen akciğer adenokarsinomlarının %20-25'inden, Asya ülkelerinde ise %10-15'inden sorumludur. KHDAK'arında görülen KRAS mutasyonlarının %95'i 12. Kodonda meydana gelen mutasyonlardır (Ferrer et al., 2018a). KHDAK'lerinde KRAS mutasyonlarının bu denli sık görülmesi üzerine yapılan çalışmaları ve araştırmaları arttırmıştır.

KHDAK'lerinin dışında KRAS mutasyonları %3 oranında kolorektal kanserlerde ve %2 oranında diğer kanser tiplerinde gözlenmektedir (Canon et al., 2019). Bu sebepten dolayı kanser tedavi araştırmalarının hedefi haline gelmiştir. Amgen firması KRAS geninin 12. Kodonunda glisin aminoasitinin sisteine dönüşmesiyle meydana gelen KRAS G12C mutasyonunu hedef alan AMG 510 inhibitörünü geliştirmiştir (Lanman et al., 2020). AMG 510, KRAS G12C mutasyonuna sahip kanser hastaları için umut ışığı oluşturmuştur. Şuanda klinik faz 1 ve faz 2 çalışmaları devam etmektedir (*A Phase 1/2, Study Evaluating the Safety, Tolerability, PK, and Efficacy of AMG 510 in Subjects With Solid Tumors With a Specific KRAS Mutation (CodeBreak 100) - Full Text View - ClinicalTrials.gov, n.d.-a*).

İlk defa *Drosophila melanogaster* keşfedilen Hippo yolağı daha sonra yapılan çalışmalarla insandaki ortolog proteinleri gösterilmiştir. Hippo yolağının hücrede hücre büyümesi, hücresel kaderin kararlaştırılması, organ boyutunun kontrolü, rejenerasyon gibi birçok biyolojik prosesten sorumludur (Ma et al., 2019). Hippo yolağını kompetentlerinin kanser ile de ilişkili olduğunun gösterilmesiyle önemi giderek artmıştır. Özellikle Hippo yolağının kanserlerde direnç mekanizması geliştirmesi üzerine yapılan çalışmaları arttırmıştır.

1.1 Amaç

Bu yapılan çalışmayla birlikte KHDAK'larında meydana gelen KRAS G12C mutasyonunu hedef alan AMG 510'unun KRAS G12C mutasyonu taşıyan hücre hatlarında ve KRAS yaban tip hücre hatlarında etkinliğinin tespit edilmesi,

KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510'unun kullanılmasına rağmen Hippo yolağından dolayı kaynaklanması olası olan bypass, direnç mekanizmasının ve Hippo yolağının çekirdek kompetentlerinin protein düzeyinde değişimlerin tespit edilip gösterilmesi,

KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510'unun klinik kullanıma başlanmasıdan önce in vitro düzeyde hakkında daha fazla biyolojik mekanizmanın aydınlatılması amaçlanmaktadır.

2. KURUMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri 20. yy'a kadar nadir görülen bir hastalık iken şuan günümüzde ise kansere bağlı ölümlerde en ön sıradadır (Ahmad, 2016). Akciğer kanserinin dünyada ki en büyük sağlık problemlerinden biri haline gelmesinin en büyük sebeplerinden biri sigara kullanımının da meydana gelen tarihsel değişimden dolayı kaynaklanmaktadır (Thun et al., 2012).

2.1.1 Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri dünyada şuan en çok teşhisi konulan kanserdir. İnsidansına bakıldığı zamana kadınlarda ilk sırada meme kanseri yer alırken akciğer kanseri 4. sıradadır. Erkeklerde ise akciğer kanseri 1. sırada yer almaktadır. Mortalite yönünden değerlendirildiğinde ise hem kadın hem erkek cinsiyetlerinde akciğer kanseri 1. sıradadır (Torre et al., 2015). Globocan 2018 verileri incelendiği zaman ülkeler arası insidansa bakıldığında Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Çin, Avustralya ve Yeni Zelanda akciğer kanseri açısından en yüksek insidansa sahip ülkeler gözükmektedir (Release, 2018).

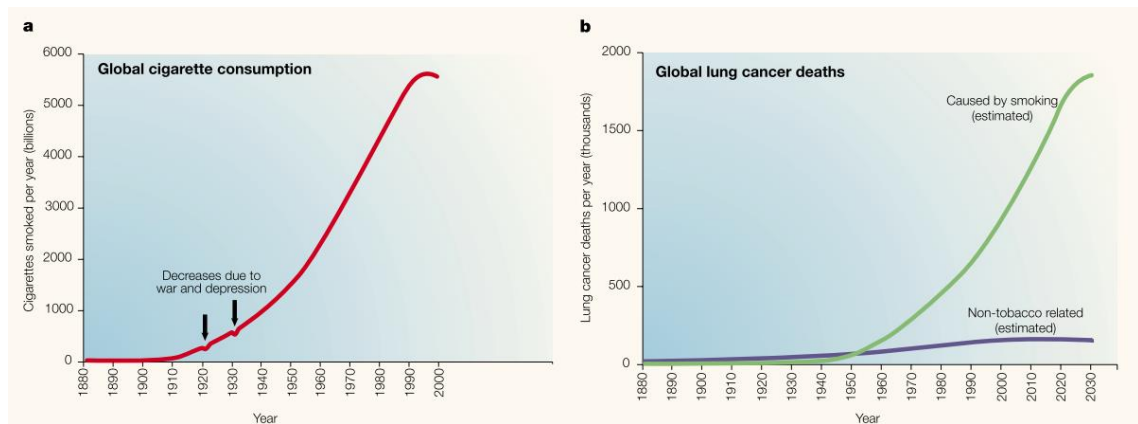
Geçen birkaç on yılın ardından akciğer adenokarsinomları, skuamöz hücreli karsinomlarla karşılaştırıldığında hem erkek hem de özellikle kadın cinsiyetlerde belirgin bir yükselişe geçmiştir (Stellmann et al., 1998). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2004 verileri incelendiğinde akciğer adenokarsinomlarının dünyanın bütün ülkelerinde teşhis edilen en yaygın histolojik kanser tipi olduğu gösterilmiştir (Beasley et al., 2005). Akciğer

kanserlerinin bu denli dünyanın en büyük sağlık sorunlarından biri haline gelmesinde en çok katkısı modern filtreli sigara tüketiminin artması göstermektedir (Stellmann et al., 1998).

Türkiye’de Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan 2015 kanser istatistikleri incelendiği zaman akciğer kanseri erkeklerde 1. sırada yer alırken kadınlarda 5. sırada yer almaktadır. Erkeklerde her 100.000 erkekten 52.5’i, kadınlarda ise her 100.000 kadından 9’u akciğer kanserine yakalanmaktadır. Türkiye de akciğer kanseri teşhisi alan hastaların yarısından fazlası ileri evrede teşhis edilmektedir (Sağlık Bakanlığı, 2015).

2.1.2 Etyolojisi

Amerikan kıtasında yapılan arkeolojik kazılar sonucunda tütün bitkisinin 1.yy’da yetiştirilip, tüketildiği, dini ritüellerde kullanıldığı ve hediye olarak da sunulduğu gösterilmiştir. Geçmişte tüketimi ve üretimi devletler tarafından yasaklanan tütün bitkisi geçen yüzyıllarla birlikte serbest hale gelmiştir fakat 19. yy’a kadar popüler olmamıştır. 1880 yılından itibaren teknolojinin gelişmesi tütünün işlenmesinin kolaylaşmasıyla birlikte sigara üretimi önemli bir hız kazanmıştır. 1884’te bir yılda 744 milyon sigara üretilmekteydi. 1.Dünya Savaşı ile birlikte sigara tüketimi çok fazla artmış, dünyada yeni trend haline gelmiştir. 18.yy’ın sonlarına doğru tütün ürünü kullanımıyla kanser ilişkilendirilmeye başlanmış, 20.yy’da ise ilişkisi gösterilip akciğer kanseri insidansının arttığı kanıtlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) her yıl içilen 5,6 trilyon sigaranın 2030 yılından itibaren 21.yy’ın sonlarına doğru her yıl 10 milyon ölüme sebebiyet vereceğini tahmin etmektedir (Proctor, 2002).



Şekil 2.1: Global sigara tüketimi ve Akciğer kanseri mortalitesi 1990-2030 (Proctor, 2002)

Sigaraların içeriğinde bilinen en az 60 kanserojen madde bulunmaktadır. Sigaraların buhar fazı ve partikül fazlarının gramında 10^{15} ile 10^{17} serbest radikal bulundurmaktadır. Sigaranın kanserlerin birincil etyolojik etmeni olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Kansere haricinde bir çok hastalığa da sebebiyet vermektedir (Costa & Soares, 2009).

Sebze ve meyvelerce zengin diyetin, özellikle turpgiller ailesinden sebzelerden beslenmenin akciğer kanserlerine karşı koruyucu özelliği olduğu anlaşılmıştır. Turpgiller (Brokoli, lahanası, karnabahar, brüksel lahanası vb.) içerisinde bulunan izotiyosiyanat'ın prokarsinogenleri inhibe ettiği bu yüzden kanserde koruyucu etkisinin bulunduğu düşünülmektedir (Lam et al., 2009). Yüksek oranda kırmızı et tüketiminin akciğer kanseri riskini arttırdığı ortaya konmuştur (Malhotra et al., 2016).

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) ve akciğer kanseri ortak risk faktörü olarak sigarayı paylaşmaktadırlar. KOAH hastalarının sigara içme alışkanlığından bağımsız olarak akciğer kanseri risklerinin olduğu gösterilmiştir. KOAH hastalarında akciğer kanseri geliştirme risklerinin daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. KOAH'a benzer şekilde, tüberküloz hastalarının akciğer kanserine yakalanma ihtimallerinin yüksek olduğu ve risk altında oldukları yapılan çalışmalarla birlikte ortaya konmuştur (Ahmad, 2016).

Mesleki maruziyet, akciğer kanserinde rol alan bir diğer önemli etyolojik faktördür. En çok asbest, silika, radon, ağır metal ve polisiklik hidrokarbonların mesleki maruziyet ile akciğer kanserine sebebiyet verdiği gösterilmiştir. Endüstrinin ve sanayinin gelişmiş olduğu ülkelerde hava kirliliği ve mesleki maruziyetlerle birlikte akciğer kanseri vakalarında belirgin yüksekliklerin olduğu anlaşılmıştır (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012), (Malhotra et al., 2016).

2.1.3 Histolojik Sınıflandırılması

Akciğer kanserinin sınıflandırılması, hastaların tedavisinde hayati öneme sahiptir. Akciğer kanserinin moleküler mekanizmalarının açıklanmaya başlamasıyla bu hastalığa sahip bireylerin kanserlerinin histolojik sınıflandırılmasıyla hedefe yönelik tedavilerin uygulanması kolaylaşmıştır. Akciğer kanseri genel olarak akciğer kanserlerinin %20'sinin

oluşturan Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve %80'nini oluşturan Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki gruba ayrılmıştır (Zheng, 2016).

Gelişen teknolojiyle beraber Akciğer kanserinin teşhis ve tedavisinde önemli bir ilerleme kaydedilmiş ve kişiye özel tedavi konsepti oluşmuştur. Kişiyeye özel tedaviler, hasta bireyin kanserinin histolojik sınıflandırılması ve genetik mutasyonlarının saptanması, terapötik stratejiyle hedefe yönelik tedaviyi uygulamak için avantaj sağlamıştır. 2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılmasında değişiklikler yapmıştır (Travis et al., 2015).

Tablo 2.1: Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılı Akciğer kanserinin histopatolojik sınıflandırması (Travis et al., 2015).

A. Epitelyal Tümörler	
<p>1. Adenokarsinom</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lepidik Adenokarsinom • Asiner Adenokarsinom • Papiller Adenokarsinom • Mikropapiller Adenokarsinom • Solid Adenokarsinom • İnvaziv müsinöz Adenokarsinom • Kolloid Adenokarsinom • Enterik Adenokarsinom • Fetal Adenokarsinom • Minimal invaziv Adenokarsinom • Preinvaziv Adenokarsinom <p>2. Skuamöz hücreli karsinom</p> <ul style="list-style-type: none"> • Keratinize skuamöz hücreli karsinom • Non-Keratinize skuamöz hücreli karsinom • Bazaloid skuamöz hücreli karsinom • Preinvaziv lezyon <p>3. Nöroendokrin tümörler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Küçük hücreli karsinom • Büyük hücreli nöroendokrin karsinom • Karsinoid tümör • Preinvaziv lezyon <p>4. Büyük hücreli karsinom</p> <p>5. Adenoskuamöz karsinom</p>	<p>6. Sarkomatoid karsinom</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pleomorfik karsinom • İğsi hücreli karsinom • Dev hücreli • Karsinosarkom • Pulmoner blastom <p>7. Salgı bezi tipi tümörler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mukoepidermoid karsinom • Adenoid kistik karsinom • Epitelyal-Myoepitelyal karsinom • Pleomorfik adenom <p>8. Papillomlar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Skuamöz hücreli papillom • Glandüler papillom • Miks skuamöz hücreli ve glandüler papillom <p>9. Adenomlar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sklerozan pnomositom • Alveolar adenom • Papiller adenom • Müsinöz kistadenom • Müköz bez adenomu <p>10. NUT karsinom</p> <p>11. Lenfoepitelyoma benzeri karsinom</p>
B. Mezenkimal Tümörler	
<p>1. Pulmoner hamartom</p>	<p>7. Epitolooid hemanjiyoendoteliyema</p>

<p>2. Kondrom</p> <p>3. PEComatöz tümörler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lenfanjiyoleimyomatozis • Bening PEComa • Malign PEComa <p>4. Konjenital peribronşiyal myofibroblastik tümör</p> <p>5. Diffüz pulmoner lenfanjiyomatozis</p> <p>6. İnflamatuvar myofibroblastik tümör</p>	<p>8. Plöropulmoner blastoma</p> <p>9. Sinavyal sarkoma</p> <p>10. Pulmoner arteriyal intimal sarkom</p> <p>11. EWSR1-CREB1 translokasyonlu pulmoner mist sarkom</p> <p>12. Myoepitelyal tümörler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Myoepitelyoma • Myoepitelyal karsinom
C. Lenfositik Tümörler	
<p>1. MALT Tipi Ekstranodal Marjinal Zon B Hücreli Lenfoma</p> <p>2. Diffüz büyük B hücreli Lenfoma</p> <p>3. Lenfomatoid granülomatozis</p>	<p>4. İntravasküler büyük B hücreli lenfoma</p> <p>5. Pulmoner Langerhans hücreli histiositoz</p> <p>6. Erdheim-Chester hastalığı</p>
D. Ektopik Kökenli Tümörler	
<p>1. Germ hücreli tümörler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Matür teratom • İnmatür teratom 	<p>2. İntrapulmoner timoma</p> <p>3. Melanoma</p> <p>4. Meningioma</p>
E. Metastatik Tümörler	

2.1.4 Evrelendirilmesi

Akciğer kanseri bireylerde hastalığın histopatolojik sınıflandırılması kadar evrelendirilmesi de büyük önem arz etmektedir. Evrelendirme kişiye özel tedavi stratejisinde önemli bir yere sahiptir. Hastalığın evrelendirilme aşamasında Tümör-Nodül-Metastaz (TNM) evrelendirme sistemi kullanılmaktadır bu sistemle hem evrensel bir yaklaşım sergilenmekte hem standartı da yüksek bir veri elde edilmektedir. Akciğer kanserinin evrelendirilmesinde, Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneği'nin (IASLC) 8. yayın TNM evrelendirme sistemi kullanılmaktadır. Bu TNM evrelendirme sisteminde primer tümör özelliklerini (T), lenf nodu tutulumunu (N) ve uzak mesafe metastazlarını (M) ifade etmektedir. Şuan en güncel olarak Tablo 2.2 verilen TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır (Reckamp, 2016), (Rami-Porta et al., 2018), (Goldstraw et al., 2016).

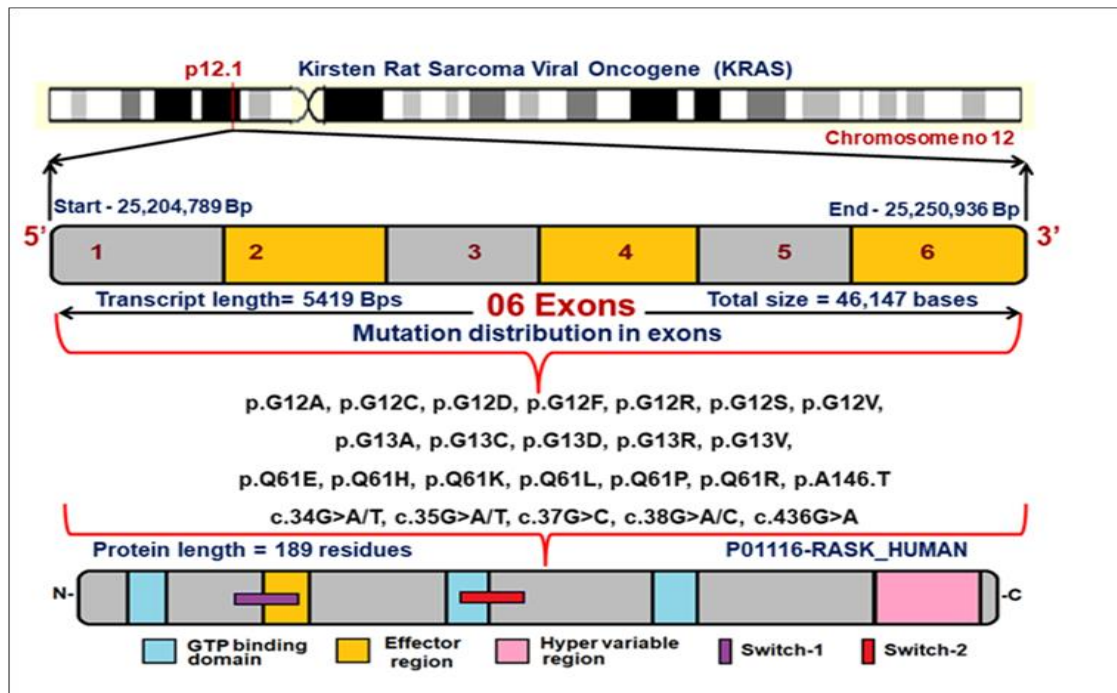
Tablo 2.2: Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Derneği 8. Yayın TNM Evrelendirme Sistemi (Goldstraw et al., 2016).

Evre		T	N	M
Gizli Karsinom		Tx	N0	M0
Evre 0		Tis	N0	M0
Evre I	IA1	T1mi	N0	M0
		T1a	N0	M0
	IA2	T1b	N0	M0
	IA3	T1c	N0	M0
	IB	T2a	N0	M0
Evre II	IIA	T2b	N0	M0
	IIB	T1a	N1	M0
		T1b	N1	M0
		T1c	N1	M0
		T2a	N1	M0
		T2b	N1	M0
T3	N0	M0		
Evre III	IIIA	T1a	N2	M0
		T1b	N2	M0
		T1c	N2	M0
		T2a	N2	M0
		T2b	N2	M0
		T3	N1	M0
		T4	N0	M0
		T4	N1	M0
	IIIB	T1a	N3	M0
		T1b	N3	M0
		T1c	N3	M0
		T2a	N3	M0
		T2b	N3	M0
		T3	N2	M0
		T4	N2	M0
		T4	N2	M0
IIIC	T3	N3	M0	
	T4	N3	M0	
Evre IV	IVA	Herhangi T Skoru	Herhangi N skoru	M1a
		Herhangi T Skoru	Herhangi N skoru	M1b
	IVB	Herhangi T Skoru	Herhangi N skoru	M1c

2.2 Kristen Rat Sarkoma (KRAS)

2.2.1 KRAS Yapısı

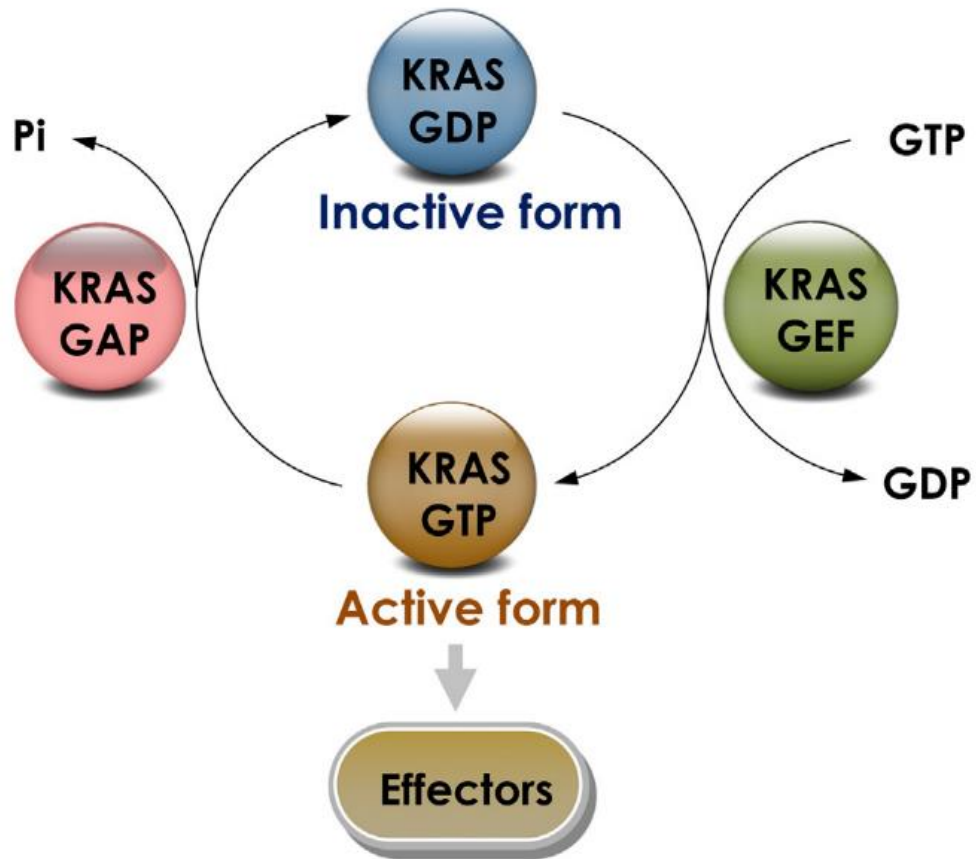
RAS gen ailesinin bir üyesi olan KRAS geni, Kristen Rat Sarkoma (Ki- veya KRas) viral onkogen homologudur ve küçük bir GTPaz proteini olan Kras proteinini kodlar (P. Liu et al., 2019). KRAS geni 12. kromozomun p12.1 kolunda bulunmaktadır ve 6 ekzondan oluşmaktadır 189 aminoasit tarafından kodlanmaktadır (krishnan, 2018). Kras proteini yaklaşık 21 kDa ağırlığındadır ve hücre zarının sitoplazmik bölgesinde lokalize olmuştur (Pylayeva-Gupta et al., 2011). Kras proteini 4 bölgeden oluşmaktadır, N-Terminal bölgesi Ras protein formları arasında benzerlik göstermektedir, 2. bölge ise sekans olarak daha az benzerlik göstermektedir, her iki bölge Kras proteinin sinyal fonksiyonu için yüksek öneme sahiptir ve birlikte G bölgesini oluşturmaktadır. G bölgesi aşağı yolak etkileşimleri ve GTPaz aktive edici proteinler (GAP) etkileşimleri için gerekli olan GTP (Guanozin trifosfat) bağlayıcı alan içerir. Kras proteini post-translasyonel değişikliklerle belirlenen ve plazma membranına bağlanmayı belirleyen hiperdeğişken C-Terminal bölgesi de içerir. Bu bölge, Ras proteinin biyolojik aktivitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (P. Liu et al., 2019).



Şekil 2.2: Kras geni ekzon yapısı, mutasyonları ve protein bölgeleri (krishnan, 2018)

2.2.2 KRas Aktivasyonu

Kras proteinin aktif ve inaktif olmak üzere iki farklı durumu söz konusudur. Kras proteinin Kras-GTP formunda iken aktif, Kras-GDP formunda iken inaktif durumdadır. Kras proteinin aktif ve inaktif forma geçişlerinden iki farklı protein tarafından kontrol edilir. Aktif Kras proteinin guanin-nükleotit değiştirme faktörü (GEF) tarafından, inaktif Kras proteinin ise GTPaz etkinleştirme proteinin (GAP) tarafından kontrol edilir (şekil 2.3)(Ferrer et al., 2018b).



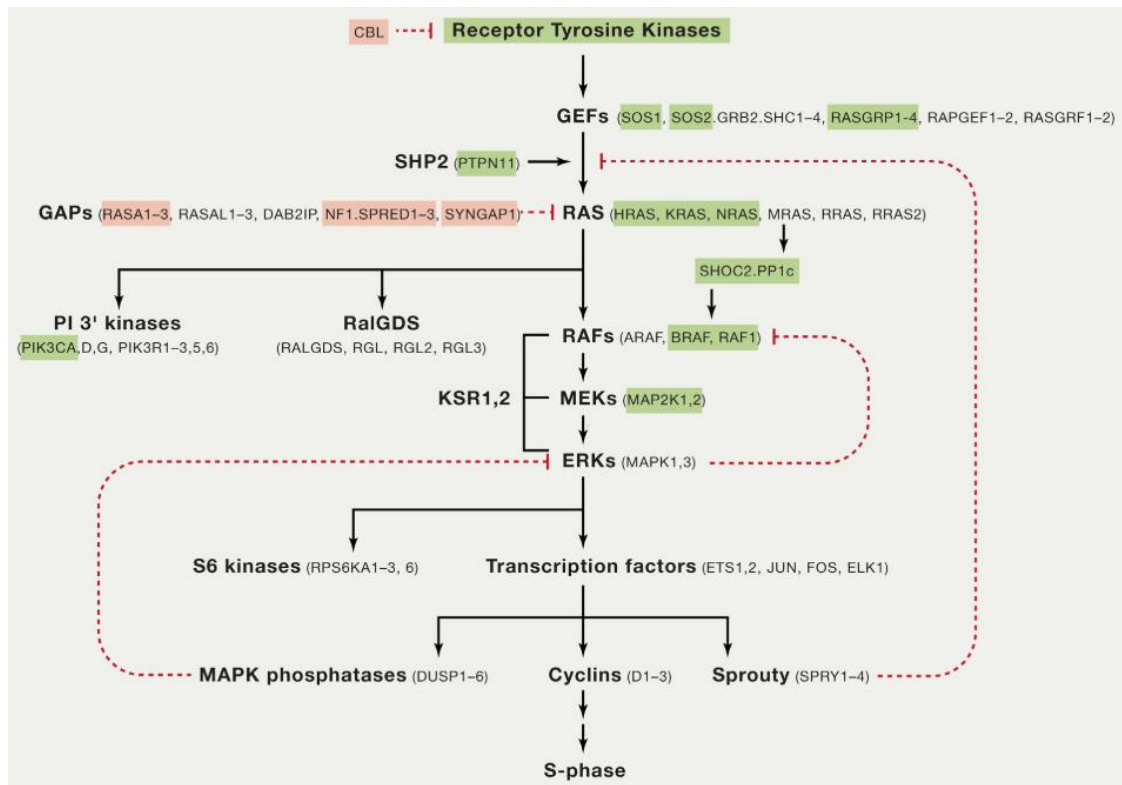
şekil 2.3: Kras proteinin GTPaz dōngüsü (P. Liu et al., 2019)

Reseptör tirozin kinaz (RTK) aktivasyonundan sonra adaptör protein büyüme faktör reseptör bağlanma protein 2 (GRB2) aktifleşir, Son of Sevenless (SOS) proteini de bağlanarak aktif hale gelir. Aktif SOS proteini inaktif halde bulunan Kras-GDP

proteinini aktif Kras-GTP haline gelmesini sağlar böylelikle aktif Kras proteini alt yollarla etkileşim haline gelir (Wood et al., 2016).

2.2.3. Kras Yolakları

Aktif Kras proteini hücre döngüsü, proliferasyon, gen ekspresyonu, hücre sağkalımı, hücre göçü, hücre iskelet proteinlerinin sentezi, kalsiyum mobilizasyonu gibi hücre için hayati fonksiyonlara sahip birçok hücresel proseste görev almaktadır (Şekil 2.4). Reseptör tirozin kinaz/ GRB2/ SOS sinyallenmesi oluşup Kras proteinin aktif forma dönüştükten sonra en önemli yolağı olan RAS/ RAF/ MAPK sinyal kaskatını aktifleştirir (Roberts & Der, 2007). Aktif Kras proteini altyolak efektör proteinlerinden RAF'ı (Ras ilişkili faktör) kinaz aktivitesini sağlar. RAF aktivasyonundan sonra MEK'i (Mitojen aktive edici protein kinaz) fosforilasyon yaparak aktif forma getirir takiben MEK birçok hücresel proseste hayati öneme sahip olan protein ERK (Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz) fosforilasyon yoluyla aktive eder. Böylelikle MAPK (Mitojenle etkileşen protein kinaz) sinyal olağı aktif hale gelmiş olur (Yaeger & Corcoran, 2019).



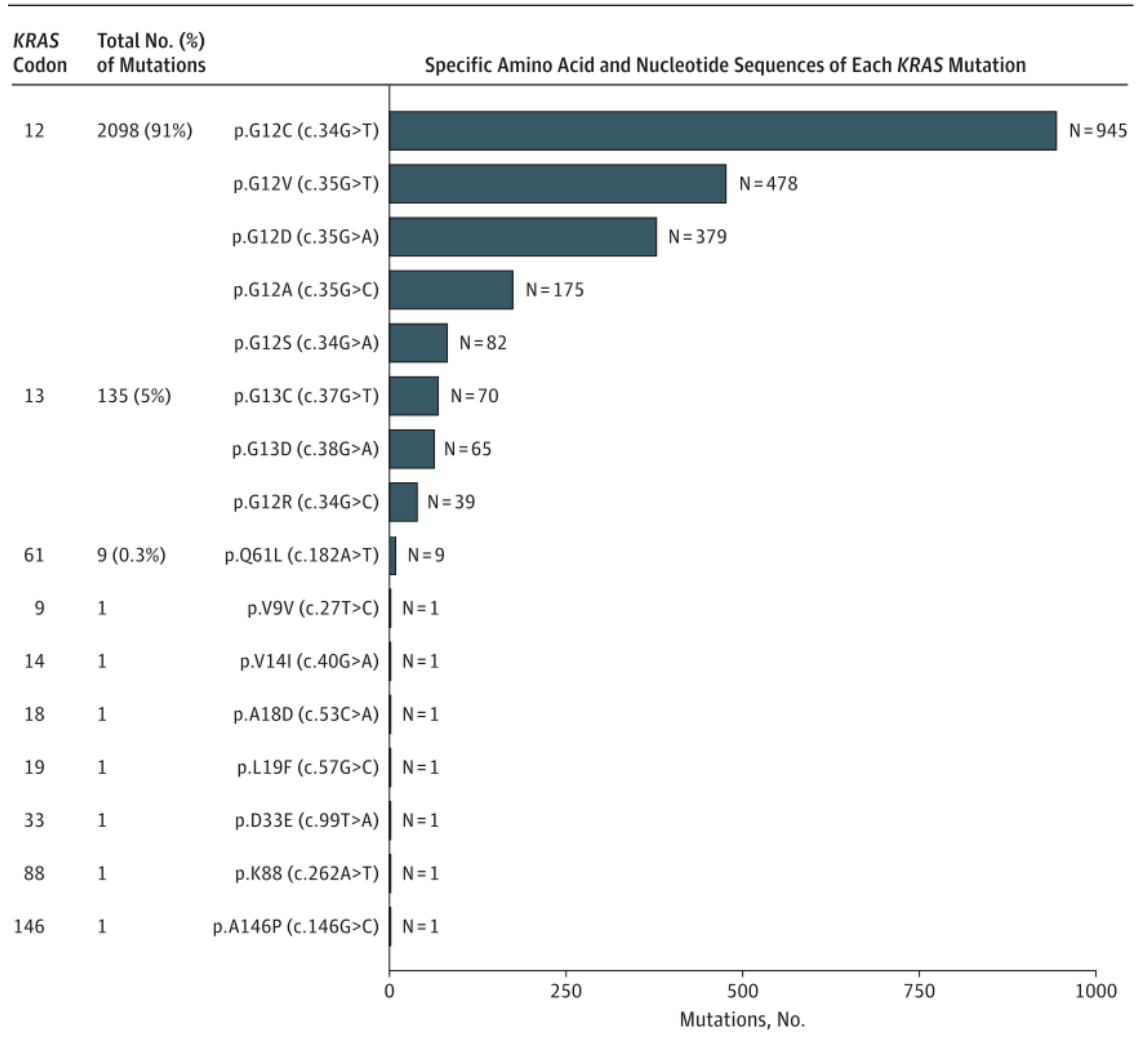
Şekil 2.4: RAS sinyal yolları (Simanshu et al., 2017)

RAS/ RAF/ MAPK yolağından sonra aktif Kras proteinini en iyi ikinci karakterize olduğu ikinci yolak Fosfoinositid-3 Kinaz (PI3K)/ AKT yolağıdır. Ras aracılı PI3K/AKT yolağı hücre sağ kalımı ve proliferasyonunda önemli rol oynar. Ras aracılı aktifleşen PI3K, fosfotidilinositol-4,5-bisfosfat'ın (PIP₂) fosforilasyonunu sağlayarak fosfotidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP₃) oluşmasını sağlar. PIP₃ plekstrin homolog (PH) domainine sahip AKT/PKB proteinlerin kinaz aktivitelerini stimüle eder. Böylelikle hücre büyümesi, hücre döngüsüne girme, sağ kalım gibi hücrel mekanizmaların aktifleşmesi sağlanmış olur (Castellano & Downward, 2011)(Fruman et al., 2017).

2.2.4. KRAS Mutasyonları

Ras genleri (HRAS, NRAS, KRAS) tüm kanserlerde sıklıkla mutasyona uğradığı gözlenen genlerdendir, aralarında KRAS geni en yaygın mutasyona uğrayan onkogendir (Ryan & Corcoran, 2018). RAS genleri mutasyonları tüm kanserlerin %27'sinde gözlemlenmiştir (Forbes et al., 2016) (*COSMIC Release v84*, n.d.). Bu mutasyonlarda en sık gözlenen 3 tane mutasyon tespit edilmiştir; G12 (%83 KRAS mutasyonu), G13 (%14 KRAS mutasyonu), Q61 (%63 NRAS mutasyonu). RAS genleri arasında %4 oranıyla en az mutasyona uğrayan gen HRAS'ı %11 ile NRAS takip etmektedir, en sık mutasyona uğrayan ise %85 oranı ile KRAS genidir (Hobbs et al., 2016).

KRAS geni mutasyonlarının mortalitesi yüksek olan kanserlerde (KHDAK, kolorektal kanserler, pankreatik kanserler) sık rastlanması bu geni terapötik hedef haline getirmiştir. Sigara tüketen bireylerde KRAS geninde mutasyonun daha sık gözlemlendiği bildirilmiştir. KHDAK'lerinde KRAS genini 2. ekzonunda G12C mutasyonu en sık gözlenen mutasyondur (Şekil 2.5) (Yang et al., 2019).



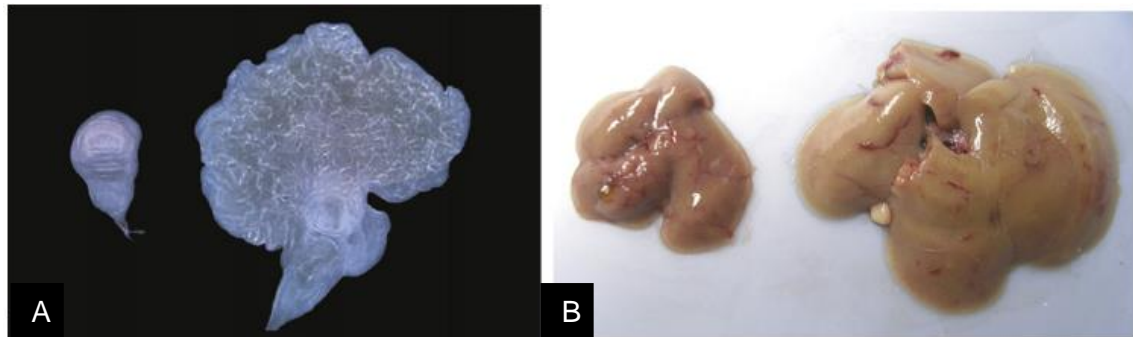
Şekil 2.5: 2034 KHDAK hastasında KRAS mutasyonları (Sanger Database) (Wood et al., 2016)

2.3. Hippo Yolağı

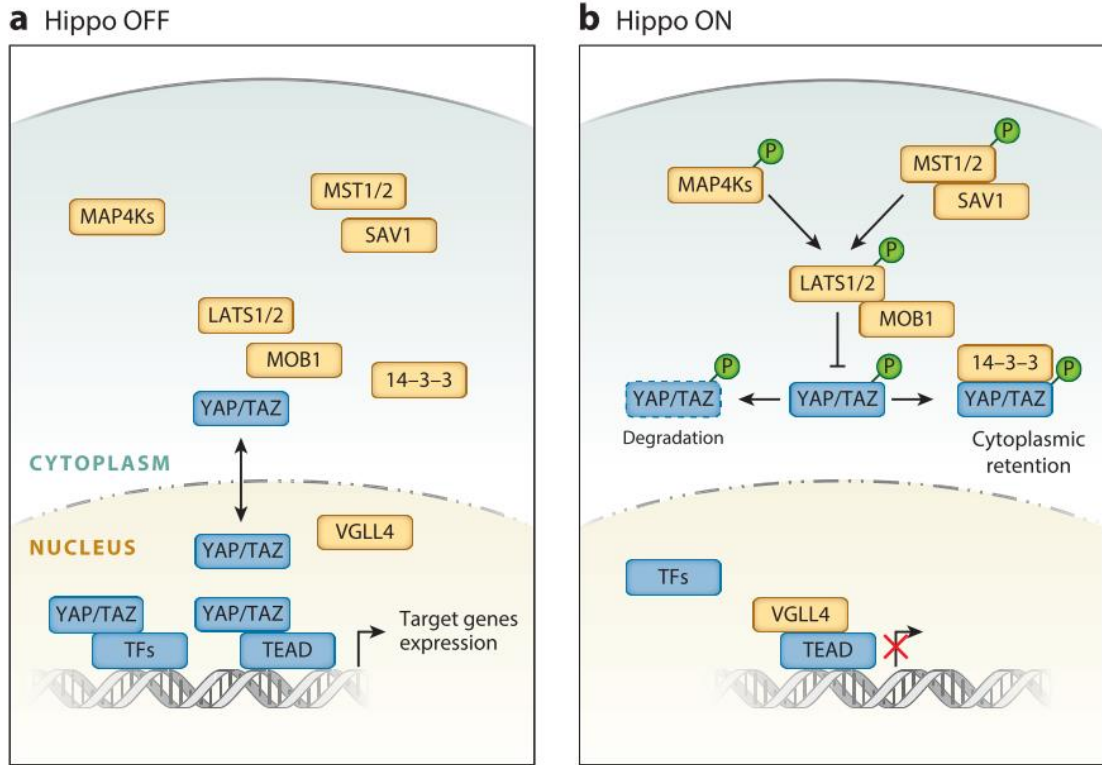
Çok hücreli organizmalarda organ büyüklüğünün kontrolü evrimsel açıdan bakıldığında bir kilometre taşıdır. Bilim adamlarının yoğun ilgi ve çalışmalarına rağmen gelişim sürecinde organ büyüklüğünün nasıl belirlendiği ve yetişkinlik sürecinde nasıl sürdürüldüğü hala gizemini sürdürmektedir. Organ büyüklüğü kontrolünde Hippo yolağının keşfi bu gizeme ışık tutmak için umut olmuştur. Hippo yolağı üzerine yapılan çalışmalar ile bu yolağın organ büyüklüğünde rolünün anlaşılması, hücre kaderinin belirlenmesi, doku mimarisi de dahil birçok temel biyolojik süreci düzenlemede kritik rol oynadığını göstermiştir (Ma et al., 2019).

Hippo yolağı ilk olarak *Drosophila melanogaster*'da klonal aşırı büyüme fenotiplerine neden olan gen mutasyonlarının tanımlamak için tasarlanmış genetik mozaik ekranlar aracılığıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu keşifle birlikte NDR ailesi protein kinaz Warts (Wts), WW domaini içeren Salvador (Sav) proteini, Ste20 benzeri protein kinaz Hippo (Hpo) ve adaptör proteini Mob tümör suppressor (Mats) dahil olmak üzere hippo yolağı çekirdek komponentleri tanımlanmış oldu. Bu proteinler anormal büyüklükte organ fenotipleri gösteren ve fenotipe bakıldığında suaygırını andıran mutantlardan dolayı hippo yolağı adını aldılar. Bu proteinler tümör baskılayıcı özellik göstermektedir, Hpo-Sav kompleksi fosforilasyonu ile Wts-Mats kompleksi fosforilasyonu ile sinyal kinaz kaskatı oluşmuş olur. Hippo kinaz kaskatının aşağı yolak proteinleri araştırıldığında, Yorkie (Yki) transkripsiyonel bir koaktivatör proteinin hücre proliferasyon ve sağkalımda Wts ile ilişkili olduğu gösterildi. Yki, Wts ile karşılaştırıldığında karşıt işlev göstermektedir, Hippo yolağı inaktifken ifade gösterip işlev gösterirken, Hippo yolağının aktif olduğu durumlarda Yki inaktif durumdadır, böylelikle aşırı doku büyümesi engellenmiş olur(Şekil 3.1) . Yki Hippo kinaz kaskatı ile inaktif olmuş olur (Pan, 2010).

Hippo yolağının *Drosophila*'dan memelilere yüksek oranda korunduğu anlaşılmıştır. MST1/2 proteini Hpo ile ortolog olup SAV1 (Sav ortolog) ile heterodimer oluşturur. Bu etkileşimle birlikte MST1/2- SAV1, LATS1/2 (Wts ortolog) ve adaptör proteinin MOB1 (Mats ortolog) fosforillenmesi sağlanmış olur. LATS1/2- MOB1 kompleksi, Yki ortolog YAP (Yes-associated protein) ve TAZ (WW-domain içeren transkripsiyon regülatör protein 1) fosforile edilir böylelikle YAP/TAZ nükleer lokalizasyonu inhibe edilmiş olur. Fosforile YAP/TAZ, 14-3-3'e bağlanır ve sitoplazmada kalmış olur. Fosforile YAP/TAZ, β -TrCP aracılı ubiquitinasyon ve proteozomal degradasyona uğrar (Şekil 3.1) (C. Y. Liu et al., 2010).



Şekil 2.6 : A: *Drosophilla* normal Yki ekspresyonu(sol), anormal Yki ekspresyonu (sağ), B: Memelilerde normal YAP/TAZ ekspresyonu(sol), anormal YAP/TAZ ekspresyonu(sağ) (Pan, 2010).

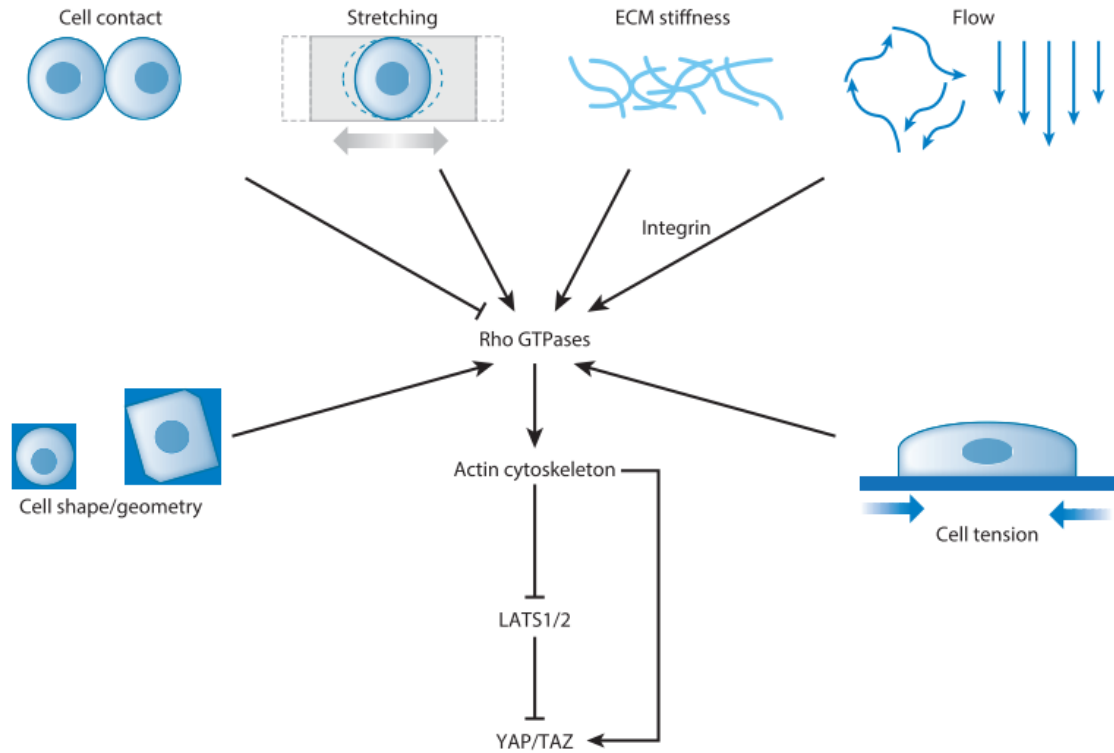


Şekil 2.7: Memelilerde Hippo yolağı (Ma et al., 2019).

2.3.1. Hippo Yolağının Düzenlenmesi

2.3.1.1. Mekanik Sinyaller

Çok hücreli organizmalarda hücrelerin organ ve doku gelişimleri, homeostazi kontrolleri sıkı şekilde organize edilmektedir. Hücre-Hücre etkileşimleri, Hücre-ECM (Ekstrasellüler matriks) etkileşimi ve buldukları mikro ortam kaynaklı mekanik kuvvetlerin genlerin transkripsiyonunu düzenlediği ve böylece hücre büyümesi, proliferasyon, morfogenez, migrasyon, ve apoptozis gibi hücreler için hayati fonksiyonları düzenleyip koordine ettiği anlaşılmıştır (Bissell & Barcellos-Hoff, 1987). Model sistemlerde yapılan çalışmalarla birlikte YAP/TAZ'ın mekanik sinyallerle transkripsiyonel efektör protein olduğu anlaşılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 2.8 : Mekanik sinyallenmede YAP/TAZ ve Hippo yoluğu (Ma et al., 2019)

Monolayer hücre kültürlerinde kontakt inhibisyon hücre proliferasyonunu durdurucu olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte hücre yoğunluğunun yüksek olduğu durumlarda LATS1/2 aktivitesinin arttığı ve YAP/TAZ'ın fosforilasyonu ile sitoplazmik lokalizasyonu ilk keşfedilen durumlardandır (Zhao et al., 2007). Hücre yoğunluğunun artmasıyla LATS1/2'nin nasıl aktive olduğu hala tam olarak anlaşılmamıştır. Potansiyel olarak hücreler arası tight junction (TJ)'da anjiyomotin (AMOT) kompleksinin, Hippo yoluğunun düzenlenmesine aracılık ettiği düşünülmektedir. AMOT, YAP'ı inhibisyonu için fosforilasyon durumuna bakmaksızın direkt olarak bağlar ve nükleer lokalizasyonunu engellemiş olur. AMOT, NF2 ile etkileşimi ile LATS1/2 aktivasyonunu uyarır, aktif LATS1/2, YAP fosforilasyonu ile YAP'ı inaktif hale getirir (Li et al., 2015). Bir diğer potansiyel mekanizma ise adherens junction (AJ)'larda E-Cadherin transdimerizasyonu ile α / β -Catenin, Kibra ve Merlin (Mer) yoluyla MST1/2 LATS1/2 sinyal kaskadının stimüle edildiği düşünülmektedir (Kim et al., 2011).

Doku bütünlüğü ve fonksiyonu sadece Hücre-Hücre etkileşimleriyle değil ayrıca Hücre-ECM etkileşimine de bağlıdır. Bu etkileşim hücrelerin büyümeleri ve sağkalımları için hücrelere yapısal destek sağlar. ECM'in katılığı, hücrelerin bağlanma, yayılma, göç

etme, farklılaşma gibi özelliklerini belirleyen birincil faktörlerdendir. Kanser gibi hastalıklarda YAP/TAZ proteinlerinin düzensiz olduğu gözlemlenmiştir. Karaciğer ve Pankreas kanserlerinde Hücre-ECM etkileşimlerinde farklılar tespit edilmiş ve bu hastalıkta YAP/TAZ tarafından tetiklenen hastalığın progresyon gösterdiği bildirilmiştir (Calvo et al., 2013).

YAP/TAZ hücrede proliferasyon ve sağ kalımın yanı sıra kök hücre fenotipi (stemness) için mekanik sinyallenmede önemli bir rol almaktadır. Genel olarak YAP/TAZ hücrede yüksek oranda katılık (stiffness) ve gerilim sonucu aktive olduğunda hücrelerin daha katı bir hücre tipine farklılaşmasına teşvik etmektedir; mezenkimal kök hücrelerin YAP/TAZ aktivasyonuna bağlı olarak osteoblastlara farklılaşması (Dupont et al., 2011).

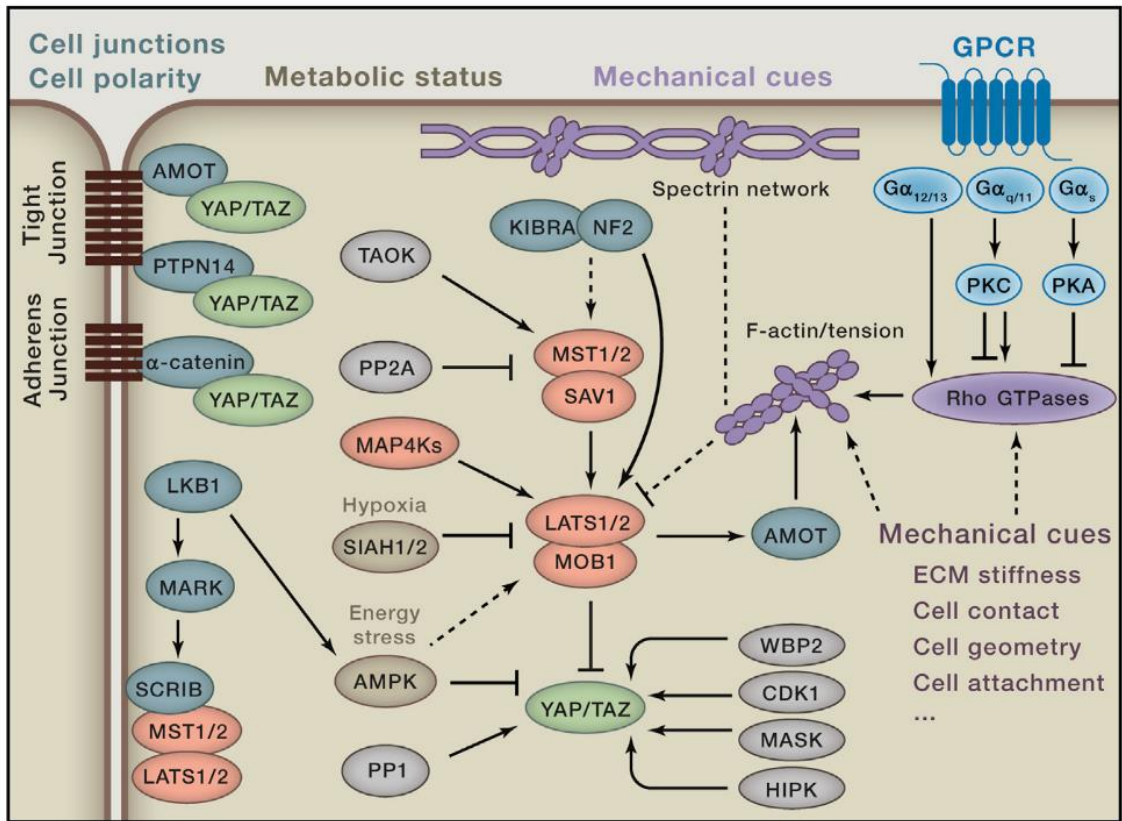
Transkripsiyonel koaktivatör olan YAP/TAZ, özellikle ECM'in şekillenmesi ve hücre iskeletinin yeniden yapılandırılmasında yer alan genlerle etkileşimleri ve bu genleri aktive ederek, mekanik uyarıların hücreye uyarılara dönüşmesinde yani mekanotransdüksiyonda önemli rol oynamaktadır. Farklı mekanik uyarılarla YAP/TAZ'ın hücre içinde sitoplazmik ve nükleer lokalizasyonu mekanotransdüksiyonda ki rolü gözlemlenmektedir (Dupont et al., 2011)(Ma et al., 2019).

2.3.1.2. Hücre polaritesi ve Hücre adezyonu

Hippo yolağı regülatörlerini araştırırken hücre polaritesi ve adezyonunda rol alan ve Hippo yolağıyla ilişkili birçok proteine rastlanmış ve tanımlanmıştır. Epitel hücreler genellikle AJ, TJ ve desmozom gibi Hücre-Hücre etkileşimleriyle farklı polarite kompleksleri oluşturur ve bunlarla plazma membranını apikal ve bazolateral bir alana böler böylece hücre apikal-bazal bir polarite oluşturmuş olur (Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012).

Merlin ve Ex proteinleri tümör baskılayıcı özelliğe sahiptirler ve hücre farklılaşması, proliferasyonunda birlikte fonksiyon gösterirler (McCartney et al., 2000). *Drosophila*'da, Mer ve Ex'in inaktivasyonu Hpo mutantlarına benzer şekilde aşırı büyüme fenotipleri gösterdiği anlaşılmıştır (Hamaratoglu et al., 2006). Daha sonra yapılan çalışmalarla birlikte, Kibra, Mer ve Ex proteinlerinin etkileşimde olduğu Wts ile birlikte çalıştığı tespit edildi. Mer, Ex, Kibra, polarize epitel hücrelerin apikal bölgelerinde lokalize olmaktadır. Mer/Ex/Kibra kompleksinin Hippo sinyal yolağı kaskatını başlatmak için apikal plazma membranına çağırıldığı düşünülmektedir (J. Yu et al., 2010).

Hippo yolağının düzenlenmesinde birçok molekül görev almaktadır (Tablo 2.3). Hücre adezyonu, hücre polaritesi ve hücre-hücre etkileşiminde rol alan AMOT, PTPN14 ve α -catenin MST1/2 ve LATS1/2 ile etkileşim gösterir. Rho GTPaz'lar hücre iskeletinin yeniden şekillenmesiyle birlikte ve hücre gerginliğinin değişmesiyle YAP/TAZ'ı regüle eder böylelikle Hippo yolağıyla ilişkilidir. Hücrelerin geometrisi, hücre-hücre bağlantıları ve etkileşimleri, apikal ve bazolateral spektrin ağlar mekanik uyarılarla hippo yolağını regüle eder. Çözünebilir faktörler olarak kabul edilen GPCR'ler Rho GTPaz ve aktin dinamikleri yoluyla LATS1/2'yi düzenler. Hücresel enerji ve oksidatif stres gibi metabolik durumlarda rol alan proteinler; protein fosfat 2A (PP2A), protein fosfat 1 (PP1), WBP2, CDK1, MASK ve HIPK gibi farklı proteinler Hippo yolağının düzenlenmesinde rol almaktadırlar (Şekil 3.4) (F. X. Yu & Guan, 2013)(Codelia & Irvine, 2012).



Şekil 2.9: Memelilerde Hippo yolağının düzenlenmesi (F. X. Yu et al., 2015).

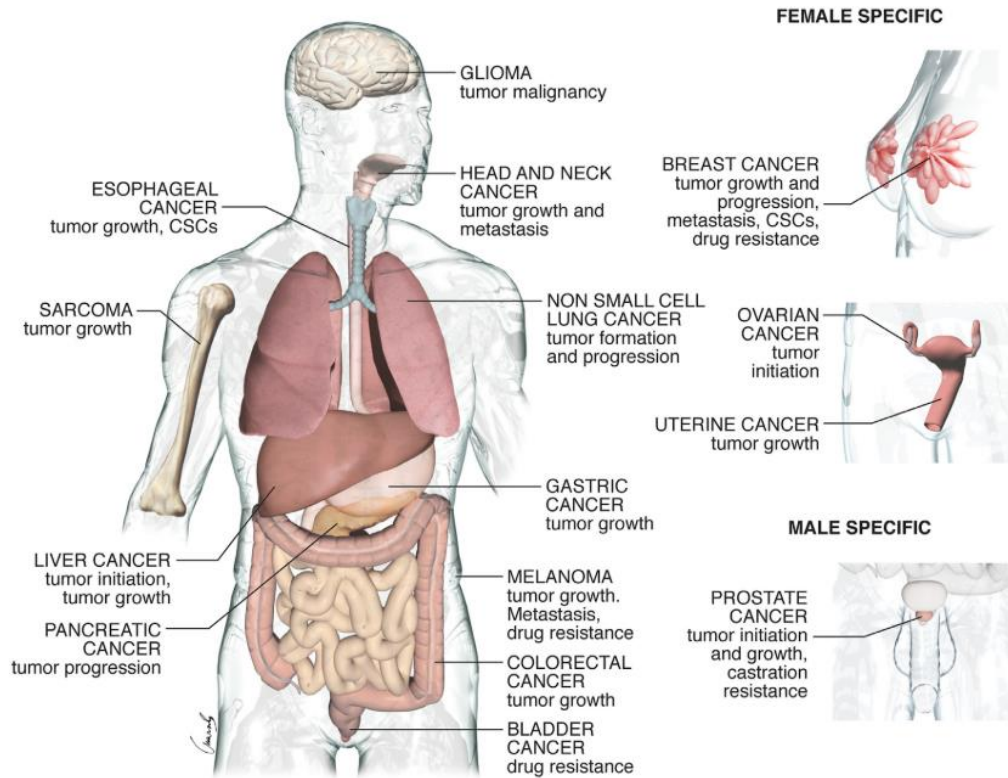
Tablo 2.3: Memeli ve *Drosophila*'da Hippo yolağının regülatörleri

Memeli	<i>Drosophila</i>	Hücre-Hücre Lokalizasyon	Hücre iskeleti interaksyonu
Çekirdek kompetentler			
MST1/2	Hpo (Hippo)	-	✓
Sav1	Sav (Salvador)	-	-
LATS1/2	Wts (Warts)	-	✓
Mob1	Mats	-	-
YAP/TAZ	Yki (Yorkie)	✓	-
TEAD1-4	Sd (Scalloped)	-	-
Apikal-Bazal polarite (TJ ve AJ)			
Crb1-3	Crb (Crumbs)	✓	-
Frmd6(?)	Ex (Expanded)	✓	✓
NF2(Mer)	Mer (Merlin)	✓	✓
Kibra	Kibra	✓	-
aPKC	aPKC	✓	-
PAR3	Baz (Bazooka)	✓	-
PAR6	Par6	✓	-
PALS1	Sdt (Stardust)	✓	-
Scrib	Scrib (Scribble)	-	-
Dlg	Dlg	-	-
Lgl	Lgl (Discs Large)	-	-
AMOT	?	✓	✓
PTPN14	Pez	✓	✓
Ajuba	Jub	✓	✓
α -Catenin	α -Catenin	✓	✓
β -Catenin	β -Catenin	✓	-
ZO-1	ZO-1	✓	-
ZO-2	ZO-2	-	-
E-cad (E-Cadherin)	E-cad	✓	-
Düzlemsel Hücre Polaritesi			
Fat1-4	Fat	✓	-
Dchs1/2	Ds (Dachsaus)	✓	✓
Fjx1	Fj (Four-jointed)	-	-
?	Dachs	-	-
Zyxin	Zyx (Zyxin)	-	✓
Lix1, Lix1L	Lft (Lowfat)	-	-
CD1 δ/ϵ	Dco (Discs overgrowth)	-	-
ZDHHCs	App (Approximated)	-	-
Diğer Kompetentler			
Taok1-3	Tao	-	✓
RASSF1-6	RASSF	-	✓
PP2A (STRIPAK)	STRIPAK	-	✓
PP1	PP1	-	✓
Itch	Su (Dx)	-	-
β TRCP	Slimb	-	-
14-3-3	14-3-3	-	✓

2.3.2. Hippo yolu ve Kanser

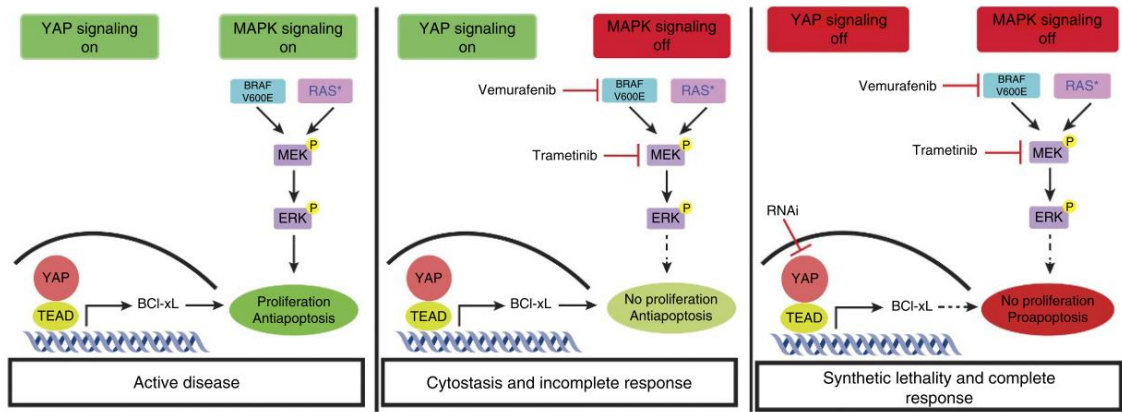
Hippo yolu ve YAP/TAZ birçok kanser tipinde düzensiz ifade olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.5) . 9125 tümör örneğinin sistematik profillenmesinde, akciğer kanseri, glioma, kolorektal kanser gibi bir çok kanser tipinde Hippo yolu bileşenlerinde düzensiz ifadelerin söz konusu olduğu anlaşılmıştır (Sanchez-Vega et al., 2018).

KontROLSÜZ hücre çoğalması neoplazilerin ortak özelliğidir. Hippo yolunda düzensizlik ve YAP/TAZ işlev bozukluğu kanser hücrelerinin çoğalmasını desteklediği yapılan çalışmalarda sunulmuştur (F. X. Yu et al., 2015). YAP/TAZ'ın aşırı ifadesi ve hiperaktivasyonu, in vitro hücre kültürlerinde hücre proliferasyonlarını indüklemektedir. Benzer şekilde xenograf model çalışmalarında YAP aktivasyonun çoklu doku proliferasyonuna neden olmaktadır (Zanconato et al., 2016).



Şekil 2.10: İnsan kanserlerinde YAP/TAZ (Zanconato et al., 2016).

Disregüle Hippo yolağının söz konusu olduğu tümör hücrelerinde intrinsik programlı ölümden kaçış gözlemlenir ayrıca kemoterapik ve moleküler hedefe yönelik tedavilerde ilaç direncinin de olduğu anlaşılmıştır. Kanserlerin nüks etmesinde de rolü olduğu açıklanmıştır (Zanconato et al., 2016). Kanser hücreleri moleküler hedefe yönelik tedavi sırasında orijinal onkojenik mutasyonundan ayrı olarak bir başka onkojenik mutasyona geçebilir ve böylelikle moleküler tedaviye direnç özelliği gösterebilmektedir. Yapılan bir çalışmayla birlikte KRAS mutant pankreas kanserlerinde KRAS'ın inhibe edilmesiyle YAP/TAZ moleküllerinde amplifikasyon olduğu gösterilmiştir (Kapoor et al., 2014). BRAF ve RAS mutant kanserlerde, RAF ve MEK hedefli tedavilerinde YAP hücrede ilaç dirençliliği ve sağ kalım için fonksiyon gösterir (Lin et al., 2015).



Şekil 2.11: BRAF ve RAS mutant kanserlerde YAP'in fonksiyonu (Lin et al., 2015)

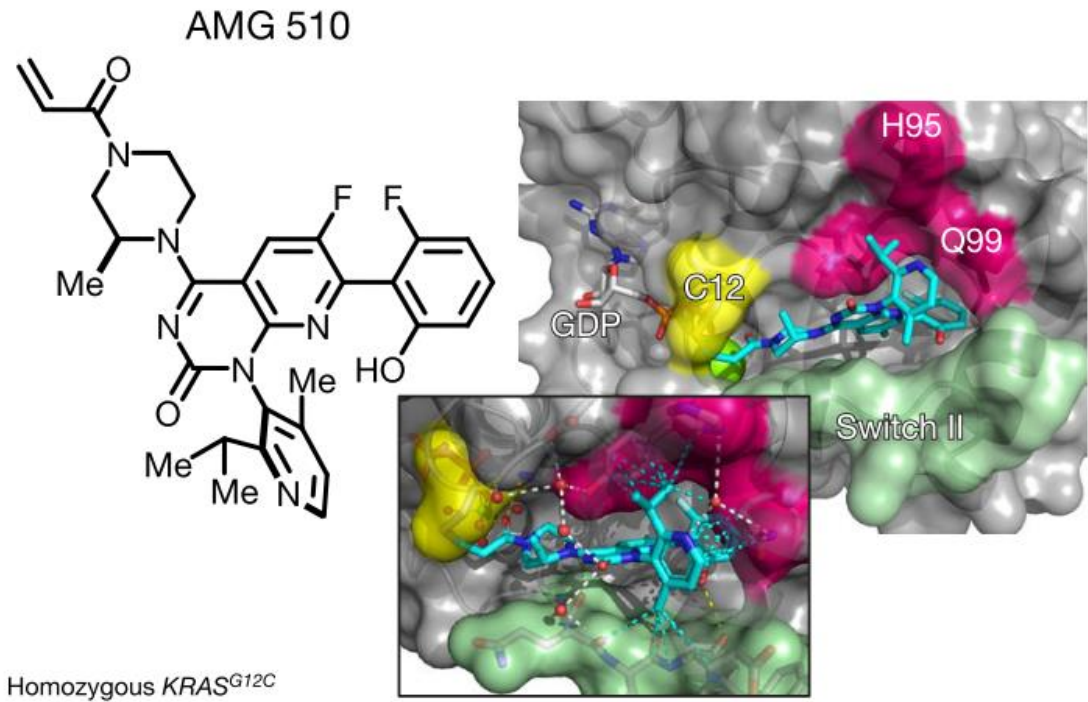
Yapılan immünohistokimyasal (IHC) çalışmalar sonucunda YAP/TAZ'ın yüksek ekspresyon seviyelerinin ve nükleer lokalizasyonunun malign özelliklerle (yüksek histolojik derece, TNM ve lenf nodu metastazı) ve kötü hasta prognozu ile korelasyon gösterdiği anlaşılmıştır (Cheng et al., 2016). KHDAK'lerinde YAP/TAZ için veri setleri incelendiğinde YAP/TAZ aktivitelerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Akciğer adenokarsinom fare modellerinde alveolar hücrelerde KRAS G12D'nin knockin edilmesiyle metastatik olmayan tümörler zayıf şekilde YAP/TAZ boyaması sergilerken, Tp53, Lkb1'in biallelik kaybı ve KRAS'ın indüklenmesiyle metastatik tümörlerde YAP/TAZ yüksek nükleer boyama gösterir. YAP veya TAZ knockdown edilmiş KHDAK hücre hattı A549'da nude fare modellerinin kuyruk venlerine enjeksiyondan sonra tümör formasyonun bozulma gözlemlenmiştir (Noguchi et al., 2014)(Lau et al., 2014). KRAS^{G12D}/ Lkb^{L/L} fare modellerinde, YAP'ın genetik kaybı tümör formasyonunda ve sayısında büyük oranda azalmaya sebebiyet vermektedir, kalan tümör lezyonlarında ise

benign özellik gözlenmektedir ve bu lezyonlar akciğer adenokarsinom veya akciğer skuamöz karsinom özelliği rastlanmamaktadır. Yapılan çalışmalarda YAP/TAZ'ın aktivasyonunun KHDAK'lerinin gelişmesi için tek başına yeterli olmadığı gözlemlenmiştir. YAP hiperaktivasyonu ve overekspresyonu söz konusu olan fare hava yolu epitel hücrelerinde hiperplazi gözlemlenirken malign tümör gelişimi için yetersizdir. Ölümsüzleştirilmiş insan bronşiyal hücrelerinde TAZ'ın ifadesi immun sistemi baskılanmış olan farelerde tümör oluşumuna sebebiyet verdiği anlaşılmıştır. KRAS^{G12D} fare modellerinde YAP'ın ifadesi küçük adenomların akciğer adenomları oluşumunu teşvik etmiştir (Zhang et al., 2015)(Lau et al., 2014)(Zhou et al., 2011).

2.4. AMG 510

Pankreas, kolorektal ve KHDAK gibi kanserlerde sık rastlanan KRAS G12C mutasyonları, kanser tedavisinde ilaç firmaları tarafından terapötik hedef haline gelmiştir. Amerikan menşeli AMGEN firması AMG 510 ismini verdiği ve klinik araştırmaları devam etmekte olan KRAS G12C mutasyonlarını hedef alan inhibitörünü geliştirdiğini duyurdu (*The Discovery Of Amgens Novel Investigational KRASG12C Inhibitor AMG 510 Published In Nature*, n.d.).

KRAS G12C'nin doğrudan inhibisyonu ilk olarak ARS-1620 molekülü ile doğrulanmıştır fakat bu molekülün klinikte kullanım ve testler için uygunluğu konusunda zorlanılmıştır. En büyük zorluklardan biri, Kras proteini ve ligand etkileşimleri için olan cebin küçük hacminden dolayı ARS-1620'nin inhibisyon gücü yetersiz kalmıştır. Bu durum için önemli bir gelişme, Kras proteininin üzerindeki bu cebin His95'in alternatif oryantasyonlarıyla oluştuğundan bu yüzeyle etkileşimleri arttıracak aromatik halkalar ile inhibisyonun güçsüzlüğü sorunu ortadan kaldırılmış oldu. AMG 510 bu sorunu ortadan kaldıracak, klinik ve tedavide uygulanabilirliği ile en iyi aday olarak ortaya çıktı. AMG 510 ve ARS-1620 arasında yapısal olarak benzerlik olmasına rağmen AMG 510'un Kras proteininin His95 oluşuna daha güçlü bağlanmıştır (Şekil 4.1) (Canon et al., 2019).



Şekil 2.12: AMG 510'un kimyasal yapısı ve KRAS proteininin ile etkileşimi (Canon et al., 2019)

2.5. Hipotez

Pankreas, akciğer, kolorektal gibi kanserlerde yaygın gözlenen KRAS G12C mutasyonları klinik açıdan hedef haline gelmiştir. Yeni geliştirilen KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510 yapılan in vivo, in vitro ve klinik çalışmalarla etkinliği gösterilmektedir. Fakat KRAS G12C'nin inhibisyonuyla birlikte hücrelerde önemli bypass mekanizmalarından olan Hippo yolağıyla ilişkisinin gösterilmesi klinikte kullanımı ve ilerde yapılacak olan çalışmalara önemli bilgiler sunacaktır. Bu çalışmayla birlikte KRAS G12C inhibisyonunun Hippo yolağıyla ilişkisini göstermeyi hedeflemekteyiz.

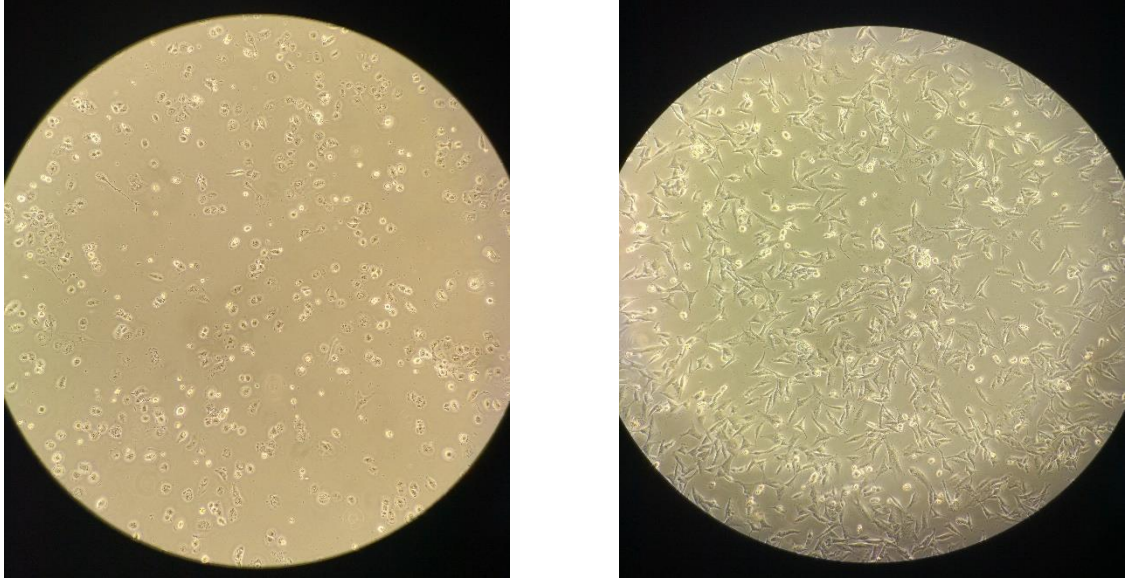
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

Yapılan bu çalışmada American type culture collection (ATCC) firmasından ticari olarak satın alınan KHDAK hücre hattı olan ve KRAS G12C mutant NCI-H23 ve KHDAK KRAS yaban tip NCI-H1975 hücre hatları kullanıldı. H23 ve H1975 hücre hatları %10 Fetal Bovine Serum (FBS Kat. No. 10500064 GIBCO) ve %0,5 Penisilin/Streptomisin içeren RPMI 1640 (Kat. No. 52400-025 GIBCO) besiyerinde kültüre edildi. Hücrelerin tamamı %5 CO₂, %95 nem ve 37° C'de kültüre edildi.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri

Hücre Hattı	KRAS	Çoğalma Özelliği
H23	G12C Mutant	Adherent
H1975	Yaban Tip	Adherent



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan hücre hatları H23 (Sol) ve H1975 (Sağ)

3.1.1. Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücreleri dondurmak için içerisinde %10 dimetil sülfoksit (DMSO) bulunan besiyeri hazırlandı. Tripsin edilen hücreler 15 ml'lik falkon tüplere alındı ve 100xg kuvvette 5 dk süresince santrifüjleldiler. Santrifüjden sonra süpernatant vakum aracılığıyla aspire edildi. Önceden hazırlanmış olan DMSO içeren besiyerinde pipetaj aracılığıyla homojen hale getirildi. Düşük sıcaklığa dayanıklı olan özel cyrotüplere dağıtılarak -80°C muhafaza edildi.

-80°C 'de muhafaza edilen hücreler çıkartıldı 37°C su banyosunda kısa süre inkübasyon işlemiyle çözdürüldü. Falkon tüp içerisinde 5 ml besiyerinde homojen edildikten sonra 100xg kuvvette santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant vakum aracılığıyla aspire edildi. Pelet besiyerinde homojen hale getirildikten sonra flaslara aktarıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Yapılan tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözeltiler aşağıda listelenmiştir;

YAP/TAZ primer antikor (Kat. No: 93622, Cell Signaling Technology), Anti-rabbit IgG sekonder antikor (Kat. No: 7074 Cell Signaling Technology), Anti-GAPDH antikor (Kat: No: Fnab03342 Fine Test), AMG 510 (Kat No: B2558-1 Biovision), Ripa lysis buffer system (Kat. No: Sc-24948 Santa Cruz Biotechnology), CellTiter96 Cell Proliferasyon Assay (MTT) (Kat. No: G4000 Promega)

3.3. Sitotoksosite Tayini

Yapılan bu tez çalışmasında KRAS G12C mutant KHDAK'i hücre hatlarında Kras inhibisyonu için AMG 510'un kullanıldı. Bu AMG 510 molekülünün H23 ve H1975 hücre hatlarında IC50 (The half maximal inhibitory concentration) değerlerinin saptanması için iki hücre hattında 96-well platelere kuyuda 10^4 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. H23 hücre hattı için 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 nM olacak şekilde, H1975 hücre hattı için 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20 μ M olacak şekilde 72 saat boyunca AMG 510 uygulandı. 72 saat sonunda Promega CellTiter96 kit protokolüne göre;

- Her kuyucuğa 15 μ l Dye solüsyon eklendi
- 37°C'de, nemli ve %5 CO₂ inkübatörde 1-4 saat inkübasyon gerçekleştirildi.
- Üzerine 100 μ l Stop solüsyon eklendi 1 saat inkübasyona bırakıldı
- 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

Tablo 3.2: H23 ve H1975 Hücre hatlarına uygulanan AMG 510 Konsantrasyonları

H23- Konsantrasyon(nM)	H1975- Konsantrasyon (μ M)
0	0
0.25	1
0.5	2.5
1	5
2	7.5
4	10
6	12.5
8	15
10	20

3.4. Western Blot

H23 ve H1975 hücre hatlarında AMG 510 uygulanmış ve uygulanmamış olan örneklerde protein seviyesi değişimlerinin gösterilmesi amacıyla SDS-PAGE western blot tekniği uygulanmıştır.

3.4.1. Örneklerden Protein Eldesi

Western Blot çalışması için kullanılacak olan örneklerden protein izolasyonu aşağıda verilen protokol doğrultusunda gerçekleştirilmiştir;

- 72 saat inkübasyon süreci biten hücrelerin besiyeri vakum aracılığıyla aspire edildi. Ardından soğuk Phosphate-Buffered Saline (PBS) ile 2 kez yıkandı.
- PBS aspire edildikten sonra hücrelerin bulunduğu flask buz üzerine alındı. İçerisinde proteaz ve fosfataz inhibitörü kokteyl içeren 1x Ripa buffer(Kat. No: Sc-24948 Santa Cruz Biotechnology) hücrelerin üzerine eklendi.
- Üzerine Ripa buffer eklenen hücreler 5-10 dk buzda inkübe edildiler.
- Örnekler inkübasyon sonrasında gerçekleştirilen vorteks, pipetaj, buz inkübasyonu sonunda 15.000xg kuvvette +4°C'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi ardından süpernatant steril ependorfa aktarıldı.

3.4.2. Protein Miktarının Tayin Edilmesi

Hücre örneklerinde izolasyonu gerçekleştirilen proteinlerin miktar tayinleri Bradford yöntemi ile tayin edildi. 1/1000 oranında dilüsyonu gerçekleştirilen örneklerle 1'e 4 oranında Bradford Dye reaktifi eklendi. Ölçüm standardizasyonu için 1, 2.5, 5, 12.5, 25 µg/ml olacak şekilde Bovine Serum Albumine (BSA) kullanıldı. Hazırlanan örnek ve standartlar 96-well plate dağıtıldı ve 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirildi.

3.4.3. SDS-Poliakrilamid Jel'in Hazırlanması

SDS-PAGE jelin hazırlanması için kullanılan kimyasal ve miktarları Tablo 3.3.'te verilmiştir. Jel'in döküleceği cam sistemler temizlendikten sonra Biorad Mini-Protean standına yerleştirildi. İlk olarak ayrıştırma jeli üst kısımda yaklaşık 1 cm mesafe kalacak şekilde döküldü üzerine vakit kaybetmeden izopropanol alkol eklendi. Ayrıştırma jeli donduktan sonra üzerine eklenen izopropanol alkol uzaklaştırıldı. Yükleme jeli de döküldükten sonra taraklar nazikçe yerleştirildikten sonra jelin donması için beklendi. Jel'in donması beklenirken örnekler hazırlandı.

Tablo 3.3: SDS-Poliakrilamid Jel Kimyasalları ve Miktarları

	% 10'lük Ayrıştırma (Seperating) Jeli	%10' luk Yükleme (Stocking) Jeli
dH ₂ O	6.15 ml	3.05 ml
%30 Akrilamid	5 ml	850 µl
1.5 M Tris pH 8.8	3.75 ml	-
0.5 Tris pH 6.8	-	1.25 ml
%10 SDS	150 µl	50 µl
%10 APS (Amonyum Persülfat)	75 µl	25 µl
TEMED	7.5 µl	2.5 µl

3.4.4. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi

Protein miktarı Bradford yöntemiyle tayin edilen örnekler 50µg olacak şekilde steril ependorflara alındıktan sonra 4x Laemli yükleme tamponu ile pipetaj edildi. Yükleme tamponu ile muamele edilen örnekler 95°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonunda örnekler kısa spin yaptırıldı. Donan ve protein örneklerini yüklemeye hazır olan jel yürütme tankına alındı. Sistem içerisine Running (Yürütme) Buffer eklendi. Daha sonra örnekler jelde ki kuyulara yüklenildi. Örnekler 100V'da 90 dakika boyunca yürümeye bırakıldı.

Running (Yürütme) Buffer (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.1 SDS) Hazırlanışı; 2 jeli yürütmek için 3.03 gr Tris, 14,26 Glisin ve 1 gr SDS tartılarak 1 lt dH₂O da çözdürüldü.

3.4.5. PVDF Membrana Islak Transfer

Yürütmenin gerçekleştiği ve proteinlerin ayrılmasının sağlandığı jel 15 dakika boyunca transfer buffer içinde inkübe edilerek dengeleme işlemi gerçekleştirildi. Polivinilidene Flüoride (PVDF) (Kat. No: IPVH00010, Merck Millipore) membran 5 dakika boyunca metanolde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu biten jel ve PVDF membran sandviç modeline göre hazırlandı ve transferin yapılacağı tankın içerisine alındı. Islak transfer +4°C'de 90 mA' de 16- 24 saat boyunca gerçekleştirildi. Proteinlerin membrana transferinin başarısının tayini için membran 5 dakika boyunca Ponceau S dye ile muamele edildi ve membranda ki bantlar gözlemlendi.

Transfer Buffer (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.05 SDS) Hazırlanışı ; 2 jel için 2.42 gr Tris, 11.41 gr Glisin ve 0.4 gr SDS tartılarak 800 ml dH₂O ile çözdürüldü daha sonra üzerine 200 ml Metanol eklenerek +4°C'de muhafaza edildi.

3.4.6. İmmunoblotlama ve Görüntüleme

Membran'ın immunoblotlama ve görüntüleme işlemleri aşağıda verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir ;

- Transfer işlemi gerçekleştirildikten sonra ortamda ki SDS'i uzaklaştırmak amacıyla membran TBS-T buffer ile 5 dakika boyunca 180 rpm'de çalkalanarak yıkandı.
- Membran %5 oranında yağsız süt tozu içeren TBS-T buffer ile 1 saat boyunca 90-120 rpm'de çalkalanarak bloklama işlemine tabi tutuldu.
- Primer antikör muamelesi için 1/1000 oranında hazırlanmış olan %5 BSA ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalanarak işaretlendi.

- Primer antikor işaretlenmesinden sonra membran oda sıcaklığında TBS-T buffer ile sırasıyla 5, 15, 5 dakika olacak şekilde 180 rpm de çalkalanarak yıkandı.
- Membran yıkamanın ardından HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor ile 1/7500 oranında hazırlanmış olan %5 BSA ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalanarak işaretlendi.
- Sekonder antikor işaretlenmesinden sonra membran oda sıcaklığında TBS-T buffer ile sırasıyla 5, 15, 5 dakika olacak şekilde 180 rpm'de çalkalanarak yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından membran ECL (Enhanced Chemiluminescence)(Kat. No: WBLUF0500, Millipore) ile muamele edildi.
- Spesifik protein bantları Odyssey ® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) cihazı aracılığıyla görüntülendi.

TBS-T buffer (25 mM Tris pH:7.6, 34 mM NaCl, %1 Tween 20) Hazırlanışı;

20x TBS için; 48.46 gr Tris, 175.32 gr NaCl tartılarak 1 litre dH₂O'da çözdürüldü.

1x TBS-T için; 50 ml 20x TBS buffer alınıp 950 ml dH₂O'da çözüldü ve üzerine 1 ml Tween 20 eklendi.

%5 BSA hazırlanışı; 50 ml %5 BSA için 2.5 gr BSA tartılarak 50 ml TBS-T buffer içinde çözdürüldü.

3.5 İstatistiksel Analizler

Elde edilen IC50 verileri için Excel programında lineer grafik elde edilerek sonuçlar bulunmuştur. Western blot sonuçları Image Studio Lite dansite programında ölçümlenerek IBM SPSS 17. paket program kullanılarak Paried-T testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü

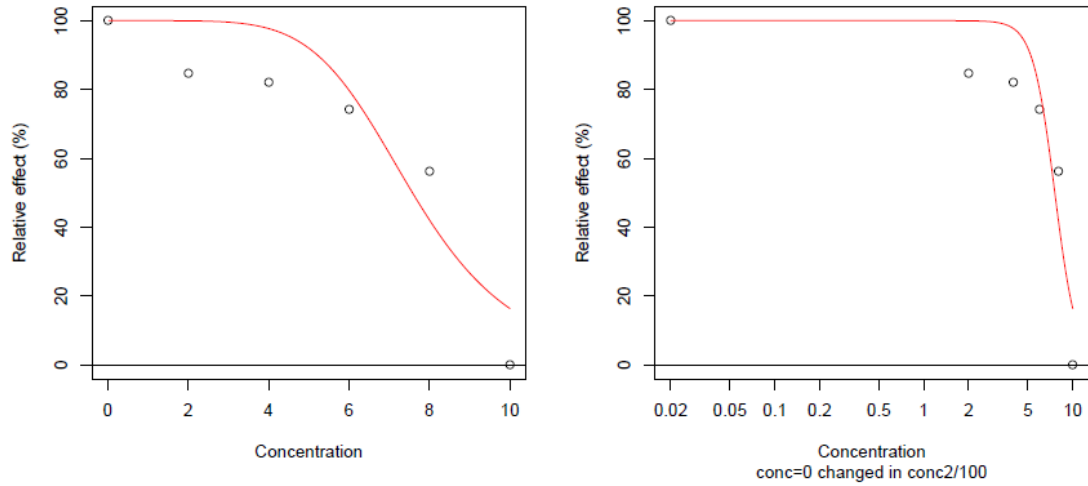
Tez çalışmasının deneyleri tasarlanırken KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510'un KRAS G12C mutant hücre dizisinde Hippo yolağı etkisinin değerlendirilmesi amacıyla KRAS G12C mutant KHDAK hücre hattı NCI-H23 kullanılmaya karar verildi. Kontrol grubu olarak kullanmak amacıyla KRAS yabani tip (Wild Type) KHDAK Hücre hattı NCI-H1975 kullanılmaya karar verildi. Hücreler population doubling zamanlarına (Tablo 4.1.) uygun şekilde pasajlanmıştır. Tasarlanan deneylere uygun hale getirilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan hücre hatlarının population doubling zamanları

Population Doubling Time	
NCI-H23	NCI-H1975
38 Saat	~24 Saat

4.2. Çalışmada kullanılan hücre hatlarında AMG 510 için IC50 değerlerinin tayini

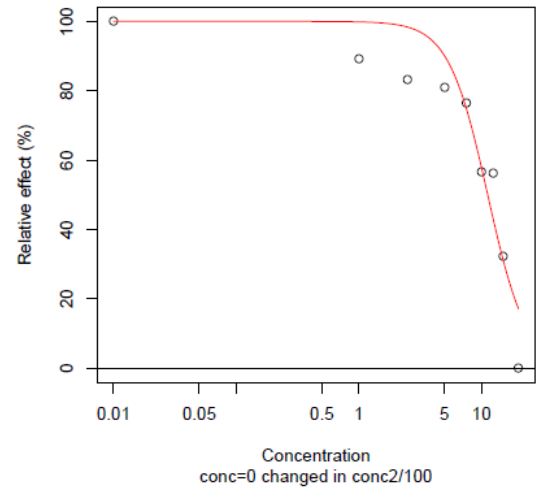
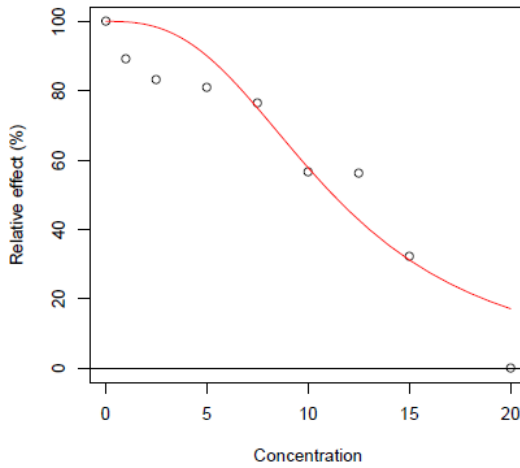
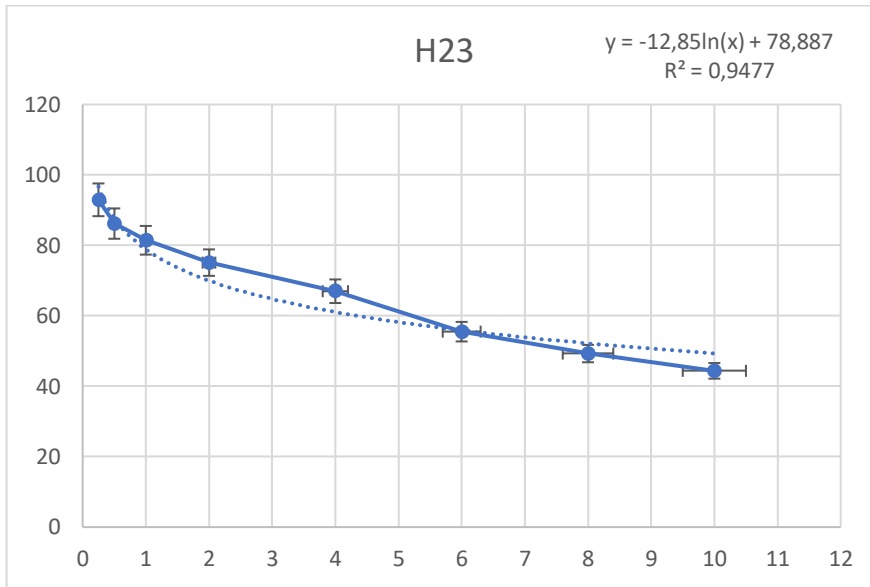
Yapılan tez çalışmasında kullanılan NCI-H23 ve NCI-H1975 hücre hatlarında KRAS G12C spesifik antikor AMG 510 için %50 sağ kalım oranı hesaplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Uygun yoğunluğa gelen hücre dizileri tripsin edildikten sonra 96-well plakelere 10^4 ekildi. Ekimi yapılan hücrelere Tablo 3.2.'de verilen oranda AMG 510 çift tekrar olacak şekilde uygulandı. NCI-H23 ve NCI-H1975 hücre dizileri için AMG 510'un IC50 değerleri tayin edildi. NCI-H23 hücre hattı için AMG 510'un IC50 değeri; 7.58 nM, NCI-H1975 hücre hattı için ise AMG 510'un IC50 değeri; 11.23 μ M bulunmuştur (Şekil 4.1.), (Şekil 4.2.).



ICn Estimations

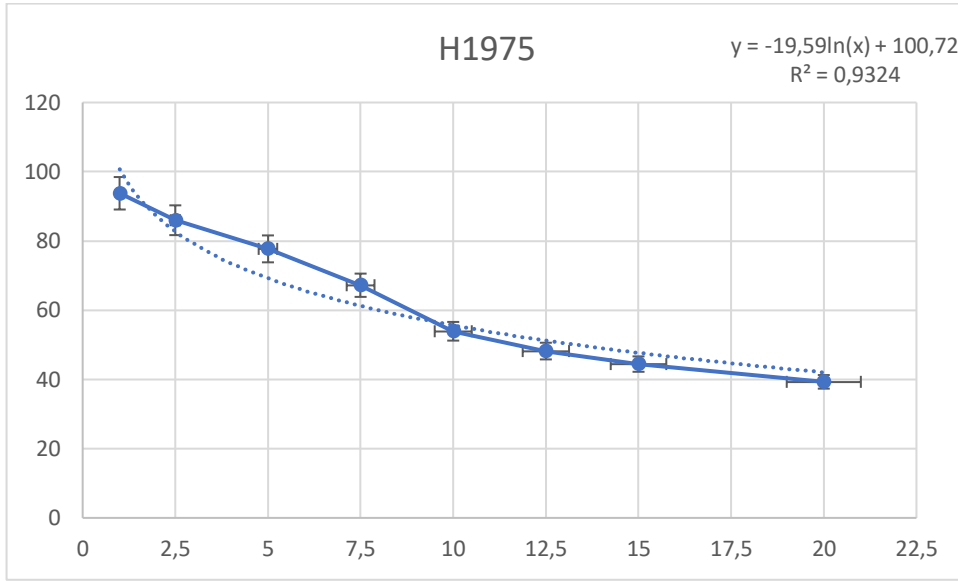
	Estimation	Standard error	Lower CI95%	Upper CI95%	Ratio CI
IC50	7.58	0.63	5.83	9.32	1.6
IC90	11.02	0.78	9	13.03	1.45
IC99	16.58	1	14.02	19.14	1.37
Gamma	5.87	2.77	-1.81	13.56	-

Şekil 4.1: NCI-H23 Hücre dizisinde AMG 510 IC50 tayini

Tablo 4.2: NCI-H23 Yüzde canlılık grafiği**ICn Estimations**

	Estimation	Standard error	Lower CI95%	Upper CI95%	Ratio CI
IC50	11.23	0.98	8.91	13.54	1.52
IC90	25.16	1.22	22.34	27.97	1.25
IC99	60.68	1.55	57.1	64.26	1.13
Gamma	2.72	0.74	0.98	4.47	-

Şekil 4.2: NCI-H1975 Hücre dizisinde AMG 510 IC50 tayini

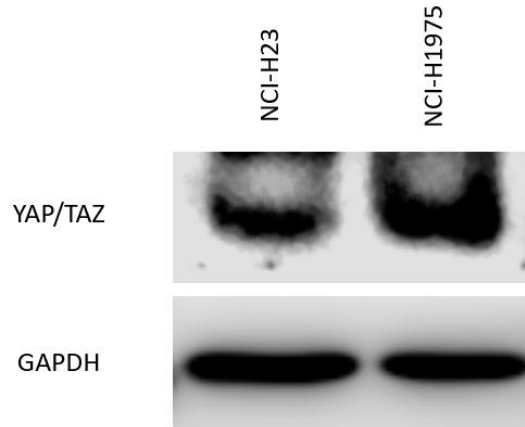
Tablo 4.3 NCI-H1975 Yüzde canlılık grafiği

4.3. Örneklerin toplanması

Yarı öldürücü doz olan IC50 değerlerinin saptanmasından sonra NCI-H23 ve NCI-H1975 hücre hatlarına 72 saat boyunca KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510 uygulandı. 72 saat boyunca AMG 510 verilen hücre hatları western blot protein analizi yapılmak üzere 1x Ripa buffer ile toplandı ve western blot çalışmasına geçildi.

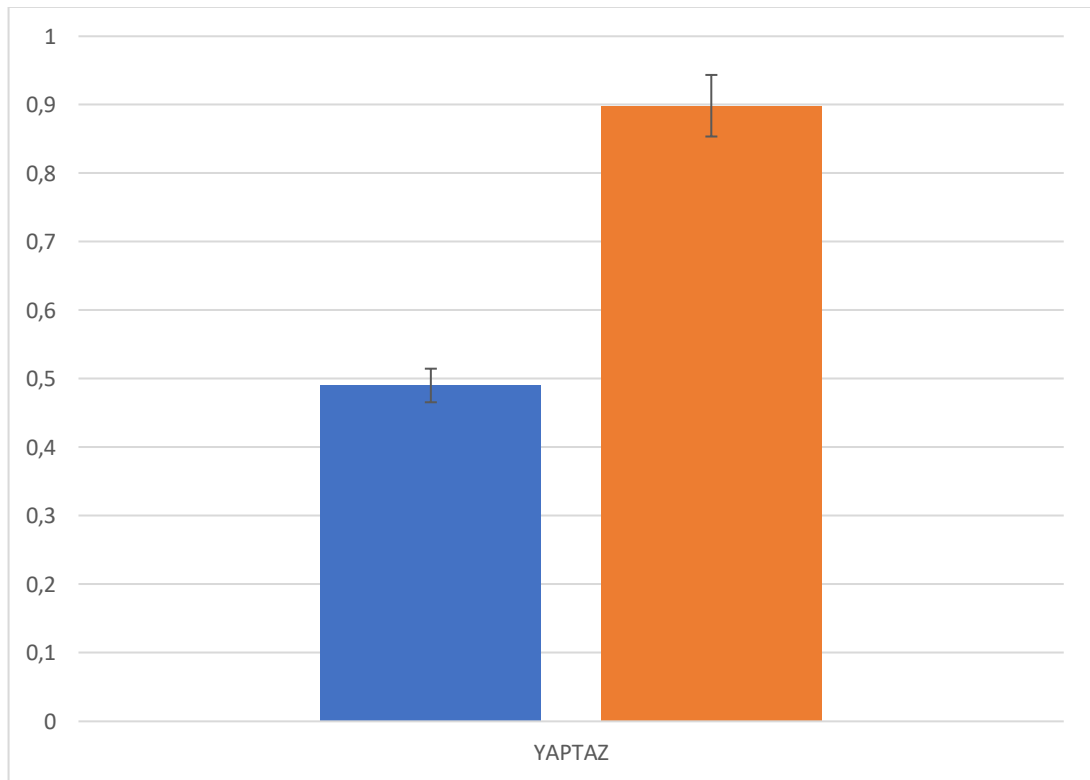
4.4. NCI-H23 hücre hattında YAP/TAZ protein tayini

Çalışmada kullanılan KRAS G12C mutant KHDAK hücre hattı NCI-H23 ve KRAS yaban tip KHDAK hücre hattı NCI-H1975 hücre hattında, KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510 uygulanmadan önce Hippo yolağının çekirdek komponentlerinden YAP/TAZ protein seviyesine bakıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarında YAP/TAZ seviyeleri

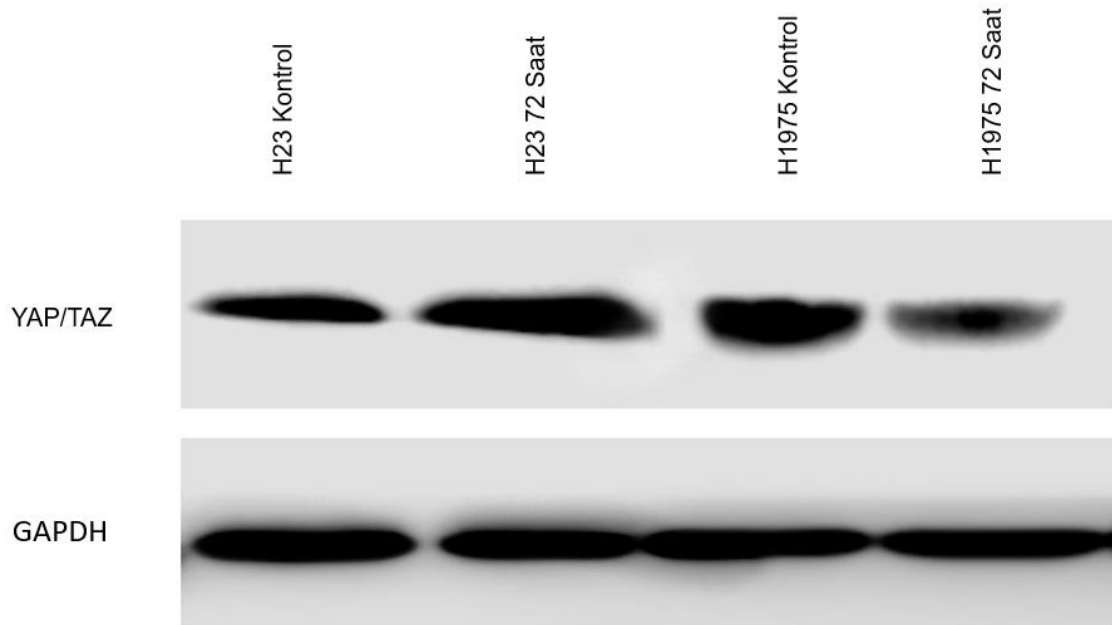
Tablo 4.4: NCI-H23(Mavi) ve NCI-H1975 Hücre dizilerinde rölatif YAP/TAZ ekspresyon seviyeleri



Yapılan western blot çalışmasına ve analizine göre Şekil 4.3'te verildiği gibi hücre hatlarında YAP/TAZ seviyeleri tespit edildi. Sonuçların doğruluğunun analizi için GAPDH görüntüsüne göre kıyaslama yapıldı. Yapılan istatistiksel analize göre NCI-H1975 hücre hattında, NCI-H23' e kıyasla daha yüksek YAP/TAZ seviyesi gözlemlendi.

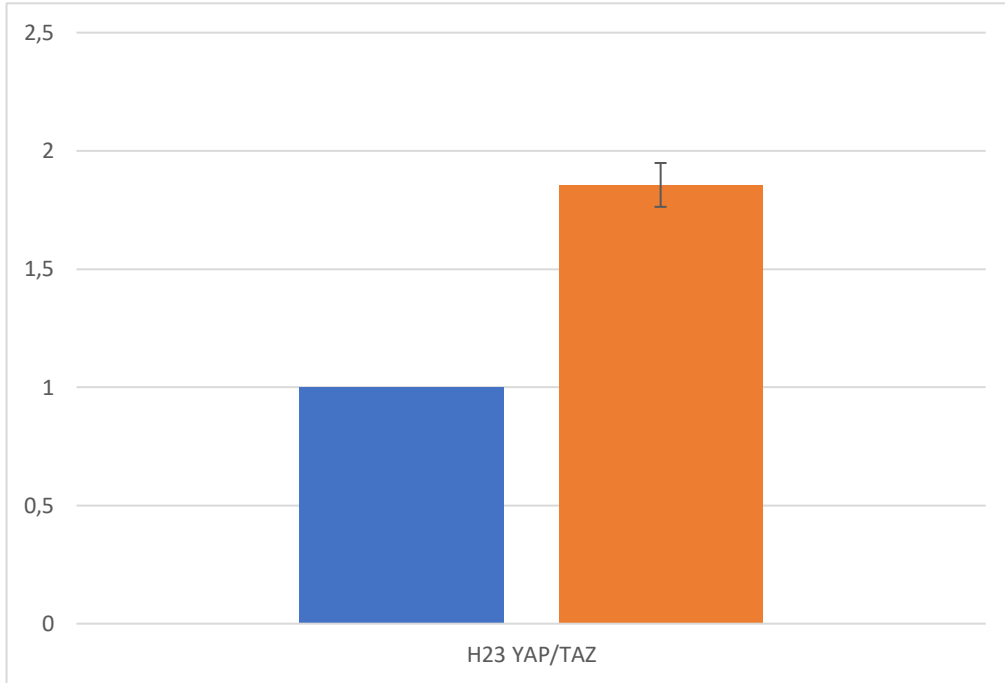
4.5 AMG 510 uygulanan NCI-H23 hücre hattında YAP/TAZ protein tayini

KHDAK KRAS G12C mutant NCI-H23 hücre hattına KRAS'ın susturulduktan sonra Hippo yolağıyla ilişkisinin araştırılması amacıyla NCI-H23 hücre hattına 72 saat boyunca KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510 uygulandı. 72 saat sonunda NCI-H23 hücre hattı örneklerine western blot yöntemiyle gerçekleştirilerek analiz edildi (Şekil 4.4).

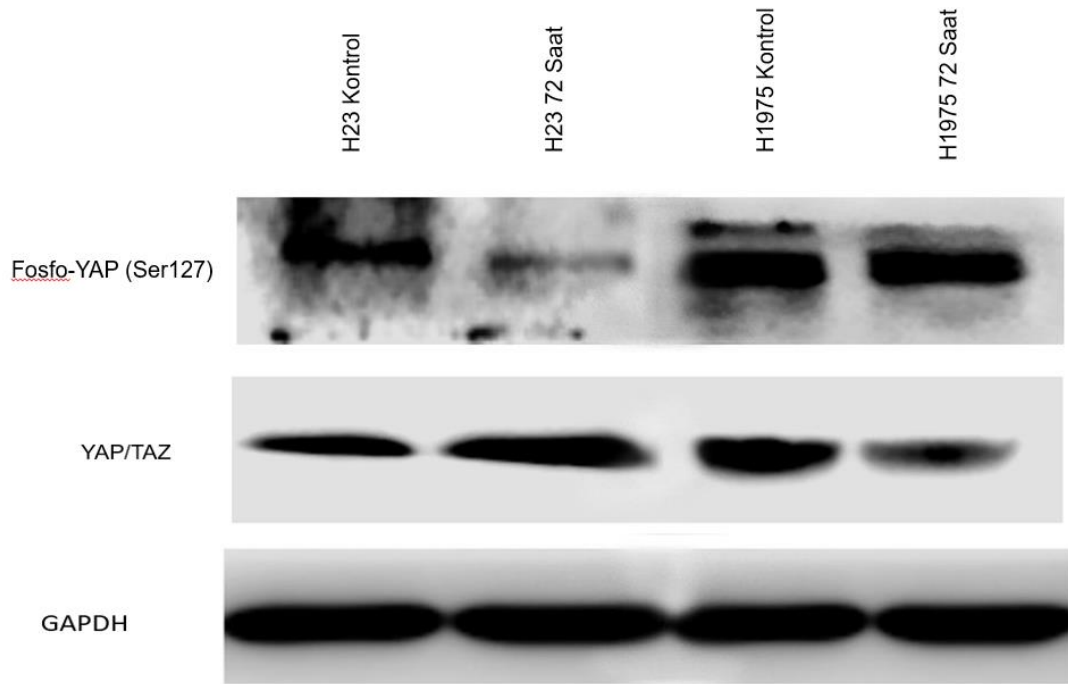


Şekil 4.4: AMG 510 uygulanan NCI-H23 hücre hattında YAP/TAZ seviyeleri

Tablo 4.5: NCI-H23 Hücre hattında AMG 510 uygulandıktan sonra rölatif YAP/TAZ seviyeleri

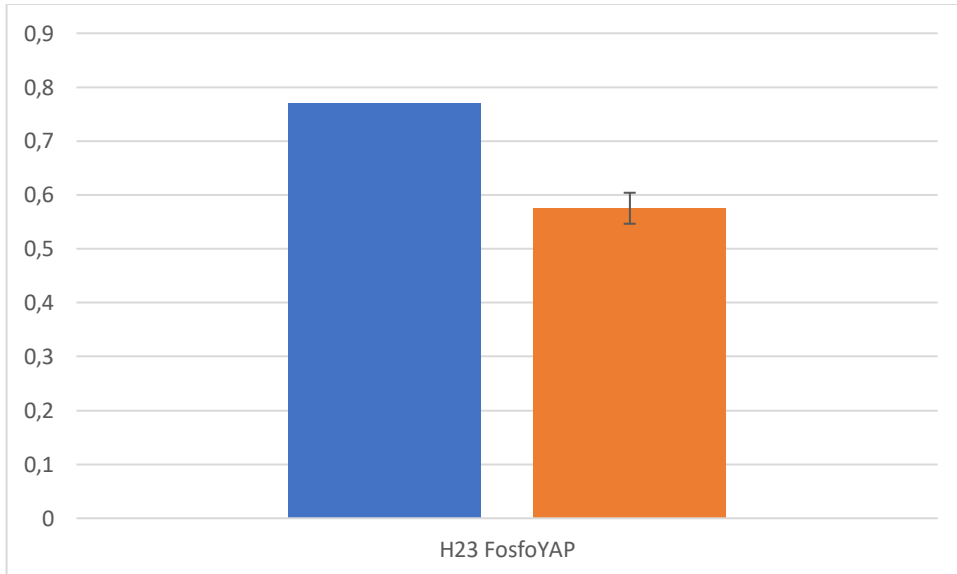


72 Saat boyunca AMG 510 uygulanan NCI-H23 hattından toplanan örneklerde yapılan western blot çalışması sonucunda uygulanmayan normal NCI-H23 hücre hattında toplanan örneklerle ile kıyaslandığında AMG 510 uygulaması sonucunda YAP/TAZ proteini seviyeleri istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur.. Fosforilasyon sonucunda hücrenin çekirdeğine geçemeyip sitoplazmada degradasyona uğrayan ve fonksiyon gösteremeyen Fosfo-YAP seviyelerinin anlaşılması içinde western blot analizi uygulanmıştır (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5: AMG 510 uygulanan NCI-H23 hücre hattında Fosfo-YAP (Ser127) seviyeleri

Tablo 4.6: AMG 510 uygulanan NCI-H23 hücre hattında Fosfo-YAP rölatif seviyeleri

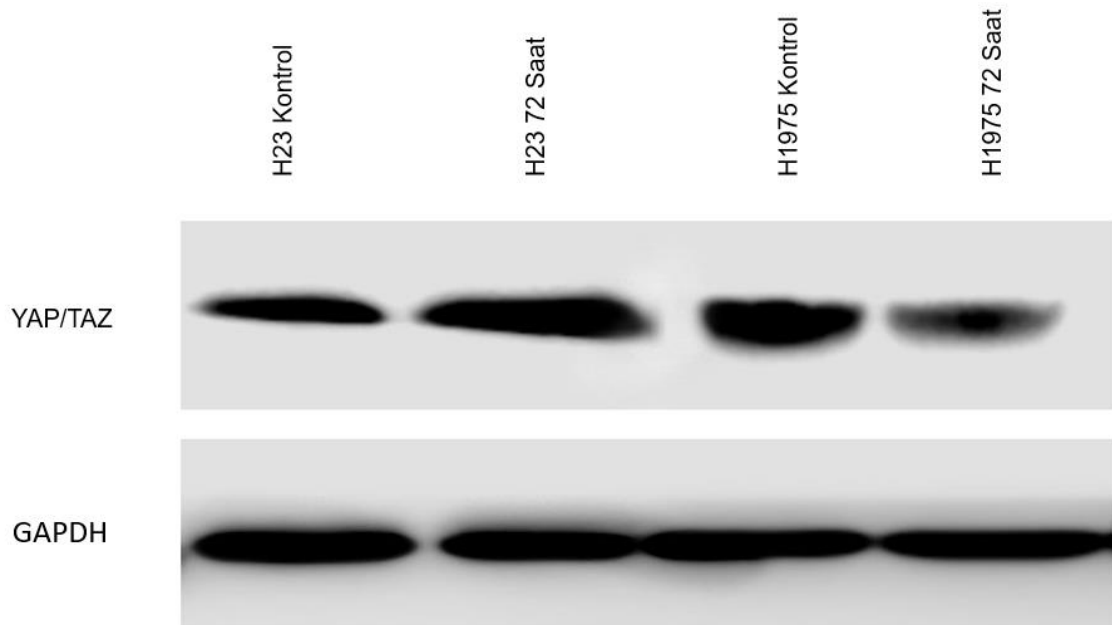


Sitoplazmada degradasyona uğrayıp, çekirdekte fonksiyon gösteremeyen Fosfo-YAP proteini seviyeleri istatistiksel olarak düşük olduğu bulunmuştur. Kontrole kıyaslandığı

zaman normal şartlarda fosforilasyona uğrayıp çekirdeğe geçemeyen YAP proteini seviyesinde düşüş vardır.

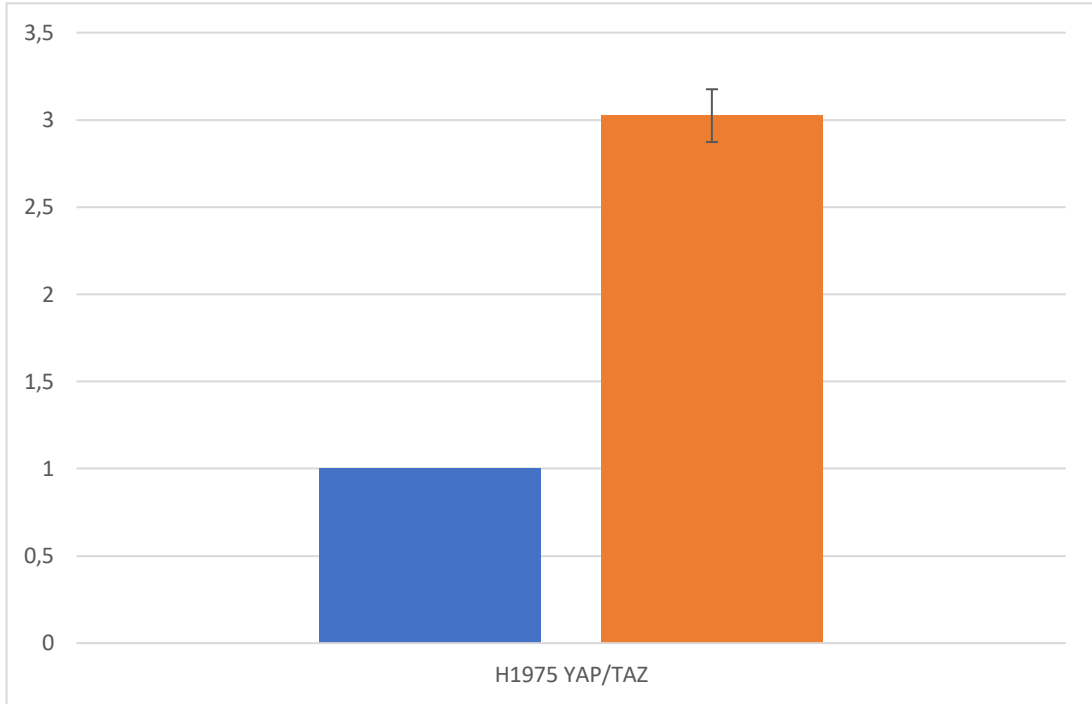
4.6. AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında YAP/TAZ protein tayini

KHDAK KRAS yaban tip NCI-H1975 hücre hattında 72 saat boyunca KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510 uygulanmıştır. 72 saatin sonunda AMG 510 uygulanan NCI-1975 hücre hattı örnekleri ve kontrol grubu NCI-H1975 hücre hatları toplanıp western blot protein analizleri uygulandı (Şekil 4.6).

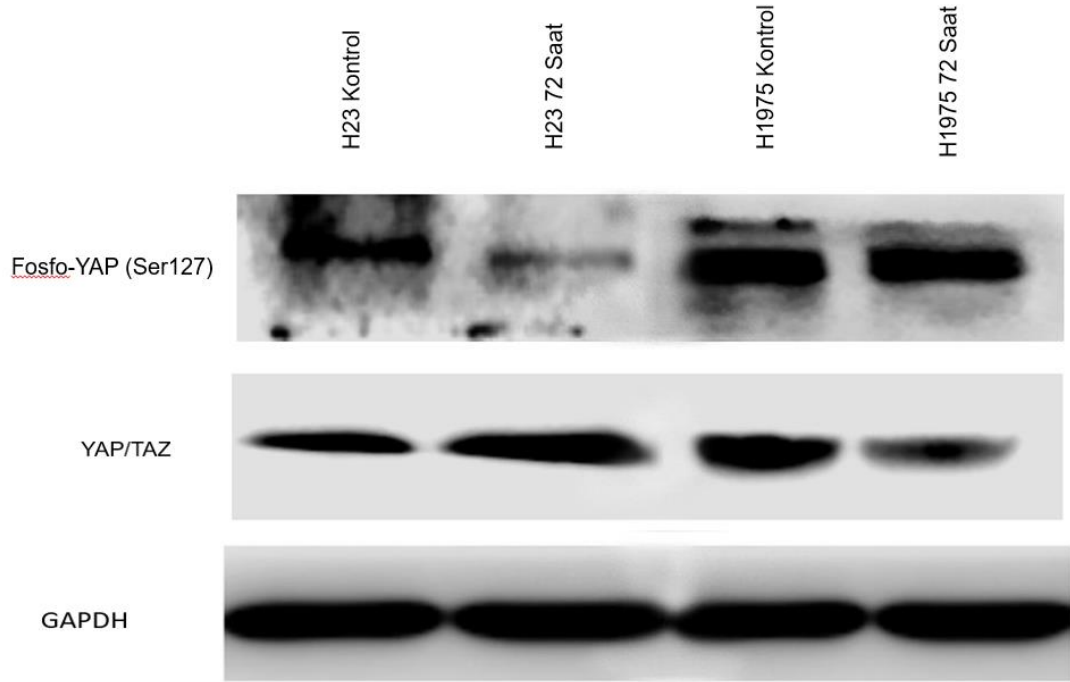


Şekil 4.6: AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında YAP/TAZ protein seviyeleri

Tablo 4.7: AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında rölatif YAP/TAZ protein seviyeleri

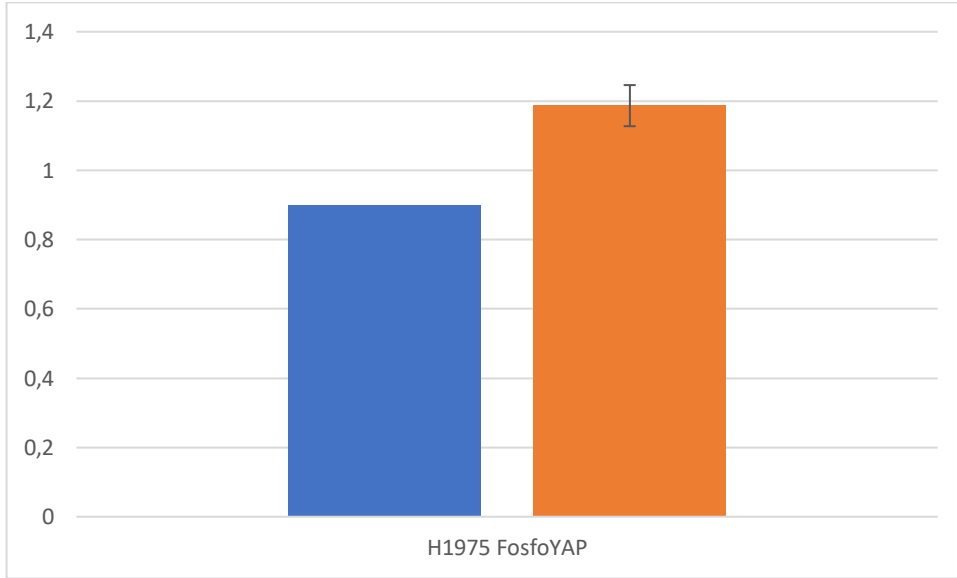


72 saat boyunca AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında YAP/TAZ seviyelerinin analizi için kontrol grubu ve protein seviyelerinin kıyaslanması için GAPDH kullanıldı. Yapılan analiz sonucunda 72 saat AMG 510 uygulanan örneklerde YAP/TAZ protein seviyesinde istatistiksel olarak yüksek bulundu. Sitoplazmada degrede olan Fosfo-YAP seviyelerinin anlaşılması içinde western blot yöntemiyle analiz edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında Fosfo-YAP(Ser127) seviyeleri

Tablo 4.8: AMG 510 uygulanan NCI-H1975 hücre hattında rölatif Fosfo-YAP(Ser127) seviyeleri



Yapılan western blot analizi sonucunda kontrol grubu NCI-H1975 örneğiyle 72 saat AMG 510 uygulanan NCI-H1975 örneklerinde Fosfo-YAP seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecek bir fark görülmemiştir.

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerde %18.4 oranıyla ilk sırada yer almaktadır. Akciğer kanseri teşhisi almış hastaların yalnızca %15'i 5 yıllık sağ kalım göstermektedir bu oranda çok düşüktür (De Koning et al., 2020). Bu durumun en büyük sebeplerinden birisi akciğer kanserlerinin hastalarda teşhislerinde geç kalınmasıdır. Akciğer kanserlerinin ilerleyen yıllarla birlikte rastlanma sıklığı giderek artmaktadır. Bu durum artan tütün ve tütün ürünü kullanmaya bağlanmaktadır. Akciğer kanseri temel olarak iki ana histolojik sınıfta sınıflandırılmaktadır bunlardan %85 oranıyla en sık teşhis edileni küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) , diğeri ise % 15 oranıyla küçük hücreli akciğer kanseridir (KHAK). KHDAK'leri kendi içinde %40 oranıyla adenokarsinoma, %30 oranıyla skuamöz hücreli karsinoma, %10 oranıyla büyük hücreli karsinoma ve diğeri alt histolojik alt sınıflara ayrılmaktadır. Akciğer kanseri patolojisinin aydınlatılması amacıyla akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılması daha da ayrıntılı hale getirilmiştir (Tablo 2.1.) ((Travis et al., 2015).

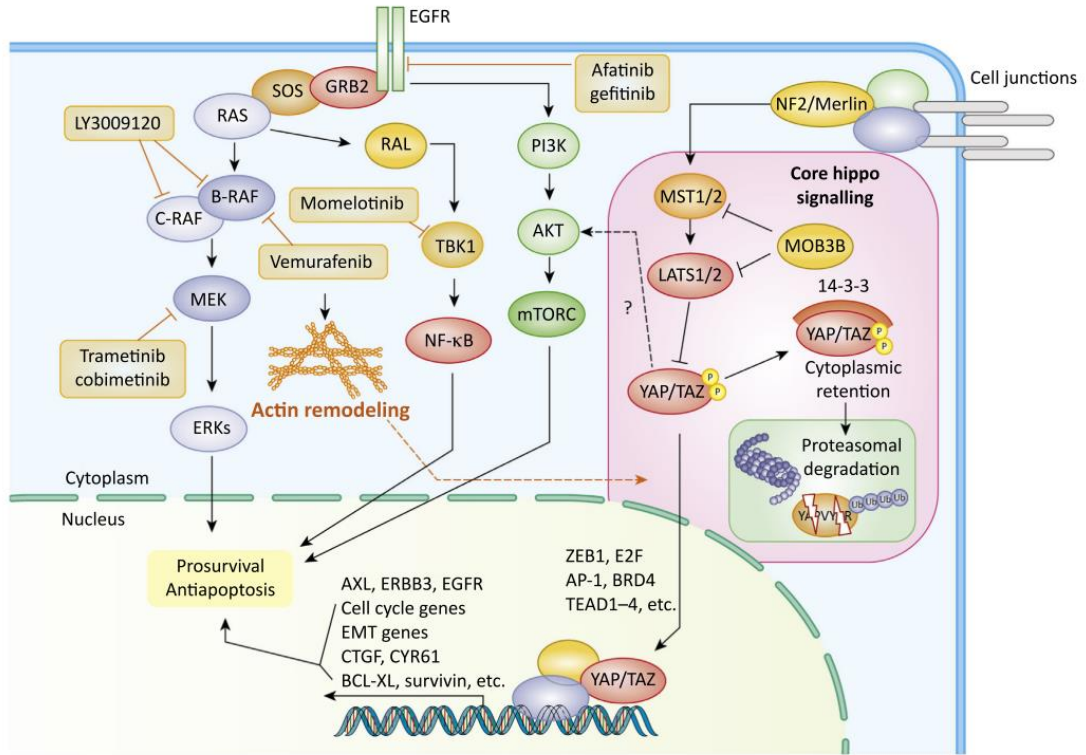
Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarının %30'unda KRAS mutasyonu gözlemlenmektedir. KRAS mutasyonuna sahip KHDAK hastaları diğeri KHDAK hastalarıyla karşılaştırıldığı zaman daha kötü prognoz gösterdiği anlaşılmıştır. KRAS mutasyonuna sahip KHDAK hastalarına uygulanan standart kemoterapi tedavileri istenilen yanıtları vermemektedir. KRAS mutasyonuna sahip KHDAK hastalarına moleküler yaklaşım olarak RAS-RAF-MEK yolağını hedefleyen MEK inhibitörleri kullanılmaktadır fakat bu yaklaşımda istenilen sonuçları vermemektedir. Kras proteininin kontrol ettiği tek yolak RAS-RAF-MEK yolağı olmadığı anlaşılmaktadır. Bu durum KRAS mutant KHDAK'lerinde genetik heterojenitenin söz konusu olduğunu göstermektedir. Bu durum özellikle sık gözlemlenen KRAS G12C mutasyonlarını hedefleyen inhibitörlerin çalışmalarını ve klinik kullanımını teşvik etmektedir (Scheffler et al., 2019).

KRAS G12C mutasyonları hedef alan spesifik inhibitör AMG 510 henüz klinikte kullanılmaya başlanmasa da şuan hali hazırda devam etmekte olan Faz 1/ Faz 2 çalışmalarının sonuçları hastaları umut olmaktadır (*A Phase 1/2, Study Evaluating the Safety, Tolerability, PK, and Efficacy of AMG 510 in Subjects With Solid Tumors With a Specific KRAS Mutation (CodeBreak 100) - Full Text View - ClinicalTrials.gov*, n.d.-b). Açıklanan klinik çalışmada KHDAK hastası bireylerin 3'üne ağız yoluyla, günlük tek doz 180 mg AMG 510 uygulanmış, 1 bireye ise yine ağız yoluyla, günlük tek doz 360 mg AMG 510 uygulanmıştır. 6 haftalık AMG 510 tedavisinin sonunda günlük 180 mg AMG 510 uygulanan hastada %34'lük tümör büzülmesi gözlemlendi ve 360 mg günlük doz uygulanan bir diğer hastada ise %64 oranında tümör gerilemesi gözlemlendi. 18. Haftada takip taramasında günlük 360 mg AMG 510 uygulanan hastada hedef alınan lezyonların hepsinin tam olarak düzeldiği anlaşılmıştır (Canon et al., 2019). Yapılan bu çalışmaların ışığında KRAS G12C mutasyonuna sahip hastalar için umut ortaya çıkmıştır. AMG 510 yapılan klinik çalışmalarda etkinliğini kanıtlamaktadır. Fakat kanser hastalığının tedavisinin en büyük zorluklarından birisinin direnç mekanizmalarının olduğu bilinmektedir. AMG 510'un etkin kullanımına geçilmeden önce yapılan ve yapılacak olan çalışmalarla mutant KRAS'ın inhibisyonunun ardından hastada ortaya çıkacak olan direnç mekanizmalarının anlaşılması büyük önem arz etmektedir. AMG 510 ile birlikte kullanılacak olan olası kombine ilaç tedavisi stratejilerinin etkinliklerinin anlaşılması klinik kullanımda önemlidir. Bizim çalışmamızla birlikte KRAS G12C mutant ve yaban tip KHDAK hücre hatlarında AMG 510 kullanımıyla birlikte aktif KRAS'ın inhibisyonunun ardından ortaya çıkacak olan olası Hippo yolağı direnç mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmektedir.

RAS inhibitörleri hala klinikte gelişme aşamasında iken, onkojenik Ras ablasyonunun ardından potansiyel bypass mekanizmalarının tanımlanması ve araştırılması çalışmaları giderek sayılarını arttırmıştır. Genetik olarak modifikasyona uğratılmış ileri evre pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) fare modellerinde onkojenik KRAS'ın susturulmasının ardından yeniden nüks eden 8 tümör formasyonlarının 3'ünde YAP geninde amplifikasyon olduğu anlaşılmıştır (Kapoor et al., 2014). Genom ölçekli cDNA ekranlarında KRAS mutant kolon kanseri hücre hatların KRAS'ın knockdown edilmesinin ardından sağ kalımın desteklenmesinde YAP proteinin en büyük etkisi olduğu anlaşılmıştır (Shao et al., 2014). Bir diğer çalışmada KRAS mutant akciğer kanseri hücre hatlarında MEK inhibitörü Selumetinib ve TBK/JAK inhibitörü momelotinib'in kombine kullanımının ardından tedaviye direncin ortadan kaldırılması için YAP proteinin ablasyonunun yeterli olduğu anlaşılmıştır (Kitajima et al., 2018). Yapılan bu çalışmaların neticesinde RAS/ MAPK yolağının susturulmasının ardından

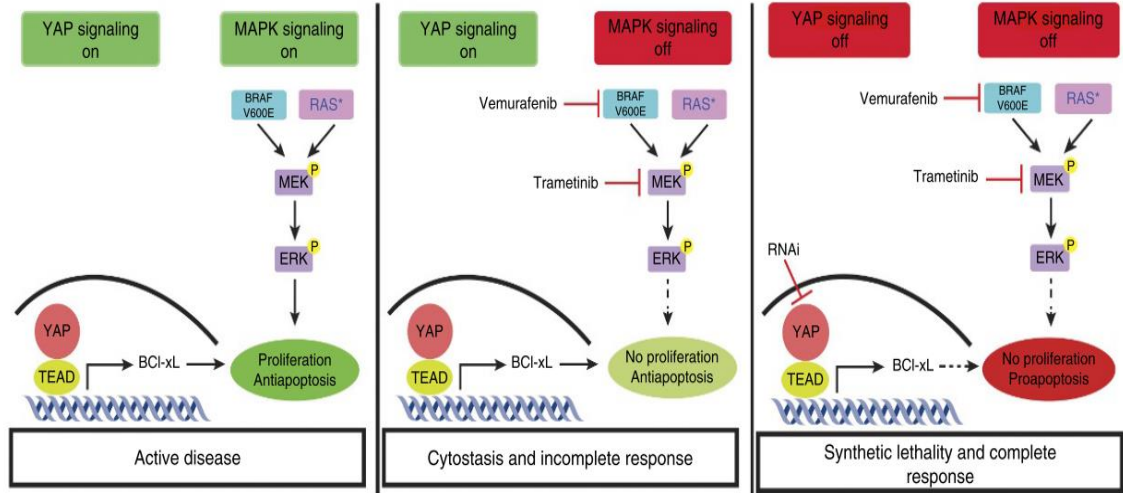
anahtar proteinin Hippo yolağının önemli kompetentlerinden YAP molekülü olduğu anlaşılmaktadır.

RAS/MAPK yolağının blokajının ardından YAP aracılı direnç mekanizmasının araştırılmasında, YAP'ın PDAC hücre hatlarında hücre döngüsüne devam etmesinde TEA domain Transcription Factor (TEAD1/2) ve E2F transkripsiyon faktörleri ile işbirliği yaptığı gösterilmiştir. YAP proteini Akciğer kanseri hücre hatlarında ise AP-1 transkripsiyon faktörü aracılığıyla KRAS blokajından hücreyi kurtardığı anlaşılmıştır. BRAF veya KRAS mutant hücre hatlarında MAPK'a yönelik moleküler tedavide YAP'ın antiapoptotik protein Bcl-xL'i kodlayan BCL2L1'in TEAD aracılı transkripsiyonu söz konusudur böylelikle apoptoz önlemektedir (Lin et al., 2015). KRAS mutant KHDAK hücre hatlarında BRAF/ MEK ve PI3K kombine moleküler hedefli ilaç tedavilerinde klinik öncesi çalışmalarda iyi sonuçlar verirken klinik çalışmalarda kısmi yanıtla sonuçlanmaktadır. Bu bulguların ışığında YAP proteinin aşağı yolak efektör proteinler ile etkileşimi sonucu tedavi direncini indüklediği, RAS/MAPK blokajına rağmen YAP'ın bypass mekanizması oluşturarak tedaviyi zorlaştırdığı gösterilmektedir (Nguyen & Yi, 2019). Bu nedenle Hippo yolağının kanserlerde mekanizmalarının, efektör yolaklarla ilişkilerinin, mutasyon profillerinin, epigenetik durumlarının, tümör mikro çevre ve immün yanıt ilişkilerinin yapılan çalışmalarla birlikte açıklanması ve ortaya çıkarılması büyük önem arz etmektedir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Moleküler hedefli kanser tedavilerinde YAP/TAZ sinyallenmesi ve direnç mekanizmaları (Nguyen & Yi, 2019).

Lin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada RAS/MEK hedefli moleküler tedavide YAP'ın nasıl regüle olduğu anlaşılması amacıyla YAP susturulmuştur. YAP'ın susturulması durumunda hücrenin apoptoza gittiği bu durumun YAP'ı sentetik öldürücü olabileceğini düşündürmüştür. Çünkü yapılan bir diğer çalışmada RAS/MEK hedefli tedavide YAP'ın susturulmasının hücre canlılığını bozduğu ve hücreleri apoptoza teşvik ettiği gösterilmiştir. KHDAK hücre hatlarında yapılan bir çalışmada RAS/MEK kombine tedavide YAP'ın susturulmasının ardından kaspaz-3, kaspaz-7 ve PARP kesim aktivasyonunun indüklendiği böylelikle hücrelerin apoptoza teşvik edildiği anlaşılmıştır (Şekil 5.2) (Lin et al., 2015). Tez çalışmamızın bulgularına bakıldığında zaman KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510'un uygulandığı hücre hatlarında YAP/TAZ protein seviyelerinde artış olduğu anlaşılmıştır. Sitoplazmada degrede olan ve çekirdeğe giremeyen Fosfo-YAP(Ser127) seviyelerine bakıldığında düşüş olduğu anlaşılmıştır. Bu durum literatürle karşılaştırıldığında paralellik göstermektedir. Çalışmada çıkan bulgulara ve literatüre bakıldığında RAS/MAPK yolağının hedeflenmesi durumunda hippo yolağı çekirdek komponentlerinde YAP proteinin seviyelerinin artmasının olası direnç mekanizmalarını ortaya çıkarabilmektedir.



Şekil 5.2: BRAF ve RAS mutant kanserlerde YAP'ın fonksiyonu (Lin et al., 2015)

Yaptığımız tez çalışmada RAS/RAF/MAPK yolağının birçok kanserlerde en çok mutasyona uğrayan geni KRAS hedeflenmiştir. Faz 1 ve faz 2 çalışmalarıyla umut vaat eden AMG 510 için literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız tez çalışması literatürde AMG 510 hakkında daha fazla bilgi ve veriye ulaşma imkanı sağlamaktadır. KRAS G12C mutant KHDAK' hücre hatlarında AMG 510 kullanılarak RAS/RAF/MAPK yolağının blokajı sağlanmıştır. Bu blokajın ardından kanserlerde direnç mekanizmalarında rol alan Hippo yolağının önemli komponentlerinden YAP/TAZ ve Fosfo-YAP(Ser127) protein seviyeleri western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. 72 saat sürecince AMG 510 kullanılan KRAS G12C mutant KHDAK H23 hücre hattında YAP/TAZ protein seviyelerinde kontrole kıyasla 2 kat artış olduğu anlaşılmıştır. Bu artış AMG 510 kullanımına rağmen hücrenin Hippo yolağından kaynaklı olarak direnç mekanizması geliştirdiği hipotezini desteklemektedir. Fosforilasyona uğrayan ve sitoplazmada tutularak veya sitoplazmada degrede olarak fonksiyon gösteremeyen Fosfo-YAP(Ser127) seviyeleri kontrole kıyasla düşüş olduğu western blot yöntemiyle gösterilmiştir. Fosfo-YAP seviyelerinde ki düşüş fonksiyonel YAP proteinlerinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Ayrıca NCI-H1975 hücre hattında 72 saat boyunca AMG 510 uygulandıktan sonra toplanan protein örnekleri western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz sonucunda YAP/TAZ protein seviyelerinde kontrole kıyasla 3 kat artış olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları doğrultusunda RAS/RAF/MAPK yolağının blokajıyla Hippo yolağından kaynaklı direnç mekanizması oluştuğu gösterilmiştir. Çalışmamız literatür bilgisi ile desteklenmektedir. Bu çalışma sonuçları doğrultusunda ve literatür bilgilerine bakıldığında Hippo yolağının önemli komponentlerinden YAP/TAZ'ın

AMG 510 kullanılarak RAS yolağının blokajına rağmen direnç mekanizması geliştirdiği gösterilmiştir. Bu çalışma literatürde AMG 510 hakkında daha fazla veri ve AMG 510'un klinik kullanımından önce olası direnç mekanizmaları hakkında yeni veriler sunmaktadır.

Literatürde yer alan çalışmaların ve bizim tez çalışmamızın bulgularının ışığında RAS/MAPK yolağının tek başına hedeflenmesi KHDAK'lerinin tedavisinde tek başına yeterli olmadığı anlaşılmaktadır. AMG 510 klinik öncesi çalışmalarda ve klinik çalışmalarında önemli ve umut veren sonuçlar göstermektedir. Fakat tez çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlara bakıldığında KRAS G12C mutant KHDAK hücre hattına ve KRAS yaban tip hücre hattına AMG 510'un 72 saat süreyle uygulanması durumunda YAP/TAZ protein seviyelerinde artışın olduğu gözlemlenmektedir. Fonksiyon gösteremeyen Fosfo-YAP(Ser127) seviyelerinde ise azalış olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum AMG 510'un kullanılarak Kras'ın inhibisyonuna rağmen Hippo yolağının direnç mekanizması geliştirmede rolünün olduğu göstermektedir. AMG 510 klinik kullanım öncesi olası direnç ve bypass mekanizmalarının üzerine yapılacak çalışmalar hem hastalar açısından hem de araştırmacılar için kaynak, zaman açısından büyük önem taşımaktadır.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmayla birlikte KRAS mutasyonlarının sık görüldüğü KHDAK'lerinde moleküler hedeflenmesinde KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510'un kullanımına rağmen Hippo yolağının çekirdek komponentlerinde YAP/TAZ seviyelerinin arttığı bundan dolayı direnç mekanizmasının geliştiği açıklanmış ve aydınlatılmıştır. KRAS G12C spesifik inhibitörü AMG 510 klinik kullanımından önce yapılan bu çalışmayla ilerde hastalarda ortaya çıkabilecek olan direnç mekanizmasının yapılan ön çalışmayla ortaya çıkarılmıştır. Yapılan bu çalışmayla literatürde KHDAK hücre hatlarında AMG 510'un kullanılarak RAS/MAPK blokajına rağmen ortaya çıkan direnç mekanizması gösterilmiş ve açıklanmıştır. Bu durumda hastaların tek ajan AMG 510 tedavi öncesi YAP/TAZ ekspresyon seviyelerinin araştırılması önerilmektedir.

6.SONUÇLAR

1. KRAS G12C mutant KHDAK hücre hatlarında AMG 510 aracılığıyla RAS blokajına rağmen YAP/TAZ seviyeleri yükselmektedir.
2. KRAS G12C mutant KHDAK hücre hatlarında AMG 510 aracılığıyla RAS blokajına rağmen fonksiyon gösteremeyen ve sitoplazmada yıkıma uğrayan Fosfo-YAP(Ser127) seviyesi azalmaktadır.
3. KHDAK'larının moleküler hedefli tedavilerinde RAS/MAPK yolağının blokajı tek başına tedavi için yeterli değildir
4. RAS/MAPK yolağının blokajı ile birlikte Hippo yolağının moleküler hedeflendiği tedaviler araştırılmalı ve kullanılmalıdır.
5. YAP molekülü kanser tedavisinde ilaç dirençliliğinden sorumludur.
6. Yapılan bu çalışmayla birlikte AMG 510'un in vitro modellerde KHDAK'lerinde Hippo yolağının direnç mekanizması oluşturduğu gösterilmiştir.
7. Yapılan bu çalışma ve veriler ışığında AMG 510 için in vivo ve klinik çalışmaların yapılmasının gerektiği anlaşılmaktadır.

7. KAYNAKÇA

- A Phase 1/2, Study Evaluating the Safety, Tolerability, PK, and Efficacy of AMG 510 in Subjects With Solid Tumors With a Specific KRAS Mutation (CodeBreak 100) - Full Text View - ClinicalTrials.gov.* (n.d.-a). Retrieved June 4, 2020, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03600883>
- A Phase 1/2, Study Evaluating the Safety, Tolerability, PK, and Efficacy of AMG 510 in Subjects With Solid Tumors With a Specific KRAS Mutation (CodeBreak 100) - Full Text View - ClinicalTrials.gov.* (n.d.-b). Retrieved July 26, 2020, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03600883>
- Ahmad, A. (2016). Lung Cancer and Personalized Medicine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 893, 37–56. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1>
- Beasley, M. B., Brambilla, E., & Travis, W. D. (2005). The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Seminars in Roentgenology*, 40(2), 90–97. <https://doi.org/10.1053/j.ro.2005.01.001>
- Bissell, M. J., & Barcellos-Hoff, M. H. (1987). The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message? *Journal of Cell Science*, 1987(SUPPL. 8), 327–343. https://doi.org/10.1242/jcs.1987.supplement_8.18
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R. P., Chaudhry, S. I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G., & Sahai, E. (2013). Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nature Cell Biology*, 15(6), 637–646. <https://doi.org/10.1038/ncb2756>
- Canon, J., Rex, K., Saiki, A. Y., Mohr, C., Cooke, K., Bagal, D., Gaida, K., Holt, T., Knutson, C. G., Koppada, N., Lanman, B. A., Werner, J., Rapaport, A. S., San Miguel, T., Ortiz, R., Osgood, T., Sun, J. R., Zhu, X., McCarter, J. D., ... Lipford, J. R. (2019). The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*, 575(7781), 217–223. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1694-1>
- Castellano, E., & Downward, J. (2011). Ras interaction with PI3K: More than just another effector pathway. *Genes and Cancer*, 2(3), 261–274. <https://doi.org/10.1177/1947601911408079>
- Cheng, H., Zhang, Z., Rodriguez-Barrueco, R. R., Borczuk, A., Liu, H., Yu, J., Silva, J. M., Cheng, S. K., Perez-Soler, R., & Halmos, B. (2016). Functional genomics screen identifies YAP1 as a key determinant to enhance treatment sensitivity in lung cancer cells. *Oncotarget*, 7(20), 28976–28988. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6721>

- Codelia, V. A., & Irvine, K. D. (2012). Hippo signaling goes long range. *Cell*, *150*(4), 669–670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.020>
- COSMIC Release v84. (n.d.). Retrieved July 17, 2020, from <https://cosmic-blog.sanger.ac.uk/cosmic-release-v84/>
- Costa, F., & Soares, R. (2009). Nicotine: A pro-angiogenic factor. *Life Sciences*, *84*(23–24), 785–790. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.03.002>
- De Koning, H. J., Van Der Aalst, C. M., De Jong, P. A., Scholten, E. T., Nackaerts, K., Heuvelmans, M. A., Lammers, J. W. J., Weenink, C., Yousaf-Khan, U., Horeweg, N., Van'T Westeinde, S., Prokop, M., Mali, W. P., Mohamed Hoesein, F. A. A., Van Ooijen, P. M. A., Aerts, J. G. J. V., Den Bakker, M. A., Thunnissen, E., Verschakelen, J., ... Oudkerk, M. (2020). Reduced lung-cancer mortality with volume CT screening in a randomized trial. *New England Journal of Medicine*, *382*(6), 503–513. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1911793>
- Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019). Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, *94*(8), 1623–1640. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, *474*(7350), 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature10137>
- Ferrer, I., Zugazagoitia, J., Herbertz, S., John, W., Paz-Ares, L., & Schmid-Bindert, G. (2018a). KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*, *124*(January), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.013>
- Ferrer, I., Zugazagoitia, J., Herbertz, S., John, W., Paz-Ares, L., & Schmid-Bindert, G. (2018b). KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*, *124*(July), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.013>
- Forbes, S. A., Beare, D., Bindal, N., Bamford, S., Ward, S., Cole, C. G., Jia, M., Kok, C., Boutselakis, H., De, T., Sondka, Z., Ponting, L., Stefancsik, R., Harsha, B., Tate, J., Dawson, E., Thompson, S., Jubb, H., & Campbell, P. J. (2016). COSMIC: High-Resolution Cancer Genetics Using the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Current Protocols in Human Genetics*, *91*, 10.11.1-10.11.37. <https://doi.org/10.1002/cphg.21>
- Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T. (2017). The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, *170*(4), 605–635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029>
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E. E., Nicholson, A. G., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V., Ball, D., Beer, D. G., Beyruti, R., Detterbeck, F., Edwards, J., Galateau-Sallé, F., Giroux, D., Gleeson, F., Huang, J., ... Yokoi, K. (2016). The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, *11*(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>
- Hamaratoglu, F., Willecke, M., Kango-Singh, M., Nolo, R., Hyun, E., Tao, C., Jafar-Nejad, H., & Halder, G. (2006). The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nature Cell Biology*, *8*(1), 27–36. <https://doi.org/10.1038/ncb1339>

- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*, *129*(7), 1287–1292. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012). Chemical agents and related occupations. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, *100*(Pt F), 9–562.
- Kapoor, A., Yao, W., Ying, H., Hua, S., Liewen, A., Wang, Q., Zhong, Y., Wu, C. J., Sadanandam, A., Hu, B., Chang, Q., Chu, G. C., Al-Khalil, R., Jiang, S., Xia, H., Fletcher-Sananikone, E., Lim, C., Horwitz, G. I., Viale, A., ... Depinho, R. A. (2014). Yap1 activation enables bypass of oncogenic KRAS addiction in pancreatic cancer. *Cell*, *158*(1), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.003>
- Kim, N. G., Koh, E., Chen, X., & Gumbiner, B. M. (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(29), 11930–11935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103345108>
- Kitajima, S., Asahina, H., Chen, T., Guo, S., Quiceno, L. G., Cavanaugh, J. D., Merlino, A. A., Tange, S., Terai, H., Kim, J. W., Wang, X., Zhou, S., Xu, M., Wang, S., Zhu, Z., Thai, T. C., Takahashi, C., Wang, Y., Neve, R., ... Barbie, D. A. (2018). Overcoming Resistance to Dual Innate Immune and MEK Inhibition Downstream of KRAS. *Cancer Cell*, *34*(3), 439-452.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.08.009>
- krishnan, R. (2018). Effects of KRAS Gene Mutations in Gynaecological Malignancies. *Investigations in Gynecology Research & Womens Health (IGRWH)*, *2*(2), 114–117. <https://doi.org/10.31031/igrwh.2018.02.000531>
- Lam, T. K., Gallicchio, L., Boyd, K., Shiels, M., Hammond, E., Tao, G., Chen, L., Robinson, K. A., Caulfield, L. E., Herman, J. G., & Alberg, A. J. (2009). Cruciferous vegetable and lung cancer risk: systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, *18*(1), 184–195. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0710.Cruciferous>
- Lanman, B. A., Allen, J. R., Allen, J. G., Amegadzie, A. K., Ashton, K. S., Booker, S. K., Chen, J. J., Chen, N., Frohn, M. J., Goodman, G., Kopecky, D. J., Liu, L., Lopez, P., Low, J. D., Ma, V., Minatti, A. E., Nguyen, T. T., Nishimura, N., Pickrell, A. J., ... Cee, V. J. (2020). Discovery of a Covalent Inhibitor of KRASG12C (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(1), 52–65. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01180>
- Lau, A. N., Curtis, S. J., Fillmore, C. M., Rowbotham, S. P., Mohseni, M., Wagner, D. E., Beede, A. M., Montoro, D. T., Sinkevicius, K. W., Walton, Z. E., Barrios, J., Weiss, D. J., Camargo, F. D., Wong, K. K., & Kim, C. F. (2014). Tumor-propagating cells and Yap/Taz activity contribute to lung tumor progression and metastasis. *EMBO Journal*, *33*(5), 468–481. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386082>
- Li, Y., Zhou, H., Li, F., Chan, S. W., Lin, Z., Wei, Z., Yang, Z., Guo, F., Lim, C. J., Xing, W., Shen, Y., Hong, W., Long, J., & Zhang, M. (2015). Angiotensin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Research*, *25*(7), 801–817. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.69>
- Lin, L., Sabnis, A. J., Chan, E., Olivas, V., Cade, L., Pazarentzos, E., Asthana, S., Neel, D., Yan, J. J., Lu, X., Pham, L., Wang, M. M., Karachaliou, N., Cao, M. G., Manzano, J. L., Ramirez, J. L., Torres, J. M. S., Buttitta, F., Rudin, C. M., ... Bivona, T. G. (2015). The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted

- cancer therapies. *Nature Genetics*, 47(3), 250–256. <https://doi.org/10.1038/ng.3218>
- Liu, C. Y., Zha, Z. Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., Li, T., Chan, S. W., Lim, C. J., Hong, W., Zhao, S., Xiong, Y., Lei, Q. Y., & Guan, K. L. (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37159–37169. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.152942>
- Liu, P., Wang, Y., & Li, X. (2019). Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(5), 871–879. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.002>
- Ma, S., Meng, Z., Chen, R., & Guan, K.-L. (2019). The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annual Review of Biochemistry*, 88(1), 577–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111829>
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *European Respiratory Journal*, 48(3), 889–902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>
- Martin-Belmonte, F., & Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 12(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/nrc3169>
- McCartney, B. M., Kulikauskas, R. M., LaJeunesse, D. R., & Fehon, R. G. (2000). The Neurofibromatosis-2 homologue, Merlin, and the tumor suppressor expanded function together in *Drosophila* to regulate cell proliferation and differentiation. *Development*, 127(6), 1315–1324.
- Nguyen, C. D. K., & Yi, C. (2019). YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Trends in Cancer*, 5(5), 283–296. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.02.010>
- Noguchi, S., Saito, A., Horie, M., Mikami, Y., Suzuki, H. I., Morishita, Y., Ohshima, M., Abiko, Y., Mattsson, J. S. ofi. M., König, H., Lohr, M., Edlund, K., Botling, J., Micke, P., & Nagase, T. (2014). An integrative analysis of the tumorigenic role of TAZ in human non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(17), 4660–4672. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3328>
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*, 19(4), 491–505. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.011>
- Proctor, R. N. (2002). Tobacco and the global epidemic of lung cancer. *Casopis Lékarů Českých*, 141(18), 567–570.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, 11(11), 761–774. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>
- Rami-Porta, R., Call, S., Dooms, C., Obiols, C., Sánchez, M., Travis, W. D., & Vollmer, I. (2018). Lung cancer staging: A concise update. *European Respiratory Journal*, 51(5), 1–17. <https://doi.org/10.1183/13993003.00190-2018>
- Reckamp, K. L. (2016). Lung cancer: Treatment and Research. In *Springer* (Vol. 170). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)82038-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)82038-3)
- Release, P. (2018). International agency for research on cancer. *Asian Pacific Journal*

of *Cancer Prevention*, 4(1), 3–4.

- Roberts, P. J., & Der, C. J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, 26(22), 3291–3310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>
- Ryan, M. B., & Corcoran, R. B. (2018). Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(11), 709–720. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0105-0>
- Sağlık Bakanlığı. (2015). Türkiye Kanser İstatistikleri 2015. *T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Müdürlüğü*, 1–48. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., Dimitriadou, S., Liu, D. L., Kantheti, H. S., Saghafinia, S., Chakravarty, D., Daian, F., Gao, Q., Bailey, M. H., Liang, W. W., Foltz, S. M., Shmulevich, I., Ding, L., Heins, Z., ... Schultz, N. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*, 173(2), 321–337.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>
- Scheffler, M., Ihle, M. A., Hein, R., Merkelbach-Bruse, S., Scheel, A. H., Siemanowski, J., Brägelmann, J., Kron, A., Abedpour, N., Ueckerth, F., Schüller, M., Koleczko, S., Michels, S., Fassunke, J., Pasternack, H., Heydt, C., Serke, M., Fischer, R., Schulte, W., ... Wolf, J. (2019). K-ras Mutation Subtypes in NSCLC and Associated Co-occurring Mutations in Other Oncogenic Pathways. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(4), 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.013>
- Shao, D. D., Xue, W., Krall, E. B., Bhutkar, A., Piccioni, F., Wang, X., Schinzel, A. C., Sood, S., Rosenbluh, J., Kim, J. W., Zwang, Y., Roberts, T. M., Root, D. E., Jacks, T., & Hahn, W. C. (2014). KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival. *Cell*, 158(1), 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.004>
- Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.009>
- Stellmann, S. D., Muscat, J. E., Thompson, S., Hoffmann, D., & Wynder, E. L. (1998). Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking. *Pneumologie*, 52(3), 180.
- The Discovery Of Amgens Novel Investigational KRASG12C Inhibitor AMG 510 Published In Nature.* (n.d.). Retrieved July 20, 2020, from <https://www.amgen.com/media/news-releases/2019/10/the-discovery-of-amgens-novel-investigational-krasg12c-inhibitor-amg-510-published-in-nature/>
- Thun, M., Peto, R., Boreham, J., & Lopez, A. D. (2012). Stages of the cigarette epidemic on entering its second century. *Tobacco Control*, 21(2), 96–101. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2011-050294>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung

- Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1243–1260. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>
- Wood, K., Hensing, T., Malik, R., & Salgia, R. (2016). Prognostic and predictive value in KRAS in non-small-cell lung cancer. *JAMA Oncology*, 2(6), 805–812. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0405>
- Yaeger, R., & Corcoran, R. B. (2019). Targeting alterations in the RAF–MEK pathway. *Cancer Discovery*, 9(3), 329–341. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1321>
- Yang, H., Liang, S. Q., Schmid, R. A., & Peng, R. W. (2019). New horizons in KRAS-mutant lung cancer: Dawn after darkness. *Frontiers in Oncology*, 9(SEP), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00953>
- Yu, F. X., & Guan, K. L. (2013). The Hippo pathway: Regulators and regulations. *Genes and Development*, 27(4), 355–371. <https://doi.org/10.1101/gad.210773.112>
- Yu, F. X., Zhao, B., & Guan, K. L. (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*, 163(4), 811–828. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>
- Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W. M., & Pan, D. (2010). Kibra Functions as a Tumor Suppressor Protein that Regulates Hippo Signaling in Conjunction with Merlin and Expanded. *Developmental Cell*, 18(2), 288–299. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.012>
- Zanconato, F., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*, 29(6), 783–803. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.005>
- Zhang, W., Gao, Y., Li, F., Tong, X., Ren, Y., Han, X., Yao, S., Long, F., Yang, Z., Fan, H., Zhang, L., & Ji, H. (2015). YAP promotes malignant progression of Lkb1-deficient lung adenocarcinoma through downstream regulation of survivin. *Cancer Research*, 75(21), 4450–4457. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3396>
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z. C., & Guan, K. L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes and Development*, 21(21), 2747–2761. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>
- Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 447–468. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>
- Zhou, Z., Hao, Y., Liu, N., Raptis, L., Tsao, M. S., & Yang, X. (2011). TAZ is a novel oncogene in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 30(18), 2181–2186. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.606>

8.ÖZGEÇMİŞ

Ali Can Koç 1995 yılında Sivas'ta doğdu. İlkokul ve ortaokul eğitimlerinin Darıca Faik Şahenk İlköğretim okulunda aldı. Lise eğitimini İstanbul'da Göztepe İhsan Kurşunoğlu Anadolu Lisesinde tamamladı. 2013-2015 yılları arasında Uşak Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisans eğitimini tamamladı.