

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

**nNav1.5 SODYUM KANALI VE NOÇ-4 RESEPTÖR SİNYALİNİN
BASKILANMASININ İNSAN MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE ÇOĞALMA VE METASTATİK POTANSİYEL
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Bio. Canan ÇAKIR AKTAŞ

**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2013

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

**nNav1.5 SODYUM KANALI VE NOÇ-4 RESEPTÖR SİNYALİNİN
BASKILANMASININ İNSAN MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDE ÇOĞALMA VE METASTATİK POTANSİYEL
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Bio. Canan ÇAKIR AKTAŞ






**Biyokimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. A. Kevser ÖZDEN**

**ANKARA
2013**


Anabilim Dalı :Tıbbi Biyokimya
 Program :Biyokimya
 Tez Başlığı :nNav1.5 Sodyum Kanalı ve Noç-4 Reseptör Sinyalinin
 Baskılanmasının İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Çoğalma ve
 Metastatik Potansiyel Üzerine Etkisinin İncelenmesi
 Öğrenci Adı-Soyadı :Canan ÇAKIR AKTAŞ
 Savunma Sınavı Tarihi :10.09.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç.Dr.Günnur DİKMEN 
 (Hacettepe Üniversitesi)
 Tez danışmanı: Prof.Dr.A. Kevser ÖZDEN 
 (Hacettepe Üniversitesi)
 Üye: Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN 
 (Gazi Üniversitesi)
 Üye: Doç.Dr. Ayşe ERCAN 
 (Hacettepe Üniversitesi)
 Üye: Yrd.Doç.Dr. Gülnihal KULAKSIZ 
 ERKMEN
 (Hacettepe Üniversitesi)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


 Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan, eğitimim süresince beni cesaretlendiren, ilgi ve desteğini esirgemeyen, değerli danışmanım Sayın Prof.Dr. A. Kevser ÖZDEN'e teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Hücre kültürü çalışmalarımnda bana her konuda destek olan sevgili hocam Doç.Dr. Dilara ZEYBEK'e,

Çalışmada kullanılan hücreleri bağışlayan Doç.Dr. A. Lale DOĞAN'a

Çalışmamızın istatistiksel değerlendirmelerini yapan Arş.Gör. Duygu AYDIN'a

Gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesi çalışmalarına verdikleri teknik destekten dolayı ATQ firmasına,

Çalışmam esnasında çeşitli konularda bana yardımcı olan sevgili hocalarım Doç. Dr. Ebru BODUR, Dr. Esra BÜBER, Prof.Dr. Mustafa DJAMGOZ ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan, bana olan inançlarını asla yitirmeyen sevgili annem, babam, kardeşlerim ve eşime sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Çakır-Aktaş, C. nNav1.5 Sodyum Kanalı Ve Noç-4 Reseptör Sinyalinin Baskılanmasının İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Çoğalma Ve Metastatik Potansiyel Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2013.

Meme kanserinin görülme sıklığı gittikçe artmakta olup başlıca ölüm sebepleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Meme hücrelerinin kansere dönüşmesinin altında yatan ve özellikle metastaz yapmalarına yol açan moleküler değişimler yoğun biçimde araştırılmaktadır. Sodyum kanallarının neonatal formu Nav1.5 ve Noç-4 reseptörünün gen ifadelerindeki aşırı artış bu değişimler arasında yer almaktadır. Bu tezin amacı yüksek metastatik potansiyele sahip olan MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde bu iki molekülün baskılanmasının, hücre çoğalması ve metastazı üzerindeki etkilerinin ve birbirleri ile olan etkinliğinin incelenmesidir.

Bu amaçla, sodyum iyon kanalı, antikonvülzan bir ilaç olan fenitoinle, Noç-4 reseptörü ise gama-sekretaz inhibitörü N-[N-(3,5-Difluorofenilasetil)-L-alanil]-S-fenilglisin t-bütül ester (DAPT) ile baskılanmıştır. Farklı dozlarda uygulanan inhibitörlerin nNav1.5 iyon kanalı ve Noç-4 reseptörü gen ifadelerine etkileri zamana bağlı olarak eş zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (RT-PCR) ile incelenmiştir. Metastatik özellikler ise jelatin zimografi ve yara çizik yayılma testi ile incelenmiştir. Metastatik özelliklerden MMP-9/TIMP-1 oranının değişimi de RT-PCR ile belirlenmiştir.

Noç reseptör sinyal yolağı ve sodyum iyon kanalının inhibe edilmeleri sonucunda hücre göçü, MMP-9 protein ifadesi ve MMP-9/TIMP-1 oranı anlamlı şekilde azalmıştır. Ayrıca, DAPT'ın her iki molekülü de inhibe ettiği, DAPT ve fenitoinin birlikte kullanılmasının hücrelerde MMP-9/TIMP-1 oranını azalttığı ve buna bağlı olarak kanser hücrelerinin invazif özelliğini zayıflattığı saptandı. Bu bulgulara dayanarak nNav1.5 iyon kanalı ve Noç-4 reseptörü arasında etkileşim olduğunu ve bu iki molekülün meme kanserinde anti-metastatik hedefler olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Noç-4 reseptörü, nNav1.5 iyon kanalı, fenitoin, DAPT, metastaz.

ABSTRACT

Cakir-Aktas, C. Analysis Of Antiproliferative And Antimetastatic Effects Of nNav 1.5 Sodium Channel And Notch-4 Receptor Signal Suppression in Human Mammary Cell Lines. Hacettepe University Institute of Health Sciences Biochemistry Program, Master of Science Thesis, Ankara, 2013.

The incidence of breast cancer is rapidly increasing and it is one of the major causes of death. The molecular changes leading to malignant transformation and metastasis of mammary cells is studied intensively. The expression of neonatal form of sodium channel nNav1.5 and overexpression of Notch-4 receptor is one these molecular changes. The aim of this thesis is to investigate the effect of the inhibition of these two molecules on the proliferation and metastatic behaviour of highly metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cell as well as the interaction between these molecular systems. For this purpose, sodium ion channel was inhibited phenytoin by an anticonvulsive agent and the Notch-4 receptor was inhibited N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) by gamma secretase inhibitor. The dose dependent effects of these inhibitors were detected by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Metastatic properties were analysed by gelatin zymography and wound healing methods. Furthermore, another metastatic property, MMP-9/TIMP-1 ratio was followed by RT-PCR.

Resulted in inhibition of Notch receptor signalling and sodium ion channel, cell motility, MMP-9 protein expression and MMP-9/TIMP-1 proportion decreased significantly. On the other hand, DAPT inhibits both molecules and when used in combination with phenytoin decreases MMP-9/TIMP-1 ratio significantly reducing the metastatic power of cancer cells. Thus, an interaction exists between nNav1.5 and Notch-4 receptor and both of these molecules may be considered as targets for anti-metastatic therapy.

Key words: Breast cancer, Notch-4 receptor, nNav1.5 ion channel, phenytoin, DAPT, metastasis.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Meme Kanseri ve Metastaz	2
2.1.1. Voltaj Kapılı Sodyum İyon Kanalları	3
2.1.2. Voltaj Kapılı Sodyum Kanallarının Yapısı ve İşlevi	4
2.1.3. Çeşitli Hastalıklarda ve Meme Kanserinde VGSC Gen İfadesi	5
2.1.4. Metastatik Meme Kanserinde Neonatal Nav1.5 İfadesi	6
2.1.5. Meme Kanseri Hücrelerinin Sodyum İçeriğinin Hücre Davranışı Üzerindeki Etkisi	9
2.2. Noç Sinyal Yolağı	10
2.2.1. Noç Reseptör ve Ligandlarının Yapısı, Aktivasyonu ve İşlevi	10
2.2.2. Noç Sinyal Yolağının Kansere İlişkisi	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Gereçler	17
3.2. Yöntemler	17
3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Ekimi	18
3.2.2. Tripsinizasyon ve Pasajlama	18
3.2.3. Hücrelerin Dondurulması	19
3.2.4. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Sayısının İkiye Katlanma Süresinin Belirlenmesi	19
3.2.5. WST-1 Yöntemiyle Sitotoksikite Çalışmaları	20

3.2.6. Gama Sekretaz İnhibitörü DAPT ve VGSC İnhibitörü Fenitoin İle Sitotoksisite Çalışması	21
3.2.7. Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Tepkimesi İle Hücrelerde Gen İfadesinin Belirlenmesi	21
3.2.7.1. RNA İzolasyonu	21
3.2.7.2. cDNA Sentezi	22
3.2.8. Eş Zamanlı PCR Tepkimesi	23
3.2.9. Jelatin Zimografi	26
3.2.10. Çizik Kapama Yöntemiyle Hücre Göç Etme Potansiyelini Ölçme Testi	28
3.3. İstatistiksel Analizler	28
4. BULGULAR	29
4.1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Sayısının İkiye Katlanma Süresinin Belirlenmesi	29
4.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Sitotoksisite Çalışmaları	30
4.3. Çizik Kapama Yöntemiyle Hücre Göç Etme Potansiyelini Ölçme Testi	32
4.4. MDA-MB-231 Hücrelerinde Gen İfadesi Değişiklikleri	35
4.5. Jelatin Zimografi Analizleri	43
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAM	Bir disintegrasyon ve bir metalloproteaz
Aph-1	<i>anterior pharynx-defective 1</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Sığır serum albümini)
Ca ⁺⁺	Kalsiyum iyonu
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CADASIL	Subkortikal enfarktlar ve lökoensefalopati ile serebral otozomal dominant arteriopati
CaMK	Ca ⁺⁺ /kalmodülin bağımlı protein kinaz
CBF-1	<i>human C promoter Binding Factor</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribo nucleic acid</i>
COOH	Karboksilik asit
Cys	Sistein
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorofenilasetil)-L-alanil]-S-fenilglisin t-bütül ester
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSL	Delta, Serrate, LAG-2 ailesi
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ER	Endoplazmik retikulum
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
H ⁺	Hidrojen iyonu
Hes	<i>Hairy and enhancer of split</i>
HRT	<i>Hairy related transcription factor</i>
KDa	Kilo dalton
MAML	Mastermind-benzeri
MAPK	Mitojen ile aktive protein kinaz
MCF	Michigan Cancer Foundation-7
MDA-MB	M.D. Anderson - Metastatic Breast
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	Haberci ribonükleik asit

MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
Na ⁺	Sodyum iyonu
NaCl	Sodyum klorür
Nav	Sodyum kanalı
NFκB	Nükleer faktör κB
NICD	Noç hücre içi bölüm
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi)
PC-3	<i>Prohormone convertase 3</i>
Pen-2	<i>Presenilin enhancer 2</i>
PEST	Prolin, glutamat, serin, treonin
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
RAM	<i>Recombination binding protein associated protein</i>
RBP-J	Rekombinasyon tanıma dizisine bağlanan protein (<i>Recombination-signal binding protein 1 for J-Kappa</i>).
RLT	RNeasy lizis tamponu
Rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Dakikadaki devir sayısı)
RT-PCR	<i>Real time-polymerase chain reaction</i> (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)
RW1	RNeasy yıkama tamponu
SCNA	Sodyum kanalı alfa birimi geni
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
TAD	Transaktivasyon bölgesi
TGF β	Doku büyüme faktörü β
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinaz</i> (Metalloproteinazların doku inhibitörü)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VGNC	Voltaj kapılı sodyum kanalı
VGSC-α	Voltaj kapılı sodyum kanalı alfa alt birimi
VGSC-β	Voltaj kapılı sodyum kanalı beta alt birimi

WST-1 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disülfonat

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Kanser hücrelerinde metastatik sürecin şematik gösterimi	2
Şekil 2.2. Voltaj kapılı sodyum kanallarının yapısı	4
Şekil 2.3. Nav1.5 gen ve proteinindeki alternatif kırılma bölgesi	7
Şekil 2.4. Sodyum iyon kanalının neonatal formundaki yedi amino asitlik değişimin şematik gösterimi	8
Şekil 2.5. Noç reseptör ve ligandlarının yapısı	11
Şekil 2.6. Noç sinyal yolağının çalışması	13
Şekil 3.1. Deney tasarımının şematik gösterimi	18
Şekil 4.1. MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalma eğrisi	29
Şekil 4.2. DAPT, fenitoin ve DAPT-fenitoin kombinasyonunun 0-500 μ M doz aralığında ve 24 saatlik inkübasyonu sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi	30
Şekil 4.3. DAPT ve fenitoinin 0-500 μ M doz aralığında ve 48 saatlik inkübasyon sonucu MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi	31
Şekil 4.4. DAPT ve fenitoinin 0-500 μ M doz aralığında ve 72 saatlik inkübasyon sonucu MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi	31
Şekil 4.8. Yara oluşturulmuş yüzeyde MDA-MB-231 hücrelerinin fenitoin, DAPT ve bu inhibitörlerin her ikisi ile birlikte (7, 70, 700 μ M) 24 saat inkübasyonu sonucu hücre göçü oranları	35
Şekil 4.9. 24 saatlik DAPT ve fenitoin uygulaması sonucu A. Noç-4, nNav1.5 ve B. MMP-9, TIMP-1 gen ifadelerindeki değişiklikler.	36
Şekil 4.10. 48 saatlik DAPT ve fenitoin uygulaması sonucu A. Noç-4, nNav1.5 ve B. MMP-9, TIMP-1 gen ifadelerindeki değişiklikler.	38
Şekil 4.11. 72 saatlik DAPT ve fenitoin uygulaması sonucu A. Noç-4, nNav1.5 ve B. MMP-9, TIMP-1 gen ifadelerindeki değişiklikler	40
Şekil 4.12. 24, 48 ve 72 saat DAPT ve fenitoin uygulamasından sonra MMP-9 ve TIMP-1 gen ifadelerinin katlı değişim oranları.	41
Şekil 4.13. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 24 saat inkübasyonu sonucu A.MMP-9'un jelatin zimografi ile görüntülenmesi. B. Bantların yoğunluk analizleri (%)	44

- Şekil 4.14. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 24 saat inkübasyonu sonucu A. MMP-9'un jelatin zimografi ile görüntülenmesi. B. Bantların yoğunluk analizleri (%) 45
- Şekil 4.15. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 48 saat inkübasyonu sonucu A. MMP-9'un jelatin zimografi ile görüntülenmesi. B. Bantların yoğunluk analizleri (%) 46
- Şekil 4.16. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 48 saat inkübasyonu sonucu A. MMP-9'un jelatin zimografi ile görüntülenmesi. B. Bantların yoğunluk analizleri (%) 47
- Şekil 4.17. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 72 saat inkübasyonu sonucu A. MMP-9'un jelatin zimografi ile görüntülenmesi.: B. Bantların yoğunluk analizleri (%) 48

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Noç sinyalindeki bozuklukların neden olduğu hastalıklar (84)	14
Tablo 3.1. Genomik DNA eliminasyon karışımı ve RT kokteyli	22
Tablo 3.2. nNav1.5, Noç-4, MMP-9, TIMP-1 ve GAPDH genleri için kullanılan primerler	24
Tablo 3.3. Bir reaksiyon için qPCR bileşenlerinin miktarı	25
Tablo 3. 4. MMP-9, TIMP-1, Noç-4 ve GAPDH primerleri için uygun döngü koşulları	25
Tablo 3.5. Bir reaksiyon için nNav1.5 primerine ait qPCR karışımı	26
Tablo 3. 6. nNav1.5 primeri için uygun döngü koşulları	26
Tablo. 3.7. Jelatin zimografi jellerinin hazırlanışı	27
Tablo 4.1. Fenitoin ve DAPT ile 24 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen gen ifadesi değişikliklerinin tanımlayıcı istatistikleri.	42
Tablo 4.2. Fenitoin ve DAPT ile 48 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen gen ifadesi değişikliklerinin tanımlayıcı istatistikleri	42
Tablo 4.3. Fenitoin ve DAPT ile 72 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen gen ifadesi değişikliklerinin tanımlayıcı istatistikleri	43

1. GİRİŞ ve AMAC

Dünyada ölümlerin önde gelen sebepleri arasında olan kanser, toplum sağlığının temel problemi olarak görülmektedir. Hastalığın erken tanısı mortaliteyi önemli oranda azaltsa bile, hastalığın ilerlemesi durumunda tedavi yöntemleri çoğu kez yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle hastalığın ortaya çıkışı ve gelişimini takip etmek açısından moleküler mekanizmasının iyi bilinmesi önem taşımaktadır (1).

Bu araştırmada, metastatik insan meme kanseri hücrelerinde gen ifadeleri artan nNav1.5 sodyum kanalları ve Noç-4 reseptörünün metastaz ile ilişkili olaylarda rol aldıkları yönündeki bulgulara dayanarak, bu iki hücre bileşeninin birbirinden ayrı ve birlikte, hücre çoğalmasını ve hücre göçünü ne yönde etkilediğini anlamak ve iki sistemin birbirine bağımlılığını incelemek amaçlanmaktadır.

İyon kanallarının metastatik kaskadla ilişkili çeşitli hücrel aktiviteyi kontrol ettiği çok iyi bilinmektedir (2). Özellikle, voltaj kapılı sodyum kanallarının metastatik potansiyelle yakından ilişkili olduğu açıktır. Metastatik kaskadı kontrol eden çeşitli basamaklardaki rolü ve bazı saldırgan karsinomlarda gen ifadelerinin artması bunu doğrulamaktadır (3). Özetle, voltaj kapılı sodyum kanalları metastatik potansiyelin saptanması ve ilerlemesinin bloke edilmesi için yeni bir hedef haline gelmektedir (4).

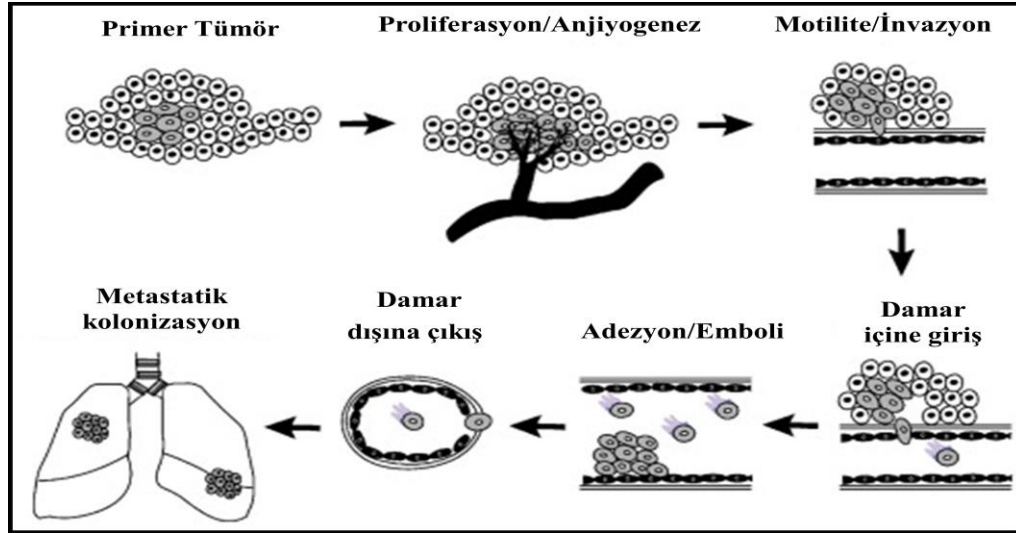
Noç sinyal sistemi ise embriyonik dönemde tüm dokuların gelişimi ile ilgili olayları yönlendirmekte ve erişkin vücudunda da bazı dokularda bulunmaktadır. Komşu hücrelerin yüzey molekülleri aracılığıyla etkileşmesi ile çalışan Noç sinyal sisteminin kanser oluşumu ve gelişimi ile ilişkisi araştırılmaktadır. İnsanda bulunan dört tip Noç reseptöründen (Noç 1-4) birisi olan Noç-4, meme gelişiminde rol oynamakta ve meme kök hücrelerinde ifade edilmektedir. Bu nedenle, meme kanseri ile ilişkisi araştırılmakta ve tedavi hedefi olabilirliği irdelenmektedir.

Çalışmamız kapsamında insan kaynaklı metastatik meme kanseri hücrelerinin (MDA-MB-231) kültürü yapıp, kültürdeki hücrelerin sodyum iyon kanalı fenitoin ile, Noç-4 reseptörü ise gama sekretaz inhibitörü N-[N-(3,5-Difluorofenilasetil)-L-alanil]-S-fenilglisin t-bütül ester (DAPT) ile inhibe edilmiştir. Bu iki molekülün ayrı ayrı ve birlikte inhibe edilmelerinin hücrelerin metastatik özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri ve Metastaz

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir (5). Gen ifade seviyesinin bozulmasına neden olan epigenetik değişiklikler ve tümör baskılayıcı genler ya da proto-onkogenlerdeki mutasyonlar gibi heterojenik genetik değişimlerin birikimi primer tümör oluşumuna neden olmaktadır (6). Kansere bağlı ölümlerin ise % 90'ı metastaz nedenlidir (7). Kanser hücrelerinin birincil tümörden yayılarak ikincil tümör oluşturması metastaz olarak bilinmektedir. Metastaz son derece karmaşık bir süreçtir (Şekil 2. 1).



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinde metastatik sürecin şematik gösterimi

Furuta ve diğ.(8)'nden alınmıştır.

Bu süreçte;

- Kanser hücreleri birbirinden ayrılır ve hücre dışı matriksten çıkar.
- Lokal dokular arasından göç eder ve bazal membrana tutunur.
- Kan veya lenf dolaşımına girer.
- Kan veya lenf damarından çevre dokulara sıvı çıkışı ile tümör hücresi uzak bir bölgeye yeniden tutunur.
- Damar oluşumunun indüklenmesi ve hücre çoğalmasından sonra ikincil tümörler oluşur.

Metastaz sürecinde bu basamaklardan birinin bile tamamlanamaması metastazı engellemektedir (9,10). Birincil tümör oluşumu ve metastaz farklı moleküler ve hücrel faktörler tarafından kontrol edilir. Yapılan çalışmalarda, bu moleküllerden voltaja duyarlı sodyum kanallarının (VGNC) neonatal Nav1.5 izoformu (11) ve Noç-4 (12) reseptörünün metastatik insan meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231) mRNA ifadelerinin arttığı gözlenmiştir.

2.1.1. Voltaj Kapılı Sodyum İyon Kanalları

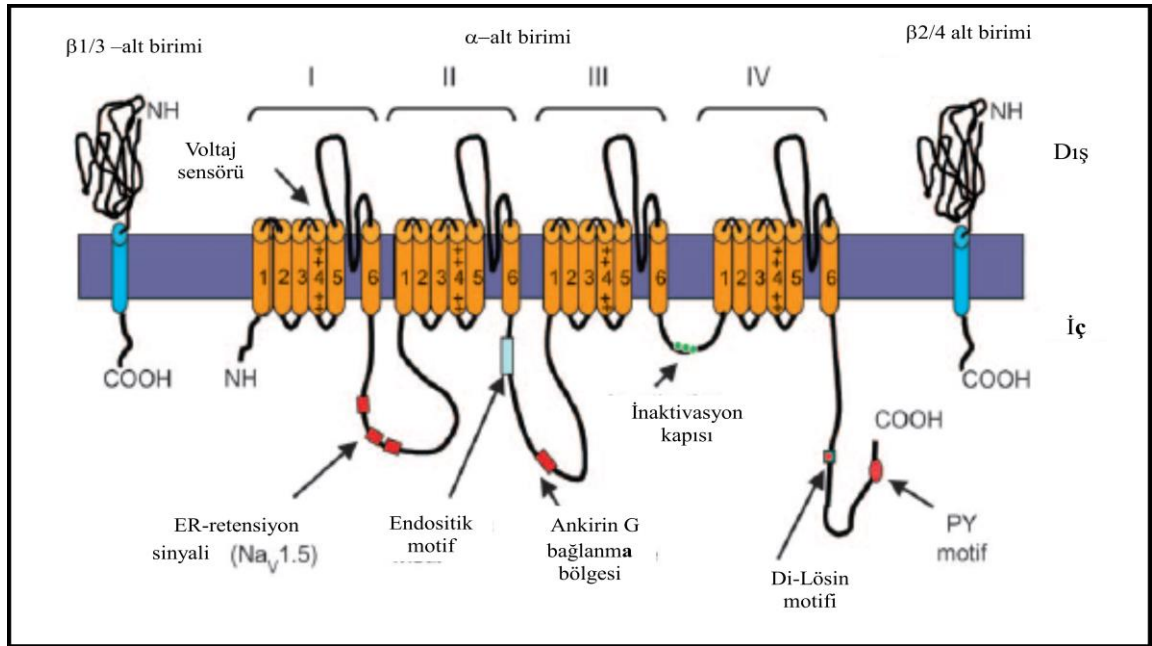
Canlı bütün hücreler zar potansiyeli adı verilen, hücre zarının iç ve dış yüzeyleri arasında farklı bir elektriksel potansiyele sahiptir. Zar potansiyeli genellikle iyon kanallarının aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Bu kanallar zar lipitleri, hücre içi ve hücre dışı pH, mekanik stres, zar voltajı ve elektrokimyasal iyon gradiyenti gibi farklı parametrelere bağlı olarak iyonların hücre zarından geçişine izin veren, zarı kateden proteinlerdir. Ayrıca hücrel iyon dengesinin düzenlenmesinde de önemli bir role sahiptir. Şimdiye kadar yüzlerce kanal belirlenmiştir. Elektriksel uyarıların üretiminden sorumlu olan bu kanallar, ligand kapılı iyon kanalları ve voltaja duyarlı iyon kanalları olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Bunlardan, VGNC ilk olarak 1995 yılında sıçan prostat kanseri hücre hattında tespit edilmiştir (13).

VGNC'ler nöron ve kas hücreleri gibi temelde uyarılabilir hücrelerde aksiyon potansiyelinin üretiminden sorumlu proteinlerdir (14). Zar depolarizasyonu sırasında hücre içine hızlıca Na^+ iyonlarının geçişine aracılık ederek, nöronlarda ve kas/nöroendokrin hücreleri gibi uyarılabilen hücrelerde aksiyon potansiyelinin üretimini ve yayılımını sağlarlar. Ayrıca işlevsel VGSC'ler glia, lenfosit, osteoblast, fibroblast ve endotel hücreleri gibi uyarılamayan hücrelerde de bulunmaktadır (15).

Voltaj kapılı sodyum kanallarının kuvvetlendirdiği hücrel davranışlar; invazyon (16,17), matrijelde koloni oluşturma (3), hücre morfolojisi ve süreç uzunluğu (18), galvanotaksis (19,20), yana hareket (21), çapraz göç (17,22), adezyon (23), gen ifadesi (24) endositik zar aktivitesi (25), damar oluşumu (26) ve nitrik oksit üretimidir (27).

2.1.2. Voltaj Kapılı Sodyum Kanallarının Yapısı ve İşlevi

Kanalın por oluşturan kısmı, dört adet homolog alt birimden oluşmaktadır (D1-D4). Bu alt birimlerin her biri, altı adet zarı kateden segmente sahiptir (S1-S6). Bu heterodimerik zar proteinleri genellikle por oluşturan bir α -alt birimi ve bununla etkileşim içerisinde bulunan bir ya da daha fazla yardımcı β -alt birimlerinden oluşur (Şekil 2.2) (28).



Şekil 2.2. Voltaj kapılı sodyum kanallarının yapısı
Sato ve diğ.(28)'den alınmıştır.

Memelilerdeki VGSC α gen ailesi en az 9 işlevsel üyeden oluşmaktadır (Nav1.1-Nav1.9, SCN1A-SCN11A genleri tarafından kodlanırlar). Yüksek omurgalı canlılarda 4 tane VGSC β (β 1- β 4 SCN1-4B tarafından kodlanır; 22-36 kDa) tanımlanmış ve çok fonksiyonlu oldukları gösterilmiştir (29).

Sodyum iyon kanalının α -alt birimi tek başına işlevseldir ve iyon seçici kanal oluşturma yeteneğine sahiptir. Memelilerde on adet α -alt birimi geni tespit edilmiştir; bu genlerin her biri farklı gen ifadesi profiline sahiptir. Bu genlerin ürünü olan proteinler ise farklı açılıp-kapanma özelliklerine sahiptir. Alfa-alt birimi, dört homolog kısımdan (I-IV) oluşan bir polipeptit zinciridir. Bu zincirler zarı, α -sarmal yapısı ile altı kere katederler (S1-S6) (30).

Sodyum kanallarının farklı dokularda farklı işlevlere sahip olmasının nedeni, VGSC α 'nın en az 10 farklı genden oluşan bir aile tarafından kodlanması ve alternatif kırılma (*splicing*) sonucunda çok sayıda VGSC α geninin izoformlarının oluşmasından kaynaklanmaktadır (15).

Sodyum kanallarının ise, şimdiye kadar 4 tane β -alt birimi tanımlanmıştır. (β 1- β 4; SCN1B-SCN4B). Bunlardan β 1 ve β 3 alt birimleri ile kovalent olmayan etkileşimlerle, β 2 ve β 4 alt birimleri ile disülfid bağlarla etkileşim içerisindedir. β alt birimleri, α alt birimlerinin plazma zarına yerleşmesini ve kanalın diğer sinyal proteinleri ile etkileşime girmesine olanak tanır (31,32).

β 1 ayrıca hücre içi mekanizmaları da etkileyebilir. Örneğin, β 'nin sitoplazmik kısmındaki bir bölge ile tirozin fosfataz B reseptörü etkileşime girmektedir (33). Bu fonksiyonel rollerin en azından bir kısmı α alt biriminden bağımsız olabilir. Aslında, α 'dan bağımsız olarak β alt birimi fonksiyonunun eşit ölçüde önemli olabileceği öngörülmektedir (34). VGSC β 1'in insan meme kanserinde bir hücre adezyon molekülü olarak işlev gördüğü ileri sürülmüştür (35). Beta alt birimleri ile etkileşim, glikozilasyon, fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar ve mRNA'nın alternatif kırılması ile işlevsel çeşitlilik sağlanır. Beta alt birimleri doğrudan olgun VGSC α aktivitesini düzenler ve VGSC α 'nın hücre yüzeyi kararlılığını ve hücre içi trafiğini arttırarak plazma zarındaki işlevsel kanal yoğunluğunu arttırır (36).

2.1.3. Çeşitli Hastalıklarda ve Meme Kanserinde VGSC Gen İfadesi

Çeşitli hücrel olaylarda gerekli olan iyon kanalları, birçok dokuda ifade edilen sinyal kompleksleridir. Yapılan çalışmalar iyon kanallarının kanser gibi birçok patofizyolojik koşulla ilişkili olduğunu göstermiştir. Özellikle, potasyum, klor, sodyum iyonlarına geçirgen olan voltaj kapılı iyon kanallarına ait gen ifadeleri çoğu kanser hücresinde önemli oranda artmaktadır (37).

Meme kanseri (38,17,39), prostat kanseri (40,41,42), lenfoma (43), küçük hücreli akciğer kanseri (44,45,46), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (47) mezotelyoma (48), nöroblastom (49), melanom (50) ve serviks kanseri de (51) dahil olmak üzere bir dizi insan karsinomunda hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda VGSC'lerin yaygın olarak ifade edildiği rapor edilmiştir. Fakat Nav'ın izoformları

birincil tümörlerin doku orjinlerine bağlı olarak ifade edilmektedir; Nav1.5 meme kanserinde bulunurken, Nav1.7 prostat kanserinde bulunan ana izoformdur. Hem prostat hem de meme kanserinde ifade edilen Nav izoformları ise daima neonatal kırılmış varyantıdır (52).

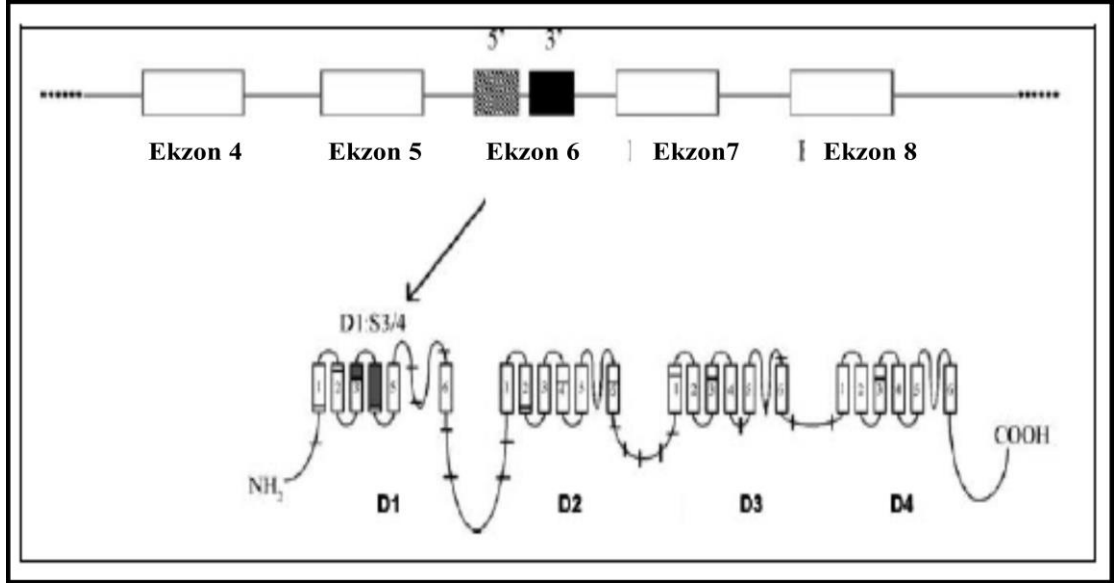
Ayrıca, insan meme kanseri hücre hatlarında VGSC β 'ların da (β 1, β 2 ve β 4) gen ifadeleri artmaktadır. Bunlardan β 1'in mRNA ve protein seviyelerinin güçlü metastatik MDA-MB-231 hücreleri ile karşılaştırıldığında zayıf metastatik MCF-7 hücre hattında daha yüksek olduğu gösterilmiştir. (Bu durum MCF-7 hücrelerinin daha yüksek adeziv özellik taşıması ile tutarlıdır) (53).

Dahası, MDA-MB-231 hücrelerinde β 'nın aşırı ifade edilmesiyle birlikte, VGSC yoluyla hücre içine sodyum iyonu girişi artarken, hücre göçü azalmaktadır. Bu da β 1'in hücre adeziv etkisinin hücresel uyarılmadaki değişikliklerden bağımsız olabileceğini göstermektedir. Bu durum VGSC β 'ların, VGSC α 'ların iyon iletiminden bağımsız hücre adezyon molekülü olarak fonksiyon görebildiğini desteklemektedir (35).

Diğer yandan, insan prostat kanseri hücrelerinde VGSC β mRNA'ları zayıf metastatik LNCaP hücrelerine göre, güçlü metastatik PC-3 hücre hattında yüksek oranda ifade edilmektedir. Bu durum VGSC β 'ların farklı hücrelerde farklı işlevlere sahip olabildiğini göstermektedir. Örneğin, VGSC β aktivitesindeki artış adezyonu arttırabilir, fakat artan işlevsel VGSC gen ifadesi metastatik potansiyel üzerinde zıt etki gösterebilir (54,55).

2.1.4. Metastatik Meme Kanserinde Neonatal Nav1.5 İfadesi

Moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalarda metastatik insan meme kanseri hücre ve dokularında VGSC α 'nın Nav1.5 izoformunun 6. ekzonunun birinci bölgesinde 3. segment ile 4. segment arasındaki (D1:S3) kırılma sonucu oluşan neonatal varyantının baskın olduğu tanımlanmıştır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Nav1.5 gen ve proteinindeki alternatif kırılma bölgesi Chioni ve diğ.(56)'den alınmıştır.

Kanser hücrelerinde VGSC gen ifadesinin önemi, gelişimsel olarak düzenlenen embriyonik/neonatal kırılmış varyantları olarak ifade edilmeleridir (56). Bu durum nöroblastom (57) ve meme kanserinde Nav1.5 (38), prostat kanserinde Nav1.7'nin gen ifadesi için gösterilmiştir (29). Kanser hücrelerinde VGSC'lerin embriyonik formlarının oluşumu, genel olarak onkofötal gen ifadesi ile uyumaktadır (58, 59).

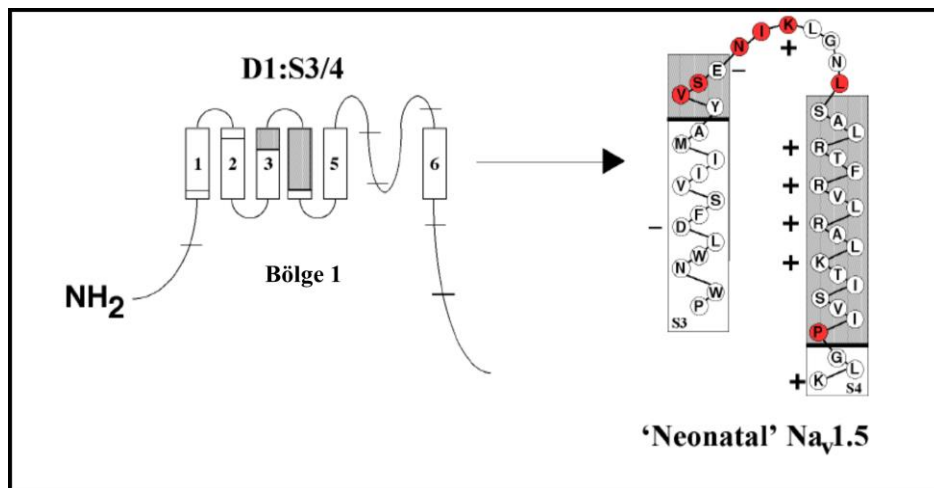
İlk olarak sıçan beyinde Nav1.3 ve Nav1.2 için tanımlanmış olan D1:S3 bölgesindeki kırılmanın gelişimsel olarak düzenlendiği düşünülmektedir. Çünkü doğumda 5' ekzonu içeren transkriptler bol iken, birkaç gün sonra 3' ekzon içeren transkriptlerle hızlı bir şekilde yer değiştirmektedir (60). Yani, 5' varyantı taşıyan kanallar neonatal olarak, 3' varyantı taşıyanlar ise adult olarak isimlendirilmiştir. Benzer şekilde D1:S3 bölgesindeki kırılma ayrıca Nav1.1 (61), Nav1.5 (62), Nav1.6 (63) ve Nav1.7 (64) için de rapor edilmiştir.

Bu beş kanalın her birinde (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7) alternatif D1:S3 ekzonları, 19-21 nükleotidleri arasında farklılık gösterdiğinden sadece 1 ya da 2 amino asitlik farklılık oluşmaktadır. Bu durumun kanal fonksiyonu üzerindeki etkisi ise henüz bilinmemektedir. nNav1.5 izoformu D1:S3'ün hücre dışı ucunda korunmuş olan aspartatın pozitif yüklü lizin kalıntısıyla yer değiştirdiği bir

proteini kodlamaktadır. Aspartat kalıntısının olmayışı bütün D1:S3 5' (neonatal) ekzonlarının karakteristiği olduğundan, bu form neonatal Nav1.5'i işaret etmektedir (38).

Nav1.5'in yeni neonatal izoformunun aslında çeşitli dokularda (beyin dahil) gelişimle ilişkili olarak ifade edildiği gösterilmiştir. Erişkinler ile karşılaştırıldığında yeni doğanlarda yüksek seviyede ifade edilmektedir. Fakat erişkinde gen ifadesi önemli oranda baskılanmasına rağmen nNav1.5 yetişkin iskelet kası ve beyin dokusunda hala tespit edilebilmektedir. Bu durum Nav1.7 için neonatlara göre az miktarda olsa da, yetişkin dorsal kök gangliyon nöronlarında da tespit edilmiştir (64).

Sıçan, fare ve insanlarda varlığı tespit edilmiş olan nNav1.5'in bu üç türde de, neonatal Nav1.5 ekzonunun 92 nükleotidinin 31'i adult ekzondan farklıdır ve bu farklılık 7 amino asitlik bir fark oluşturmaktadır (Şekil 2. 4).



Şekil 2.4. Sodyum iyon kanalının neonatal formundaki yedi amino asitlik değişimin şematik gösterimi (Onkal ve diğ.(62)'den alınmıştır)

Bu fark diğer VGSC α 'ların D1:S3 bölgesindeki kırılmadan (*splicing*) çok daha fazladır. Bu durum Nav1.5'in neonatal kırılmış formuna karşı antikor üretme şansını arttırmıştır. Daha önce VGSC α 'nın kırılmış varyantına özgü antikor rapor edilmemiştir. Bunun nedeni, diğer bütün VGSC α 'ların D1:S3 alternatif kırılmış formları arasında 1-2 amino asit kadar küçük bir fark oluşudur (56, 65).

nNav1.5 izoformuna özgü bir antikor kullanarak yapılan immünohistokimya çalışmalarında, metastatik meme kanseri biyopsi örneklerinde neonatal Nav1.5 iyon kanalının artmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, birincil meme tümörlerinde Nav1.5 mRNA ifadesinin lenf nodu metastazıyla yakından ilişkili olduğu, birincil tümörde neonatal Nav1.5 mRNA ifadesi olmadan lenf nodu metastazı vakasının bulunmadığı ve vakaların % 25-30'unda kesin lenf nodu metastazı olmaksızın neonatal Nav1.5 mRNA' sının bulunduğu rapor edilmiştir (56).

2.1.5. Meme Kanseri Hücrelerinin Sodyum İçeriğinin Hücre Davranışı Üzerindeki Etkisi

Manyetik rezonans görüntüleme ile kötü huylu meme kanseri lezyonlarında sodyum içeriği adipoz doku ya da iyi huylu lezyonlara oranla önemli oranda daha yüksektir (66). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde ve kötü huylu meme kanseri hücrelerinde, hücre içi sodyum derişiminin kanserli olmayan hücrelerden iki kat daha fazla olması, Na⁺'nın VGSC yoluyla hücre içine girişinin metastatik hücre davranışlarının arttırılmasından sorumlu olabileceğini göstermektedir (47, 66).

Bölgesel ya da genel VGSC aktivitesinden kaynaklanan Na⁺ iyonu konsantrasyonundaki herhangi bir değişiklik, metastatik tümör hücrelerinde zar potansiyelini, Ca⁺⁺ dengesini (Na⁺/ Ca⁺⁺ değişimi), pH dengesini (Na⁺/H⁺değişimi, bikarbonat taşıyıcısı, vakuolar H⁺-ATPaz) ve Na⁺ bağımlı enzimlerin aktivitesini (PKA, katepsinler) değiştirir. Bu etkiler çeşitli metastatik hücre davranışlarını etkileyebilir. Örneğin, VGSC'lerden Na⁺ iyonlarının geçişinin hücre zarı etrafındaki pH'yı düşürerek asitleştirdiği ve sonuçta hücre dışı matrikse salınan sistein katepsinlerin proteolitik aktivitesini arttırdığı, buna bağılı olarak da MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin invazif fenotip gösterdiği tespit edilmiştir (3).

Diğer taraftan, İyon dengesinin değişmesi (Na⁺, Ca⁺⁺ ve H⁺) temel kinaz proteinlerini de aktive etmektedir. (PKA, Protein kinaz C, Ca⁺⁺/kalmodülin bağımlı protein kinaz (CaMK) ve src kinaz). Aktin iskeletini düzenleyen bu kinazlar, böylelikle metastatik meme ve prostat kanseri hücrelerinde invazyon, hücre göçü, salgılama ve veziküler taşımayı arttıırırlar. Özetle, VGSC aktivitesinin bir sonucu

olarak hücre içi Na^+ , Ca^{++} ve H^+ iyonlarındaki değişiklikler metastaza katkıda bulunan birçok hüresel etkiye öncülük etmektedir (17,19,67).

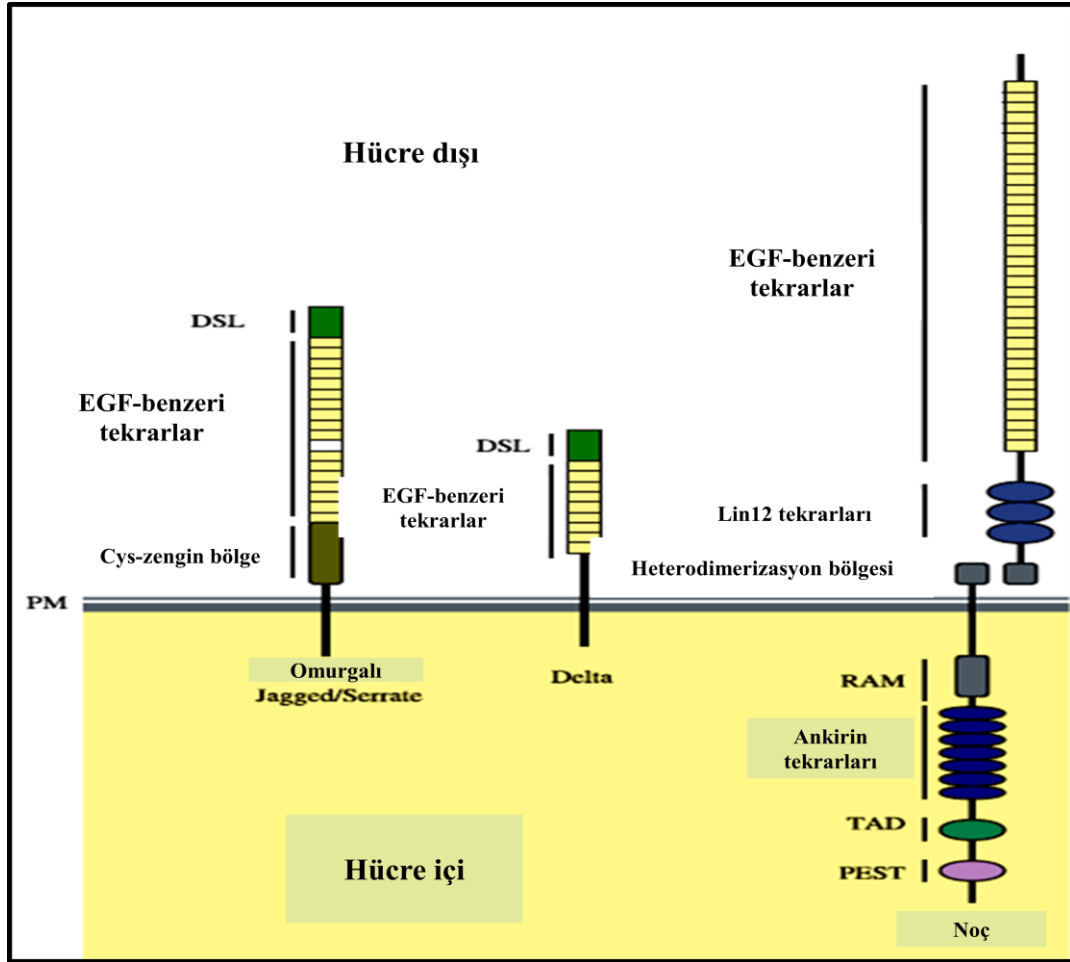
Şu ana kadar ki birçok bulgu, metastatik süreçte VGSC'lerin önemli bir rolü olduğunu ileri sürmüştür. VGSC ifadesinin (Nav1.5) metastatik meme kanseri hücre ve dokularında onkofötal olması, kanalı meme kanseri tedavisine karşı yeni bir hedef haline getirmektedir (68).

2.2. Noç Sinyal Yolağı

Yirminci yüzyılın başlarında ilk kez *Drosophila melanogaster*'in kanatlarında dantelimsi, çentikli yapı dikkati çekmiştir. Uzun yıllar sonra, 1985'te bu fenotipe neden olan gen klonlanmış ve çentik anlamına gelen Noç adı verilmiştir (69). Hücre zarını kateden reseptörleri kodlayan Noç genleri omurgasızlardan memelilere kadar evrimsel süreçte korunmuştur (70). Noç sinyal yolağı çeşitli moleküler mekanizmalarla hücre farklılaşması, çoğalması, canlılığı ve organ sınırı belirlenmesi gibi süreçlerde rol almaktadır. Hücrelerin farklılaşma kaderini düzenlemedeki özelliğinden dolayı, Noç sinyali çok hücreli organizmalarda çok sayıda dokunun gelişiminde gereklidir. Memeli embriyosunda organ oluşumu sırasında Noç reseptör ve ligandları yoğun şekilde ifade edilmekte ve üç germ tabakasından (mezoderm, endoderm, ektoderm) türeyen dokuların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca Noç sinyali farklılaşmış dokuların olgunlaşması ve gelişiminin yanında, *fötal* ve *postnatal* doku gelişimini de kontrol etmektedir (71).

2.2.1. Noç Reseptör ve Ligandlarının Yapısı, Aktivasyonu ve İşlevi

Memelilerde Noç 1-4 olmak üzere dört adet Noç reseptörü bulunmaktadır. Bunlar, hücre zarını bir kez kateden proteinlerdir (Şekil 2.5). Yeni sentezlenmiş Noç proteinlerinin işlenmemiş hali hücre dışı, hücre içi ve zara gömülü kısımlardan oluşur. Proteinlerin golgi aygıtına taşınmasını takiben S1 kırılma bölgesinden furin benzeri konvertaz ile kırılır ve iki adet alt birim oluşur. Birinci bölge hücre dışı kısmın büyük çoğunluğunu içerirken, ikinci bölge zara gömülü kısım, geri kalan hücre dışı bölüm ve proteinin hücre içine bakan kısmını içermektedir. Bu iki alt birim kovalent olmayan etkileşimlerle ilişki içerisindedir (72).

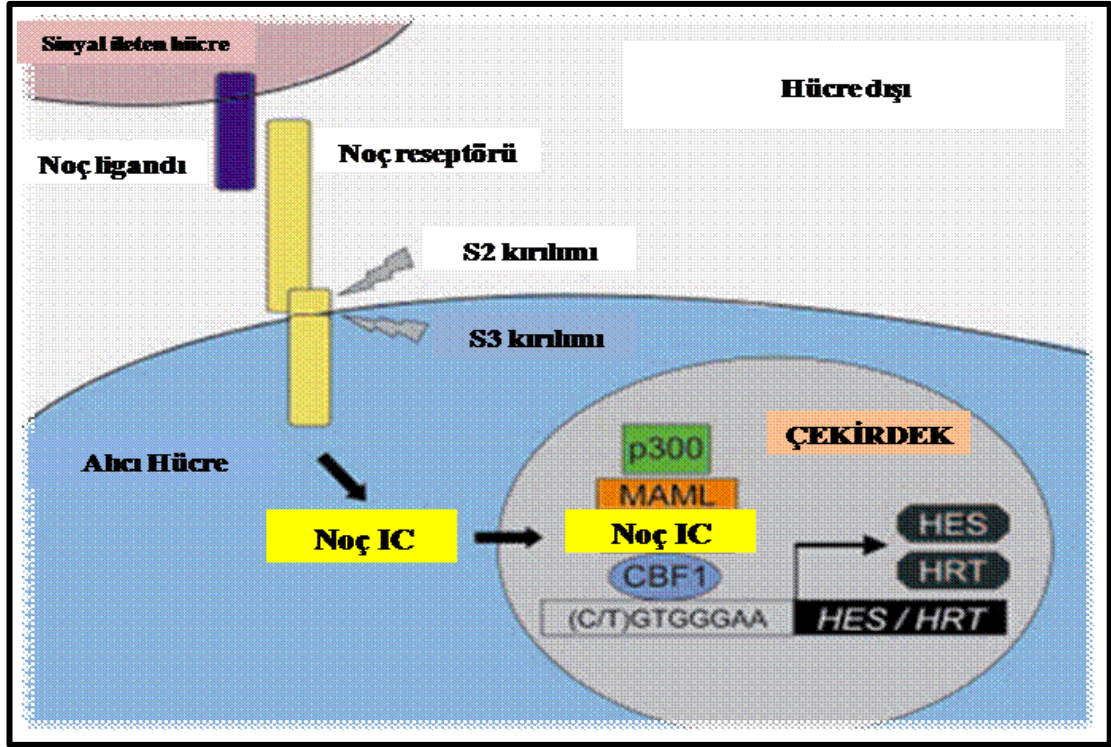


Şekil 2. 5. Noç reseptör ve ligandlarının yapısı
Fiuza ve diğ.(84)'den alınmıştır.

Noç reseptörleri gibi Noç ligandları da zarı bir kez kateden proteinlerdir. Memelilerde en az beş adet Delta ve JAG/Serrata (DSL) ailesine ait ligand bulunmaktadır: JAG1, JAG2, Delta benzeri (DII)-1, DII-3 ve DII-4 (Şekil 2.5) (73). Bu ligandlar bölgesel içeriğindeki farklılıklardan dolayı iki gruba ayrılmıştır (74). Noç sinyali normalde iki komşu hücre arasında ligand-reseptör bağlanmasıyla aktive olarak, devamında iki adet proteolitik olayı başlatır. Noç'un hücre dışına bakan kısmı 29 ile 36 arasında değişen sayıda epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri tekrarlar içermektedir ve her bir üyesinde bu tekrarların sayısı değişmektedir (75). Hücre içine bakan kısmında ise DNA bağlayan protein bölgesi ve altı adet ankirin tekrarı bulunmaktadır. Noç ligandının Noç reseptörünün 11 ve 12. EGF benzeri tekrarına bağlanması sonucu, Noç'un hücre dışı kısmında konformasyonel değişiklik meydana

gelerek S2 kırılma bölgesine maruz kalır (76). İlk kırılma, metalloproteinazların ADAM (Bir disintegrasyon ve bir metalloproteaz)-ailesi tarafından gerçekleştirilir. Bir disintegrin-metalloproteazı olan tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) dönüştürücü enzim tarafından plazma zarının hücre dışına yakın kısmında gerçekleşir (77). Metalloproteaz TNF- α ile kırılmanın ardından, Noç reseptörleri zarı kateden bölgesinde yerleşmiş olan, korunmuş S3 kırılım bölgesinde zar içi proteolitik yıkıma uğrar. S3 kırılımına presenilin ½, nikastrin, Pen-2 ve Aph-1'i içeren gama sekretaz kompleksi eşlik eder ve Noç'un hücre içi kısmı (N-ICD) serbestleşir (78,79).

Serbest kalan N-ICD çekirdeğe geçer, DNA'ya doğrudan bağlanamadığından dolayı, DNA bağlayan protein RBP-J (Rekombinasyon tanıma dizisine bağlanan protein) ile heterodimerize olur ve RBP-J bağlama bölgesi içeren genlerin transkripsiyonunu aktive eder (80) ve transkripsiyon faktörü CSL ile kompleks oluşturur. N-ICD'nin yokluğunda CSL ko-represörü ile etkileşime girerek transkripsiyonel represör gibi davranır (81). N-ICD çekirdeğe girdiğinde Noç hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive etmek için represör kompleksini parçalar ve Noç sinyal iletimi için gerekli olduğu gösterilmiş olan transkripsiyonel aktivatör protein ailesinden Mastermind-benzeri (MAML) proteinler ve histon asetil transferaz (p300) koaktivatörlerinin katılımıyla CSL'yi bir transkripsiyonel aktivatöre dönüştürür ve Noç hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatır (Şekil 2.6). Bu şekilde aktifleştirilen genler Hes (*hairy /enhancer-of-split*) ve HRT (*hairy-related transcription factor*) ailesine ait genlerdir (82,83).



Şekil 2. 6. Noç sinyal yolağının çalışması

Mumm ve diğ.(76)'den alınmıştır.

2.2.2. Noç Sinyal Yolağının Kansere İlişkisi

Noç sinyalindeki değişim veya düzensizliklerin neden olduğu bazı hastalıklar vardır. Noç reseptörleri veya ligandları ile ilgili olarak aşırı gen ifadesi veya mutasyon şeklindeki bu değişimler, geniş çapta bozukluklara neden olabilmektedir. Noç reseptör ve ligandlarında meydana gelen mutasyonların sebep olduğu hastalıkların bazıları Tablo 2. 1.'de özetlenmiştir (84).

Noç reseptörlerinin tümör oluşumunda etkili olup olmaması ve tümör oluşumunu baskılayıp baskılamamasında çeşitli faktörler rol almaktadır. Örneğin, İnsan meme kanserinde Noç-2 tümör baskılanması ile ilişkili iken, Noç-1 tümör oluşumu ile ilişkilidir (85). Bunun aksine insan beyin tümörlerinde Noç-1 tümör baskılayıcı iken, Noç-2 tümör oluşumunda rol almaktadır (86). Çünkü çoğu kanser türünde birden fazla Noç ligand ve reseptörleri ifade edilmektedir. Genel olarak bu ligand ve reseptörlerin gen ifade profili Noç sinyalinin tümör oluşumuna katılıp

katılmayacağını ya da tümör oluşumunu baskılayıp baskılamayacağını belirlemektedir.

Tablo 2.1. Noç sinyalindeki bozuklukların neden olduğu hastalıklar (84)

Hastalıklar	Belirtiler	Mutasyonlar
Alagille Sendromu	Böbrek, göz, kalp ve iskelet gelişim bozuklukları ve safra kanalı defektleri.	Jagged 1 gen mutasyonu
CADASIL Sendromu (<i>Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy</i>)	Otozomal dominant küçük damar hastalığıdır. Lezyonlar kliniğe en sık migren, inme, geçici iskemik ataklar olarak yansımaktadır.	Noç-1 ve Noç-3 mutasyonları
T-hücre akut lenfoblastik lösemi	Artmış Noç sinyal iletiminden kaynaklı, T-hücre progenitörlerinden saldırgan tümör gelişimi.	Noç heterodimerizasyon bölgesi ya da PEST bölgesinde mutasyonlar
Spondilokostal Dizostoz	Kaburga kemiği defektleri ve omurga anomalilerine bağlı solunum problemleri.	Delta-benzeri 3 mutasyonu

İkinci faktör, hücre tipidir. Öyle ki, farklı hücre tiplerinde Noç sinyal yolağındaki moleküllerin gen ifadeleri de farklı olmaktadır. Örneğin, akciğer kanseri hücre hattında p21^{Cip1} ve p27^{Kip1}, in ifadelerindeki artış hücre proliferasyonunu inhibe ederken (87), endotel hücrelerinde Noç aktivasyonu, p21^{Cip1}, in gen ifadesini azaltarak proliferasyonu inhibe etmektedir (88). Ayrıca Noç aktivasyonunun apoptoz üzerindeki etkisi de hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, Kaposi sarkomu hücrelerinde Noç aktivasyonu apoptozu inhibe ederken, hepatosellüler karsinomlarda hücre ölümünü desteklemektedir (89).

Noç reseptör aracılığı ile hücre çoğalmasının altında yatan mekanizma Noç'un Ras/MAPK, PKC/NF-κB, Wnt, TGFβ ve Sonic Hedgehog (Shh) gibi hücresel yollardan hangisi ile etkileşime girip girmediğine bağlı olarak, yani hücre tipine göre değişmektedir (90).

Üçüncü faktör, hücrel mikro çevrede özgül sitokin ve büyüme faktörlerinin varlığıdır. Örneğin, makrofaj koloni uyarıcı faktörün varlığında Noç aktivasyonu monositlerde apoptozu indüklemektedir (91).

Dördüncü faktör, Noç sinyal iletiminde görevli moleküllerin dozlarıdır. Lösemi-T hücre hattında düşük konsantrasyonlardaki NoçIIC, NFκB transaktivasyonunu artırırken, yüksek dozlarda azalttığı gösterilmiştir (92). Kısacası, mikro çevredeki faktörler Noç sinyalinin seviyesini etkileyebilmektedir. Örneğin, hipoksi nöroblastoma hücrelerinde Noç-1 gen ifadesini artırırken, östrojen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde Noç-1 ve Jagged-1 mRNA ifadelerini indüklemektedir (93,94). Dahası, Noç sinyal yolağının düzenleyicileri olan Deltaks, Numb ve Fringe gibi proteinlerin ifadelerindeki artış da ligand-bağımlı Noç sinyalinin yoğunluğunu etkilemektedir (95). Bu bulgular hücrel gelişim sırasında Noç sinyal düzenleniminin son derece önemli olduğunu göstermektedir.

Hematolojik kanserlerde olduğu gibi pankreas (96), prostat (97), serviks (98), beyin (99), malign melanom (100), meme (101) gibi solid insan tümörlerinde de Noç sinyal iletiminde görevli olan moleküllerin gen ifadelerinin arttığı gözlenmiştir. Solid tümörlerde aktive Noç sinyali hem onkojenik hem de tümör baskılayıcı gibi davranabilir. Solid tümörler heterojen hücre topluluğundan oluştuğu için, farklı hücre topluluklarında Noç aktivasyonu tümörün gelişimi üzerinde farklı etkilere neden olmaktadır. Örneğin, tek bir meme tümöründe, aktive Noç sinyali meme kanseri hücrelerinde onkojenik olabilirken, meme tümöründeki endotel hücrelerinde aktive Noç sinyali damar oluşumunu baskılar ve sonuçta tümör baskılayıcısı gibi davranır (102).

Diğer taraftan, Noç reseptörlerinin hücre invazyonu ve metastazına da katkıda bulunduğu dair bulgular vardır (103). NF-κB, VEGF ve matriks metalloproteinazlar tümör hücre invazyonu ve metastazında gerekli olan moleküllerdir. Bu önemli metastatik moleküllerin Noç-1 tarafından düzenlenmesi geniş şekilde araştırılmıştır. Noç-1'in baskılanması NF-κB'nin DNA bağlama aktivitesini azaltarak yolağın aşağısındaki MMP-9 ve VEGF moleküllerinin de gen ifadelerinde azalmaya neden olmaktadır (104).

Yapılan çalışmalarda insan meme kanseri gelişiminde Noç sinyalinin potansiyel rolü vurgulanmaktadır. İn vitro koşullarda normal insan meme epitel

hücrelerinde Noç 4'ün gen ifadesindeki artış *transformasyonu* indüklemektedir (105). Noç sinyal yolağı meme kanserinde onkogenik bir role sahip olduğundan, Noç sinyal yolağının inhibe edilmesi hastalığı tedavi edebilir. Günümüzde kanser ile ilişkili olayların, Noç sinyal yolağının çeşitli basamaklarında meydana geldiği bilinmektedir (106).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

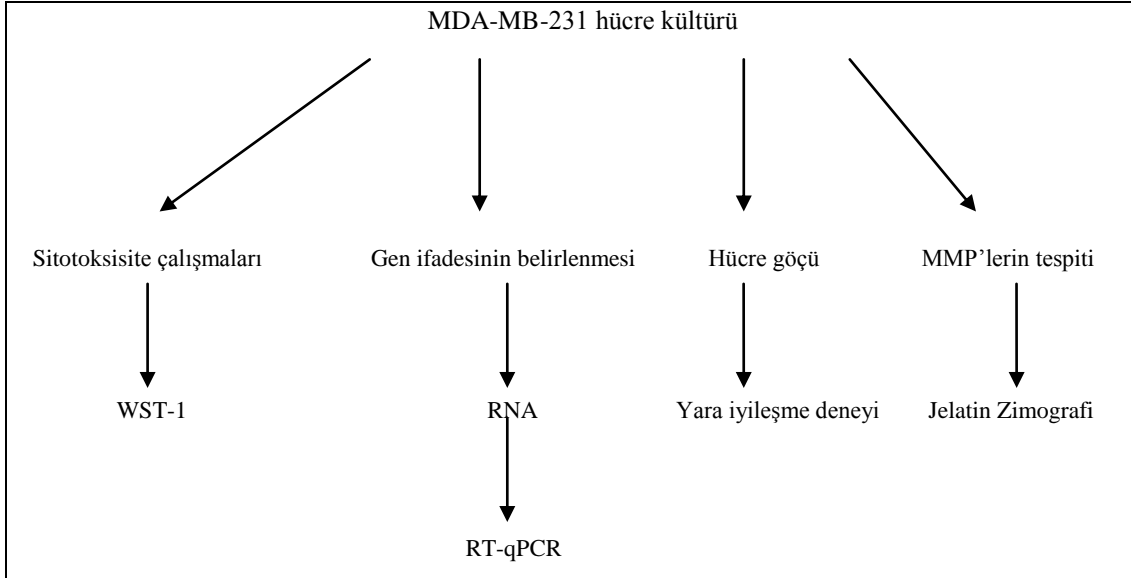
3.1. Gereçler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve kitler; Sodyum klorür, Potasyum klorür, Asetik asit, Metanol, Etanol, DAPT (Merck, Almanya). Amonyum persülfat (Pierce, ABD). Jelatin, Brij 35 (Fisher, İngiltere). Glisin, Triton X-100, β -Merkaptoetanol, Bromfenol mavisi, TEMED, BSA, Tris HCl (Amresco, ABD). Tripkan mavisi çözeltisi, Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Almanya). Fenitoin, Tripsin-EDTA çözeltisi, Akril-bisakril çözeltisi (% 30), L-Glutamin, DMEM yüksek glukozlu besiyeri, FBS, Trizma bazı, SDS, Gliserol, PBS, Protein molekül ağırlığı belirteci (Sigma, Almanya), WST-1 (Roche, Almanya). RNeasy Mini Kit, RT² First Strand Kit, RT² qPCR Primer Assay, RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix (QIAGEN, Hollanda), nNav1.5 primeri (Metabion, Almanya) ve MDA-MB-231 hücre hattı (ATCC, ABD).

Kullanılan cihazlar ve temin edildikleri firmalar; çalkalayıcı (Heidolph TITRAMAX 101, Almanya), su banyosu (MRC-Laboratory Equipment BH-200, İsrail), mikropilaka okuyucusu (Molecular Devices, ABD), ters fazlı mikroskop (Nikon TMS, Japonya), Rotor Gene Q marka RT-PCR cihazı (QIAGEN, Hollanda), laminar hava akımlı kabin, inkübatör (HERA cell, ABD), - 80°C'lik derin dondurucu (Sanyo, Japonya), analitik terazi (Mettler, İsviçre), vorteks (MS2 Minishaker IKA, ABD), elektroforez cihazı (BioRad, ABD), pH Metre (Orion, ABD),

3.2. Yöntemler

Çalışmamızda metastatik insan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinin kültürü yapılarak diğer deneylerde kullanılmak üzere çoğaltıldı. Öncelikle hücrelere uygulanan inhibitörlerin sitotoksiteleri WST-1 yöntemi ile analiz edilip, GraphPad Prism 6 yazılımı kullanılarak inhibitörlerin IC₅₀ değerleri belirlendi. İnhibitörlerin uygulamaları sonucunda hücrelerin metastatik gücünü gösteren MMP'lerin varlığı ve hücre göçü sırasıyla jelatin zimgrafı ve çizik kapatma yöntemiyle (*wound healing*) değerlendirildi. Noç-4, nNav1.5, MMP-9 ve TIMP-1 genlerinin ifade düzeyleri ise eş zamanlı polimeraz zincir tepkimesi ile belirlendi.



Şekil 3. 1. Deney tasarımının şematik gösterimi

3.2.1. Hücrelerin Çözülmesi ve Ekimi

Sıvı azot tankından alınan dondurma tüpü 37 °C'lik su banyosunda 1-2 dakika bekletildikten sonra, tüpün içindeki hücre süspansiyonu 9 ml tam besiyeri (% 10 FBS, % 1 antibiyotik-antimikotik solüsyon ve 2 mM L-Glutamin ilaveli yüksek miktarda glukoz içeren DMEM) içeren falkon tüpe alındı.

Tüp 1200xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak geride kalan pellete 1 ml besiyeri eklendi. Hücreler 1 ml içinde iyice pipetlenerek çözüldükten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklenerek 5 ml'lik hücre süspansiyonu kültür kaplarına alındı. Hücreler ters fazlı mikroskop altında incelendikten sonra inkübatöre yerleştirildi. Kültür ortamı her gün değiştirilerek hücrelerin beslenmesi sağlandı. Kültür kabı her gün ters fazlı mikroskop ile kontrol edilip hücreler % 80 oranında kültür kabını doldurunca tripsinlenerek pasajlandı.

3.2.2. Tripsinizasyon ve Pasajlama

Kültür kaplarından besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücreler oda sıcaklığındaki PBS ile yıkandı. Bu işlem ile hücreler yıkanıp, kabın içinde kalan besiyeri artığı, özellikle tripsin enziminin inhibitörü olan tripsinazları barındıran serumdan arındırıldı. Daha sonra kültür kabına Tripsin-EDTA çözeltisi eklenip, kapağı iyice kapatılarak inkübatör içine alındı. Hücreler inkübatörde tripsinle 2-3

1 dakika inkübe edildi. Tripsin ile flaskın tabanından sökülmüş olan hücreler ayrı bir tüpe alınarak, tripsin hacminin en az iki katı tam besiyeri ile inkübe edildi. Hücre süspansiyonu 1200xg'de 5 dk santrifüjlenip, süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılıp sayıldıktan sonra kültür kaplarına ekildi.

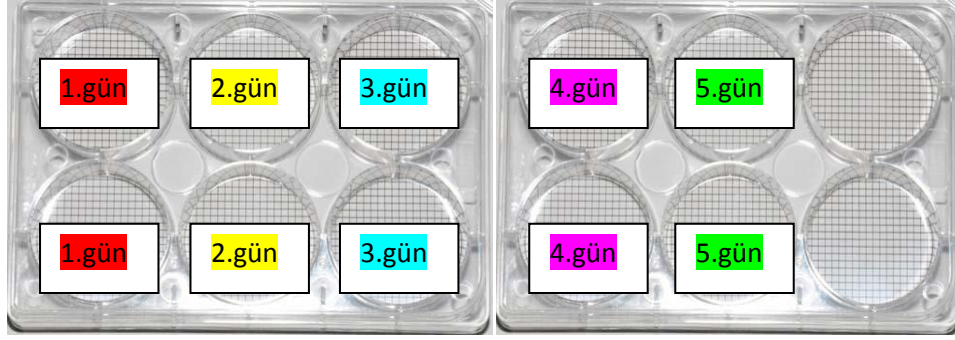
3.2.3. Hücrelerin Dondurulması

Etüvdeki hücrelerin mikroskopta canlılığı değerlendirildikten sonra PBS ile yıkandı. PBS aspire edildikten hemen sonra tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek inkübatörde 2-3 dakika bekletildi. Hücrelerin kültür kabından ayrılıp ayrılmadığı ters fazlı mikroskopta değerlendirildi ve tripsin miktarına eşit tam besiyeri kullanılarak, tripsin inhibe edildi. Pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilen hücreler başka bir tüpe aktarılıp, üzerine 2-3 ml daha tam besiyeri ilave edildikten sonra, hücre süspansiyonu 1200xg'de 5 dakika santrifüjlendi.

Dondurma tüpü içine 700 µl besiyeri, 200 µl FBS, 100 µl DMSO konulup buz üzerinde bekletildi. Santrifüj sonrası tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstündeki süpernatant pastör pipeti ile çekilerek atıldı. Dondurma tüpünde hazırlanan solüsyonla hücre peleti 1-2 kez yıkanıp, hücrelere zarar verilmeden hepsi çekilerek, dondurma tüpüne alındı. +4 °C'de 2 saat, - 20°C'de 4 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankına alındı.

3.2.4.MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Sayısının İkiye Katlanma Süresinin Belirlenmesi

Hücre sayısının ikiye katlanma süresinin belirlenmesi için 6 kuyucuklu kapların her kuyucuğuna 2×10^4 hücre ekildi. Her kuyucuğa 3 ml besiyeri eklenerek, hücre çoğalması 5 gün boyunca Thoma lamında sayım yapılarak değerlendirildi.



Aşağıdaki formüle göre hücrelerin iki katına ulaşma süresi belirlendi.

$$DT=T \ln 2/\ln(Xe/Xb)$$

T herhangi bir zamandaki inkübasyon süresi

Xb İnkübasyonun başlangıcındaki hücre sayısı

Xe inkübasyon süresinin sonundaki hücre sayısı

3.2.5.WST-1 Yöntemiyle Sitotoksikite Çalışmaları

Hücre çoğalması ve canlılığının ölçülmesinde MTT, WST-1 ve MTS gibi çeşitli tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Tetrazolyum tuzları çeşitli hücrel enzimler tarafından kırılarak renkli formazon bileşiği oluşturur. Metabolik olarak aktif olan hücreler tarafından oluşturulan formazon bileşiklerinin miktarı, çoklu plaka okuyucuda 420 ve 480 nm dalga boylarında ölçülerek tayin edilir. Mitokondriyal dehidrogenazların toplam aktivitesi ile hücre çoğalması arasında doğrusal bir ilişki olduğundan, ortama eklenen kimyasal bileşiğin sitotoksik olması durumunda, hücrelerin canlılığını yitirmesi sonucu, oluşan formazon bileşikleri azaldığından dolayı absorbans da düşecektir (107).

Deney aşamasında, hücreler inkübatörden çıkarılıp canlılık yönünden değerlendirildi. Olağan tripsinizasyon işleminden sonra hücreler süspansiyon haline getirildi. Süspansiyondan 10 µl alınıp Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Kuyucuklara bir sırası kontrol olmak üzere denenecek inhibitörün doz ve her dozun uygulanacağı kuyucuk sayısına göre hücreler 100'er µl hacimlerde ekildi. Bir gece bekleyip hücrelerin kuyulara tutunduğundan emin olduktan sonra besiyeri aspire edildi.

Önceden belirli dozlarda hazırlanmış olan inhibitörler 100'er µl hacimde kuyulara konuldu. Kontrol kuyucuklarına ise, besiyeri ve inhibitörün çözülmesi için

kullanılan herhangi bir çözücü varsa, aynı oranda çözücü de eklendi. Uygulamadan sonraki 24 saatte her kuyuya 10 µl WST-1 reaktifi eklendi. İnkübatörde 4 saat bekletildikten sonra 440 ve 620 nm’de mikro plak okuyuculu spektrofotometrede okundu. A_{620} değerleri, A_{440} değerlerinden çıkarılarak aradaki fark grafikleme amacıyla kullanıldı.

Çalışmamızda MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri 4×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Tüm çalışmalar en az iki kere tekrarlandı ve her uygulama üçerli olarak çalışıldı.

3.2.6. Gama Sekretaz İnhibitörü DAPT ve VGSC İnhibitörü Fenitoin İle Sitotoksisite Çalışması

Çalışmada gama sekretaz inhibitörü DAPT ve voltaj kapılı sodyum iyon kanalı inhibitörü fenitoin hücrelere ayrı ayrı ve birlikte 0,1-1-10-100-200 ve 500 µM dozlarda uygulandı. Kontrol kuyularına ise bu iki maddenin çözücüleri olan, DMSO (DAPT) ve NaOH (fenitoin) eklendi. Her kuyuya 4000 hücre ekildi ve hücrelerin 24 saat sonra tutunduklarından emin olunca inhibitör uygulamalarına geçildi. Uygulamadan 24, 48 ve 72 saat sonra WST-1 reaktifi ile hücre çoğalması değerlendirildi.

3.2.7. Eş Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Tepkimesi İle Hücrelerde Gen İfadesinin Belirlenmesi

3.2.7.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için 6 kuyucuklu plakaların her bir kuyusuna 50×10^4 hücre ekildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası tutunmuş olan hücrelere inhibitör uygulaması yapıldı. RNA izolasyonu için RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hollanda) kullanıldı. İnhibitör uygulamasından sonra ortam aspire edilerek hücreler PBS ile yıkandı. PBS aspire edildikten sonra % 0.25 oranında tripsin eklendi. Kültür kabına tutunmuş hücreler kaldırıldıktan sonra tripsini inaktive etmek için serum içeren besiyeri ilave edildi. Daha sonra 300xg’de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant tamamen aspire edildikten sonra diğer basamağa geçildi.

Süpernatant alındıktan sonra geriye kalan hücre peletinin üzerine hücreleri patlatmak amacıyla 350 µl lizis tamponu (RLT) eklendi ve pipetleme ile homojenizasyon sağlandı. Homojenize lizata, lizatın hacmi kadar % 100 etanol eklendikten sonra pipetlenerek karıştırıldı. Daha sonra bu karışım 2 ml'lik toplayıcı tüplere yerleştirilmiş olan RNeasy spin kolonuna alınarak 15 saniye 8000xg'de santrifüjlendi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldı. Yıkamak için RNeasy spin kolonuna, 700 µl yıkama tamponu (RW1) eklenerek, 15 saniye 8000xg'de santrifüjlendi. Toplayıcı tüpte biriken sıvı atıldıktan sonra kolona 500 µl elüsyon tamponu (RPE) eklenerek 15 saniye 8000xg'de santrifüjlenip biriken sıvı atıldı. Spin kolonunun zararını yıkamak için kolona tekrar 500 µl RPE eklenerek 2 dakika 8000xg'de santrifüjlendi. RNA elüsyonu sırasında etanol sonraki basamakları etkileyebileceğinden, etanol kalıntısından arındırmak için yeni bir 2 ml'lik toplayıcı tüp takılarak, zararın kuruması için yüksek hızda 1 dakika santrifüjlendi. Daha sonra, kolona yeni bir 1.5 ml'lik tüp takıldı ve kolon zara doğrudan 40 µl RNaz içermeyen H₂O eklenerek 1 dakika 8000xg'de santrifüjlenip RNA elde edildi.

3.2.7.2. cDNA Sentezi

cDNA sentez kitinde (RT² First Strand Kit, QIAGEN-Hollanda) bulunan çözeltiler ve izole edilen RNA'lar kullanılmadan önce düşük hızda 4-5 saniye kadar santrifüjlenerek karışmaları sağlandı. Bu işlem için iki farklı karışım kullanıldı: Genomik DNA eliminasyon karışımı ve RT (reverse transcriptase) Tablo 3.1'de görüldüğü gibi hazırlandı.

Tablo 3.1. Genomik DNA eliminasyon karışımı ve RT kokteyli

Genomik DNA eliminasyon karışımı	RT (<i>Reverse Transcriptase</i>) Kokteyli (1 tepkime için)
2 µl GE tamponu (Genomik DNA eliminasyon)	4 µl BC3 tamponu (<i>Reverse transkripsiyon</i> tamponu)
8 µl RNaz içermeyen H ₂ O	1 µl P2 (Primer ve eksternal kontrol karışımı)
RNA	2 µl RE3 (Reverse transkripsiyon enzim karışımı)
	3 µl RNaz içermeyen H ₂ O
Son Hacim: 10 µl	Son Hacim: 10 µl

cDNA sentezinde her bir örnek için 2,5 µg/ml RNA kullanıldı ve genomik DNA eliminasyon karışımındaki su miktarı son hacim 10 µl olacak şekilde ayarlandı. RNA eklenmiş genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlandıktan sonra 15 saniye düşük hızda santrifüjlendi ve pipetlenerek karıştırıldı. Örnekler 42°C’de 5 dakika inkübe edildikten hemen sonra buzun üzerine alınarak en az bir dakika soğumaya bırakıldı. cDNAsentez tepkimesi için 10 µl RT kokteyli ile 10 µl genomik DNA eliminasyon karışımı karıştırılarak dikkatlice pipetlendi. Bu tepkime karışımı, 15 dakika 42°C’de, 5 dakika da 95°C’de inkübe edildikten sonra 91 µl RNaz içermeyen H₂O eklenerek sentez tamamlandı.

3.2.8. Eş Zamanlı PCR Tepkimesi

Eş zamanlı polimeraz zincir tepkimesi (RT-PCR), nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan SYBR Green gibi özel boyalar, DNA çift sarmalına bağlanarak floresan ışımaya yapıp amplifikasyon miktarının saptanmasını sağlamaktadır. Her PCR döngüsü sonunda oluşan çift zincirli ürün miktarı ölçülerek kantitatif analizlerin yapılması sağlanır (110). Amplifikasyon sırasında saptanan floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısı eşik döngü değeri (*threshold cycle = Ct*) olarak adlandırılmaktadır. Başka bir deyişle Ct değeri üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı gösterir ve deney sonuçlarının hesaplanmasında kullanılır (111).

Florometrik PCR tekniğiyle yapılan kantitatif çalışmalarda, kalıp DNA derişimi bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile, incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PCR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç duyulur. Eş zamanlı PCR yönteminde normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ifade düzeyi değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır (112). GAPDH, β-aktin gibi *housekeeping* genlerin çoğu farklı uygulamalardan, biyolojik süreçlerden hatta farklı doku ve hücre tiplerinden etkilenmez. İzole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmek için ilgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genin ifade düzeyine oranlanır (111). Deneylerimizde kullanılan genler ve bu genlere ait primer dizileri Tablo 3.2’de özetlenmiştir.

Tablo 3.2. nNav1.5, Noç-4, MMP-9, TIMP-1 ve GAPDH genleri için kullanılan primerler

RT-qPCR için kullanılan primerler	Primer dizileri
nNav1.5	<p><i>Forward:</i> 5' -CATCCTCACCAACTGCGTGT-3'</p> <p><i>Reverse:</i> 5' -CCTAGTTTTTCTGATACA-3'</p>
Noç-4	<p><i>Forward:</i> 5' -AGTCCAGGCCTTGCCAGAACG-3'</p> <p><i>Reverse:</i> 5' -GTAGAAGGCATTGGCCAGAGAG-3'</p>
MMP-9	<p><i>Forward:</i> 5' -GACGAGGGCCTGGAGTGT-3'</p> <p><i>Reverse:</i> 5' -TGTGCTGTAGGAAGCTCATCTC-3'</p>
TIMP-1	<p><i>Forward:</i> 5' -ACCCCTGGAGCACGGCT-3'</p> <p><i>Reverse:</i> 5' -CCCACCTTCCAAGTTAGTGACA-3'</p>
GAPDH (House keeping gene)	<p><i>Forward:</i> 5' -CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'</p> <p><i>Reverse:</i> 5' -AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'</p>

Tablo 3.3’de verilen bileşenler, cDNA eklenmeden 4 farklı primer için 4 farklı tüp içinde hazırlandı. Karışım hazırlandıktan sonra vortekslenerek karışması sağlandı. Hazırlanan karışım 0,1 ml’lik PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra, her bir tüpe beşer µl cDNA eklendi. En son tüplerin kapakları kapatılarak örnekler Rotor Gene Q cihazına yerleştirildi

Tablo 3.3. Bir reaksiyon için qPCR bileşenlerinin miktarı

Bileşenler	Hacim (µl)
RT ² SYBR Green Mastermiks	12,5
cDNAsentez reaksiyonu	5
RT ² qPCR primeri	1
RNaz içermeyen H ₂ O	6,5
Toplam hacim	25

MMP-9, TIMP-1, Noç-4 ve GAPDH primerlerine ait döngü koşulları cihazın bağlı olduğu bilgisayarda Tablo 3.4’de verildiği gibi ayarlanıp, reaksiyon başlatıldı.

Tablo 3. 4. MMP-9, TIMP-1, Noç-4 ve GAPDH primerleri için uygun döngü koşulları

Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10 dk	95°C
40	15 sn 1 dk	95°C 60°C

Deneylerde tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3 kez çalışılarak, bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanıldı. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır. nNav 1. 5 primeri önceden optimize edilmediğinden döngü koşulları ve RT-PCR tepkime karışımı diğer primerlerden farklıdır (Tablo 3.5, Tablo 3.6).

Tablo 3.5. Bir reaksiyon için nNav1.5 primerine ait qPCR karışımı

Bileşenler	Hacim
2x QuantiTect SYBR Green Mastermix	25 µl
Reverse Primer	1,5 µl
Forward Primer	1,5 µl
RNaz içermeyen H ₂ O	17 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 3. 6. nNav1.5 primeri için uygun döngü koşulları

Döngü	Süre	Sıcaklık
45	15 sn	94°C
	30 sn	55°C
	30 sn	72°C

3.2.9. Jelatin Zimografi

Zimografi proteolitik aktivitenin incelenmesinde kullanılan elektroforetik bir yöntemdir. Bu teknik, SDS-PAGE jel içine ilgili MMP enziminin substratı eklenerek örnek içindeki enzimin bu substratı tüketmesi esasına dayanır. Jelatin zimografi yönteminde ise jelatinaz enzim grubunun substratı olan jelatin, yürütücü jeli oluşturan akrilamid ile kopolimerize olur. MMP-2 (72 kDa) ve MMP-9 (92 kDa) indirgen olmayan koşullar altında elektrik alanda moleküler ağırlıklarına uygun bölgeye göç ederler. Jelatin zimografi yöntemi kullanılarak MMP-2 ve MMP-9'un hem zimojen, hem de aktif formları aynı jel üzerinde saptanır. Diğer taraftan, jel üzerinde MMP-9 ve MMP-2 dışında MMP-1, MMP-8 ve MMP-13 gibi diğer matriks metalloproteinazlar da görülebilir, fakat jelatin bu enzimlerin esas substratı olmadığından sinyal gücü zayıf olacaktır. Jelatin zimografi yöntemi 10 pg MMP-2'yi belirleyecek kadar hassas bir yöntemdir (108, 109).

Zimografi için 24 kuyucuklu plakaların her kuyusuna 16×10^4 hücre ekildi. Tutunmaları için 24 saat inkübatörde bırakıldı. Bu sürenin sonunda mikroskop altında hücrelerin tutunup tutunmadığı kontrol edilerek, hücreler steril PBS ile yıkandı. Serumsuz besiyeri ile hazırlanan inhibitörler kuyulara eklendi. İnhibitör ile

inkübasyon süresi tamamlanan örneklerin besiyeri Ependorf tüpe alınarak zimografi yapılacak zamana kadar - 80 °C 'de saklandı. Yönteme geçilmeden önce stok ayrıştırıcı jel tamponu (1.88 M Tris-baz pH 8.8), deriştirici jel tamponu (1.25 M Tris-HCl pH 6.8), % 20'lik SDS çözeltisi, yürütme tamponu (0,25 M Tris- 1,92 M glisin pH8.3), örnek yükleme tamponu (0.25 M Tris-HCl, % 40 Gliserol, % 8 stok SDS, % 0.2 Bromfenol mavisi), renatüre edici çözelti (% 25 Triton X-100) ve *developer* tamponu (0.5 M Tris-baz, 2M NaCl, 0.05M CaCl₂, % 0.2 Brij 35 pH7.8) hazırlandı. Stok çözeltilerden ayrıştırıcı jel tamponu, deriştirici jel tamponu, yürütme tamponu, renatüre edici çözelti 10X, örnek yükleme tamponu 4X olarak hazırlandı. Stok çözeltiler uygulamada 1X olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı.

Ayrıştırıcı jel % 10, deriştirici jel % 5 olacak şekilde hazırlandı (Tablo 3.7). Ayrıştırıcı jel donduktan sonra paketleyici jel ayırıcı jel üzerine dökülmüş ve örneklerin uygulanacağı kuyucukların oluşturulması amacıyla jel üzerine tarak yerleştirilerek polimerize olması beklendi. Polimerizasyon sonrasında taraklar dikkatlice çıkarılarak kuyular distile su ile yıkandı. Hazırlanan jeller elektroforez tankına yerleştirilip, tanka 1X SDS yürütme tamponu eklendi. Örneklerdeki protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenip, her kuyuya 680 ng protein ile örnek yükleme çözeltisi ve kuyulardan birine de 8µl protein belirteci yüklendi. Örnekler 125V sabit voltajda 1,5 saat yürütüldü. Elektroforezden sonra jellerden SDS'i uzaklaştırmak için jeller 30 dakika % 25'lik Triton X-100 renatürasyon çözeltisi ile inkübe edildi.

Tablo. 3.7. Jelatin zimografi jellerinin hazırlanışı

Reaktif	% 10 Ayrıştırıcı Jel	% 5 Deriştirici Jel
Distile su	5. 4 ml	5. 5 ml
% 1 Jelatin substratı	1. 5 ml	-
% 30 Akrilamid-bisakrilamid	5. 0 ml	50 µl
% 10'luk APS	45 µl	37. 5 µl
TEMED	9 µl	5 µl
Ayrıştırıcı jel tamponu	3 ml	-
Deriştirici jel tamponu	-	1 ml

Daha sonra jeller, enzimlerin (MMP-2 ve MMP-9) jel içindeki substratlarını (jelatin) tüketmelerini sağlamak için 15 saat 37°C’de aktivasyon tamponunda inkübe edildikten sonra boya çözeltisi (% 5 metanol, % 10 asetik asit, % 0.5 Coomassie Brilliant Blue R-250) ile boyandı ve boya açma çözeltisi (% 5 metanol, % 10 asetik asit) ile zemindeki boyanın fazlası giderildi. Jel üzerinde MMP-2 ve MMP-9 enzimlerine ait pro ve aktif formlar mavi zemin üzerinde litik alanlar şeklinde görülüp, litik alanlar yoğunluk analiz programı (Image QuantTL) ile değerlendirildi.

3.2.10. Çizik Kapama Yöntemiyle Hücre Göç Etme Potansiyelini Ölçme Testi

Çizik kapama yöntemiyle hücre göç etme potansiyelini ölçme testi (*wound healing*) *in vitro* koşullarda doğrusal hücre göçünü çalışmak için geliştirilmiş basit ve pahalı olmayan bir yöntemdir. Bu yöntemde tek katman oluşturmuş hücrelerin ekili olduğu yüzey üzerinde yara bölgeleri oluşturulur ve başlangıçtaki yara genişliği ve belirlenen zamanlardaki yara genişliği ölçülür. Bu alanlar karşılaştırılarak göç eden hücrelerin oranı belirlenir (113).

Uygulamada, hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekilmeden önce plakanın altına 1 cm genişliğinde bir belirteç çizildi. Daha sonra plakaların her bir kuyusuna 50×10^4 hücre ekilerek, tutunmaları için 24 saat etüvde inkübe edildi. Hücrelerin tutunup tutunmadığı mikroskop altında kontrol edildikten sonra 1000 µl’lik pipet ucuyla belirteç çizgisini üç farklı bölgeden dik kesen yaralar oluşturuldu. Yara oluşturulan kuyulardaki besiyeri çekildikten sonra hücreler PBS ile yıkanıp, PBS çekildikten sonra inhibitör uygulaması yapıldı. Uygulamadan hemen sonra (0. saat) ve uygulamadan 24 saat sonra yaralardaki kapanma ters fazlı mikroskopta 40X objektif kullanılarak görüntülendi.

3.3. İstatistiksel Analizler

SPSS 15.0 programı kullanılarak hücrelere uygulanan inhibitörlerin hücre canlılığı ve hücre göçü üzerindeki etkinliği ‘iki yönlü ve tek yönlü tekrarlı ölçüm testi’ ile saptandı. Ayrıca gen ifadesi değişikliklerinin tanımlayıcı istatistikleri belirlendi. Buna göre $P \leq 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

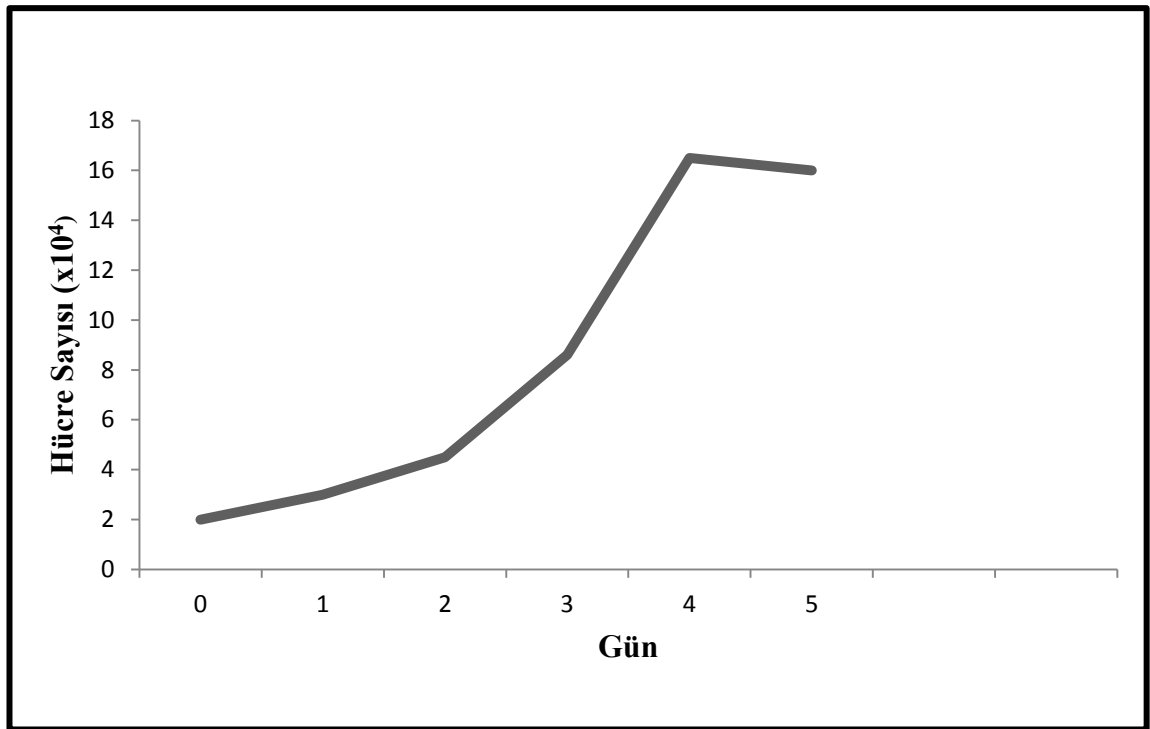
4.1. MDA-MB-231 İnsan Meme Kanseri Hücre Sayısının İkiye Katlanma Süresinin Belirlenmesi

Hücre sayısının ikiye katlanma süresinin belirlenmesi için 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 2×10^4 hücre/ml ekildi. İlk gün yapılan sayım sonucunda hücre sayısı 2×10^4 h/kuyu iken, dördüncü gün 16×10^4 h/kuyu olarak sayıldı. Dördüncü günden sonra ise hücre sayısında bir artış görülmedi. $DT = T \ln 2 / \ln(X_e/X_b)$ formülü kullanılarak hücrelerin iki katına ulaştığı süre belirlendi. Buna göre $DT = 4 \ln 2 / \ln(16 \times 10^4 / 2 \times 10^4) = 1.33$ gün = 32 saat MDA-MB-231 hücrelerinin ikiye katlandığı süre olarak hesaplandı.

T, herhangi bir zamandaki inkübasyon süresi

X_b, İnkübasyonun başlangıcındaki hücre sayısı

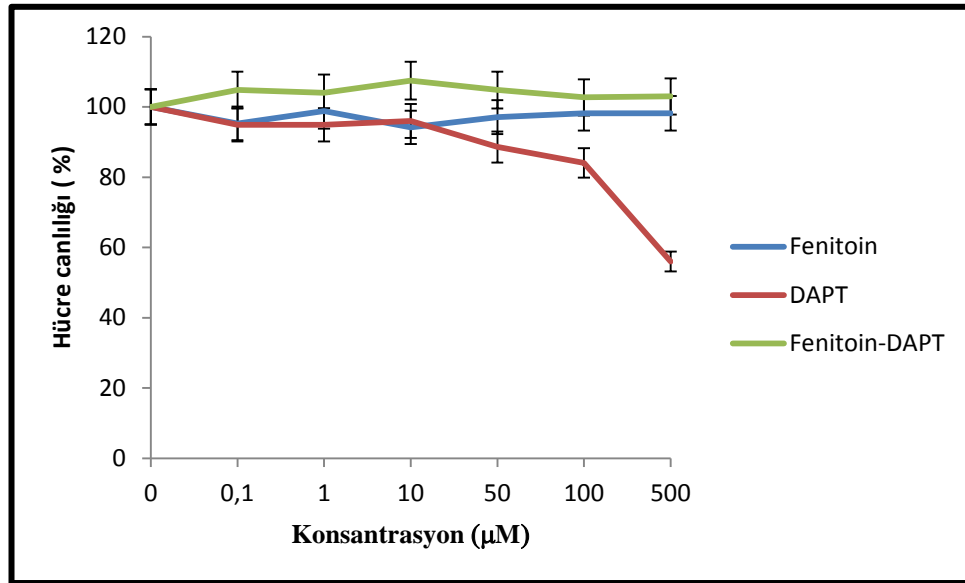
X_e, inkübasyon süresinin sonundaki hücre sayısı



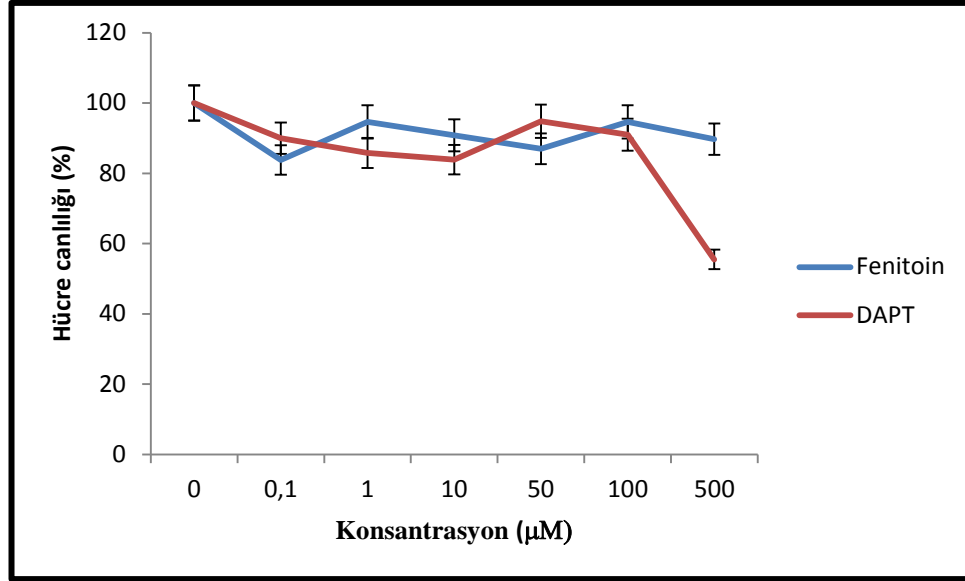
Şekil 4.1. MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalma eğrisi

4.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde Sitotoksikite Çalışmaları

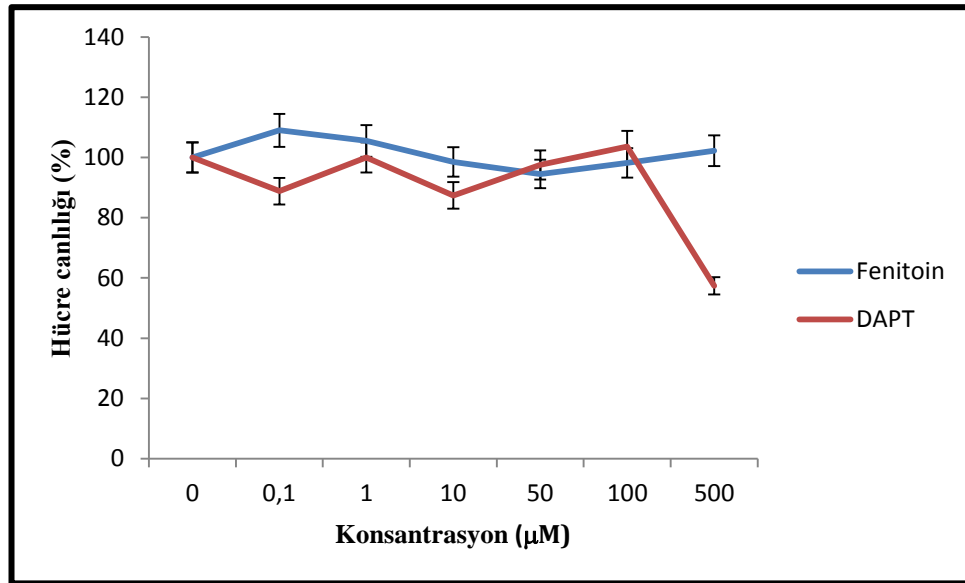
Çalışmamızda MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri üzerinde Noç-4 reseptör inhibitörü DAPT ve voltaja duyarlı sodyum iyon kanalı inhibitörü fenitoinin 0,1-500 μM olmak üzere geniş aralıkta uygulanan dozlarının hücre canlılığına olan etkisi 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde araştırıldı. Test sonuçlarına göre canlı hücre oranları grafiklerde gösterildi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4). İnhibitörlerin etkinlik ölçütü olan hücrelerin % 50' sini öldüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri hesaplandı. Buna göre, DAPT için etkin süre 24 saat ve etkin doz 690 μM ve üzeri olduğu belirlendi. Zaman ve konsantrasyon düzeyleri bakımından istatistiksel açıdan anlamlı fark vardır ($P=0.0001$). Voltaja duyarlı sodyum kanallarının hücre çoğalması üzerinde etkisi olmadığından dolayı kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında fenitoin uygulanmış hücrelerin, çoğalmasında herhangi doz ve zamanda bir fark görülmedi. ($P < 0.05$). DAPT'ın etki süresi göz önünde bulundurularak bu iki inhibitörün birlikte hücrelere uygulanması sonucunda hücre çoğalması değişmemiş ve her hangi bir sitotoksik etki oluşmamıştır ($P=0.186$).



Şekil 4.2. DAPT, fenitoin ve DAPT-fenitoin kombinasyonunun 0-500 μM doz aralığında ve 24 saatlik inkübasyonu sonucunda MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi



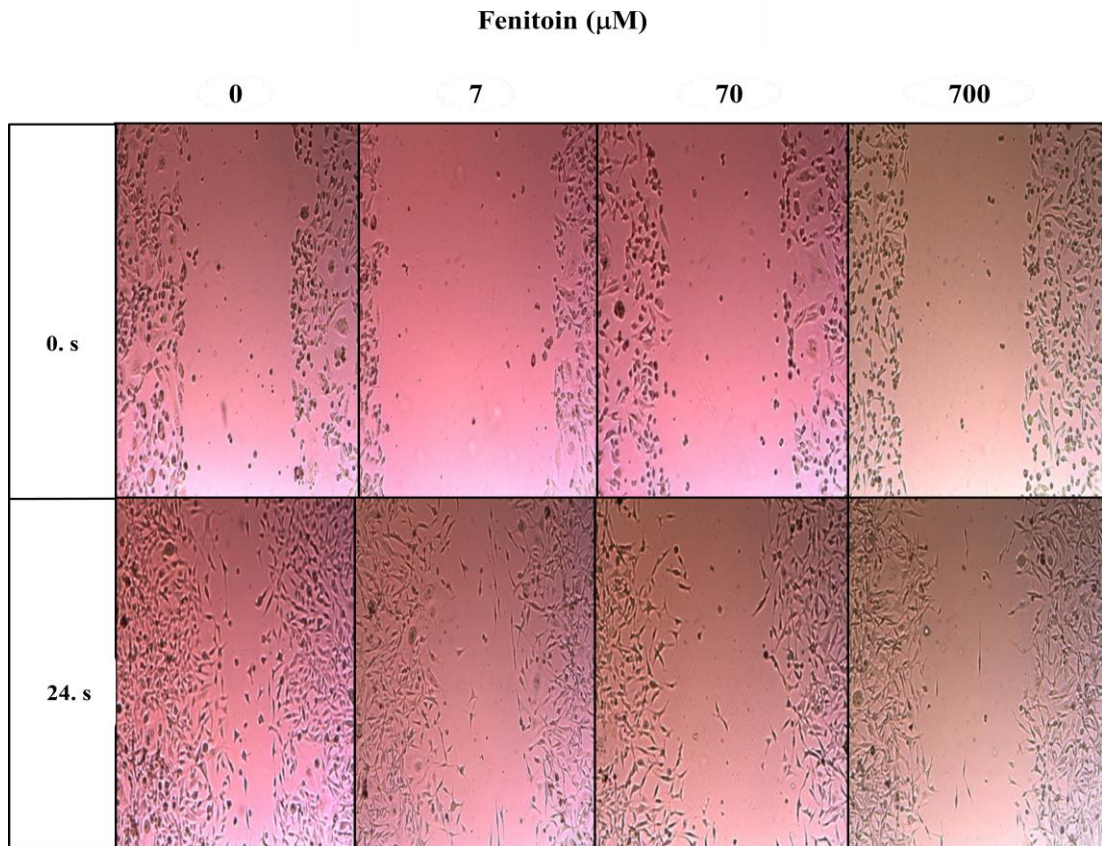
Şekil 4.3. DAPT ve fenitoinin 0-500 µM doz aralığında ve 48 saatlik inkübasyon sonucu MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi



Şekil 4.4. DAPT ve fenitoinin 0-500 µM doz aralığında ve 72 saatlik inkübasyon sonucu MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi

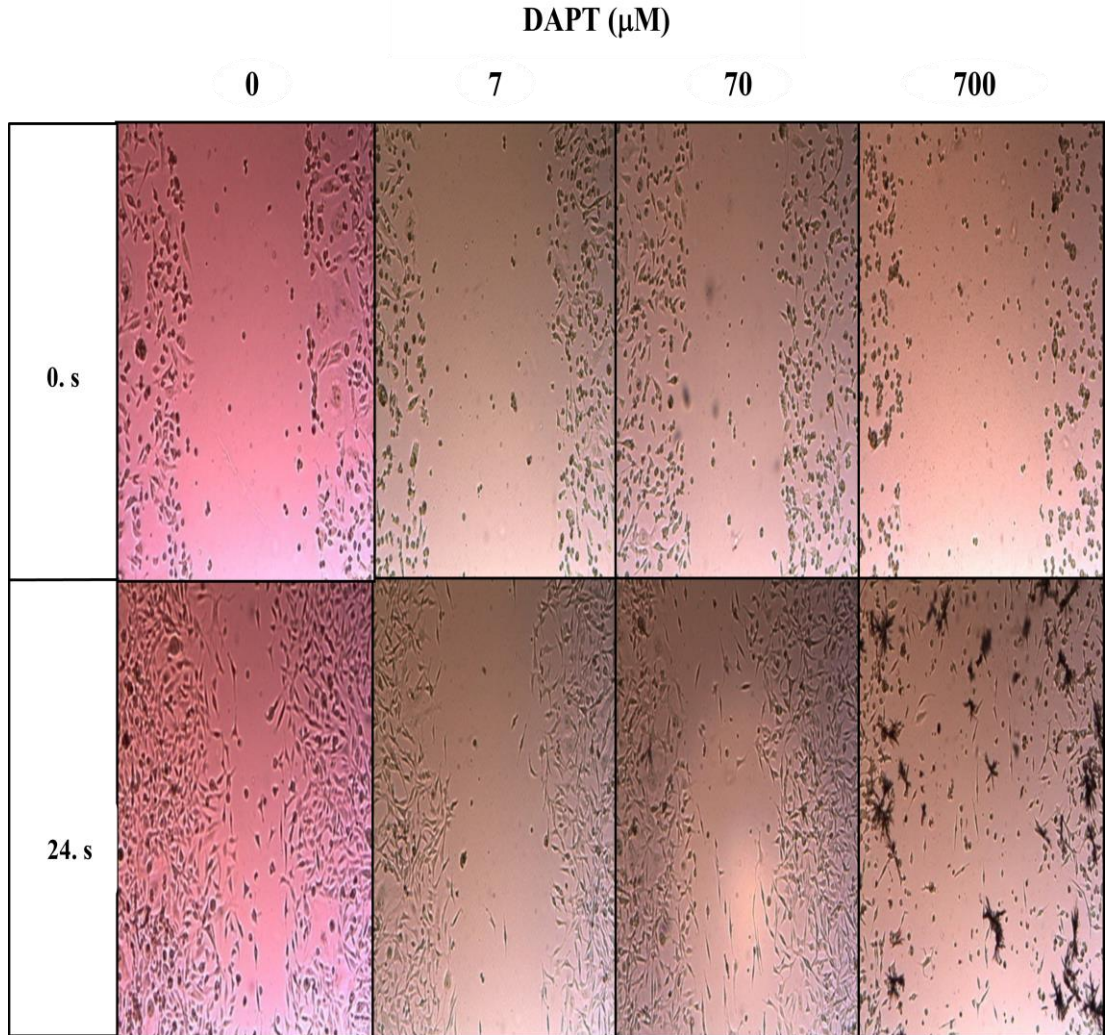
4.3.Çizik Kapama Yöntemiyle Hücre Göç Etme Potansiyelini Ölçme Testi

Altı kuyucuklu plakalara 50×10^4 hücre/kuyucuk ekildi. Kuyucukların altına önceden çizilmiş olan belirtecin üzerindeki üç farklı noktadan pipet ucu ile yara oluşturuldu. Daha sonra hücrelere 7-70-700 μM dozlarda fenitoin, DAPT ve bu iki inhibitörün birlikte aynı dozlarda verilmesinden hemen sonra ve 24 saat sonra yara genişlikleri 40X büyütme ile ters fazlı mikroskopta görüntülenip (Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7), yara kapanma oranları her bir örnek için kendi kontrolleri ile karşılaştırılarak hesaplandı (Şekil 4.8). Mikroskobik görüntüleme sonuçlarına göre fenitoin, DAPT ve fenitoin-DAPT'ın farklı konsantrasyonlarda uygulanmaları sonucu hücre göçü oranlarında saptanan farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır. ($P=0.001$). Fenitoin uygulamasında 70 μM ve 700 μM dozlarda hücre göçü % 87,7, 7 μM dozda ise % 20 inhibe oldu (Şekil 4.5, 4.8).



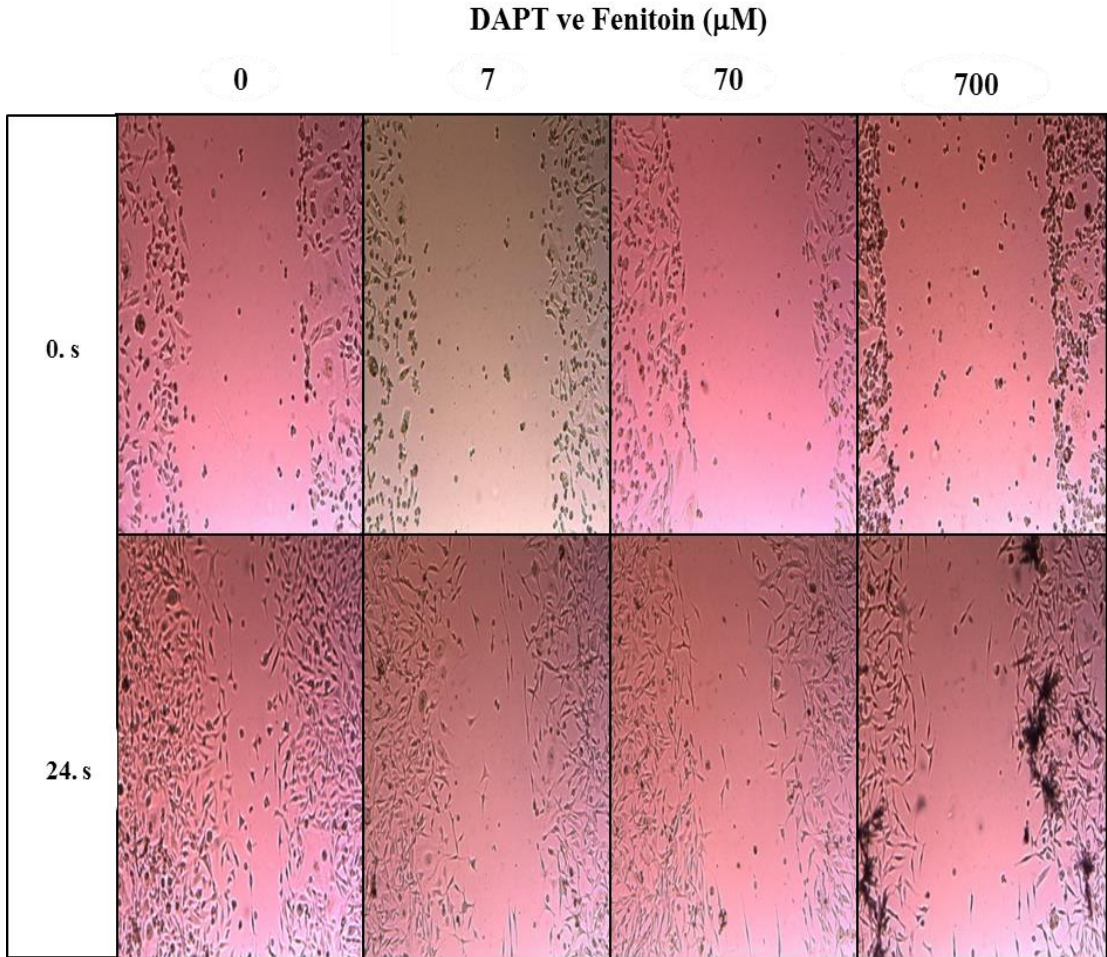
Şekil 4.5. Yara oluşturulmuş MDA-MB-231 hücrelerinde, hücre göçünün fenitoin (7-70-700 μM) uygulamasından hemen sonra ve 24 saat sonra ters fazlı mikroskopla görüntülenmesi (40x)

Gama sekretaz inhibitörü olan DAPT hücelere, 7 μM konsantrasyonda uygulandığın da hücre göçü % 49, 70 μM 'da % 61, 700 μM 'da ise % 82 oranında inhibe oldu (Şekil 4.6, 4.8).

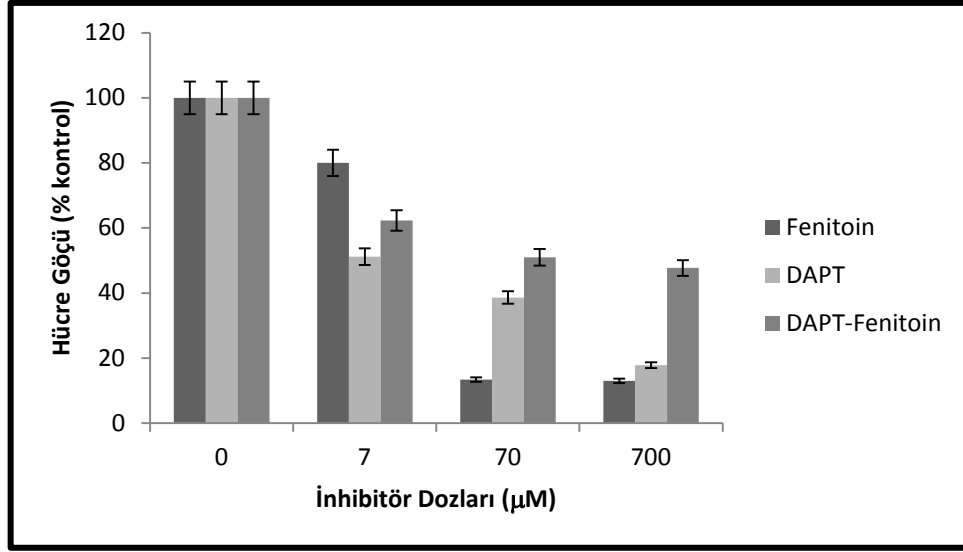


Şekil 4.6. Yara oluşturulmuş MDA-MB-231 hücelerinde, hücre göçünün DAPT (7-70-700 μM) uygulamasından hemen sonra ve 24 saat sonra ters fazlı mikroskopla görüntülenmesi (40x)

Gama sekretaz inhibitörü DAPT ve sodyum iyon kanalı inhibitörü fenitoin birlikte hücelere eşit dozlarda verildi. Buna göre hücre göçü, 7 μM 'da % 37, 70 μM 'da % 49, 700 μM 'da ise % 52 azaldı (Şekil 4.7, 4.8).



Şekil 4.7. Yara oluşturulmuş MDA-MB-231 hücrelerinde, hücre göçünün DAPT ve fenitoinin (7-70-700 μM) birlikte uygulanmasından hemen sonra ve 24 saat sonra ters fazlı mikroskopta görüntülenmesi (40x)



Şekil 4. 8. Yara oluşturulmuş yüzeyde MDA-MB-231 hücrelerinin fenitoin, DAPT ve bu inhibitörlerin her ikisi ile birlikte (7, 70, 700 µM) 24 saat inkübasyonu sonucu hücre göçü oranları

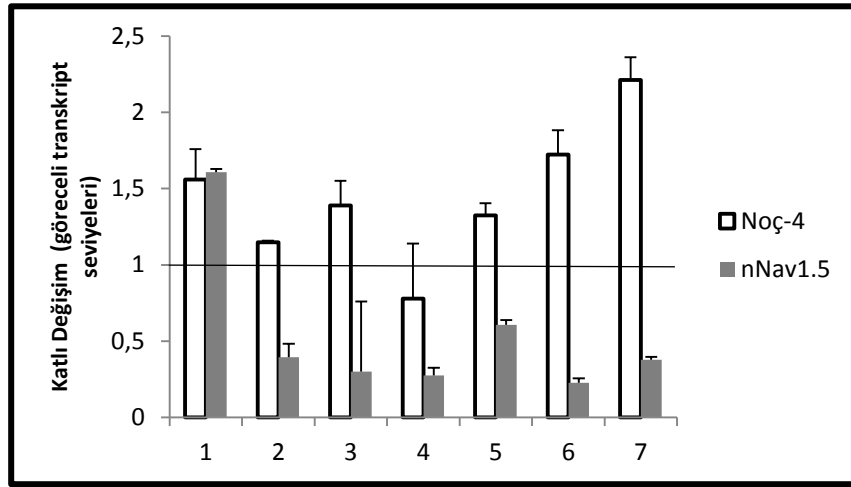
4.4.MDA-MB-231 Hücrelerinde Gen İfadesi Değişiklikleri

Bu çalışmada, MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerine 7, 70, 700 µM DAPT, 70 µM fenitoin ve 70 µM fenitoin ile birlikte DAPT'ın üç farklı dozu hücrelere birlikte verilerek 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonun ardından RT-PCR ile Noç-4, nNav1.5, MMP-9 ve TIMP-1 genlerinin ifadesi araştırıldı. RT-PCR sonuçları *Rotor Gene Q* yazılımı ile kantite edilerek, istatistiksel analizleri yapıldı. Noç-4, nNav1.5, MMP-9, TIMP-1 genlerinin verileri GAPDH geniyle normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünden elde edilen veriler kullanıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerinin 1'den büyük olması gen ifadesinin arttığını, küçük olması ise gen ifadesinin azaldığını gösterir.

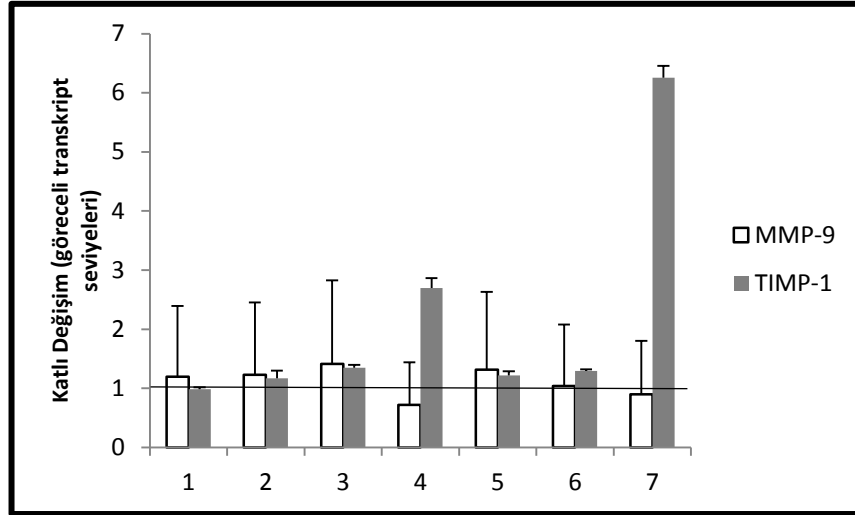
24 saatlik inkübasyon sonucu Şekil 4.9-A'da görüldüğü üzere; 70 µM fenitoin-7 µM DAPT, 70 µM fenitoin-70 µM DAPT, 70 µM fenitoin-700 µM DAPT, 70 µM DAPT ve 700 µM DAPT dozlarında nNav1.5 gen ifadesinin kontrole göre sırasıyla 0.6, 0.7, 0.72, 0.77, 0.62 kat azaldığı saptandı. Noç-4 gen ifadesi ise 700 µM fenitoin,70 µM fenitoin-70 µM DAPT, 7 µM DAPT, 70 µM DAPT ve 700 µM DAPT uygulaması sonucunda sırasıyla 0.56, 0.4, 0.3, 0.7 ve 1.2 kat artarken 70 µM fenitoinin 700 µM DAPT ile birlikte uygulanması sonucu 0,22 kat azalmıştır. MMP-9 gen ifadesi 70 µM fenitoin, 70 µM fenitoin-7 µM DAPT, 70 µM fenitoin-70 µM

DAPT ve 7 μ M DAPT uygulaması sonucu sırasıyla, 0.2, 0.23, 0.4 ve 0.3 kat artarken, 70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT uygulamasında 0.3 kat artarken, 700 μ M DAPT uygulaması sonucu 0.1 kat azaldı. TIMP-1 gen ifadesi ise 70 μ M fenitoin uygulaması sonrasında 0.02 kat azalırken, 70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT, 7 μ M DAPT, 70 μ M DAPT ve 700 μ M DAPT uygulaması sonucu sırasıyla 0.16, 0.35, 1.7, 0.22, 0.3, 5.26 kat arttığı saptandı (Şekil 4.9-B).

A.



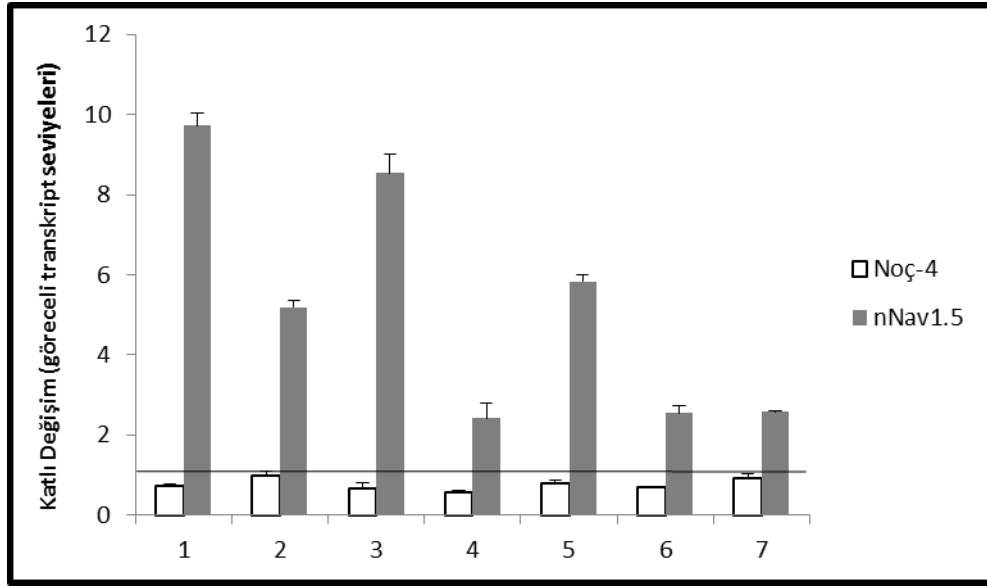
B.



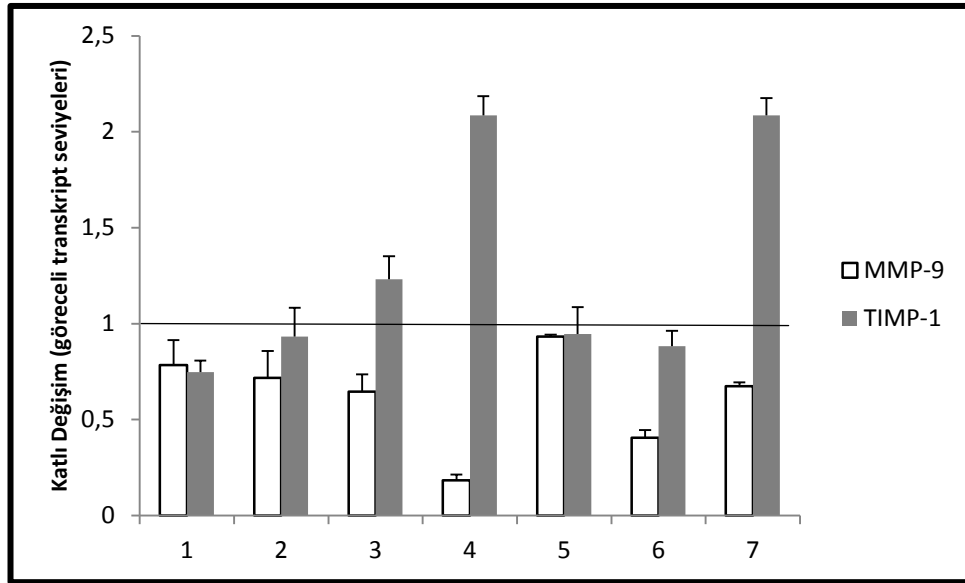
Şekil 4.9. 24 saatlik DAPT ve fenitoin uygulaması sonucu **A.** Noç-4, nNav1.5 ve **B.** MMP-9, TIMP-1 gen ifadelerindeki değişiklikler. 1: 70 μ M fenitoin, 2: 70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT, 3: 70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT, 4: 70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT, 5: 7 μ M DAPT, 6: 70 μ M DAPT, 7: 700 μ M DAPT uygulanmış örnekler.

48 saatlik inkübasyon sonucu genlerin ifadesindeki değişiklikler Şekil 4.10'da özetlendi. Buna göre; Noç-4 gen ifadesi 70 µM fenitoin, 70 µM fenitoin-70 µM DAPT, 70 µM fenitoin-700 µM DAPT, 7 µM DAPT, 70 µM DAPT ve 700 µM DAPT uygulaması sonucunda sırasıyla 0.28, 0.33, 0.5, 0.22, 0.32, 0.07 kat azaldı. 70 µM fenitoin, 70 µM fenitoin-7 µM DAPT, 70 µM fenitoin-70 µM DAPT, 70 µM fenitoin-700 µM DAPT, 7 µM DAPT ve 70 µM DAPT uygulamaları sonucu nNav 1.5 gen ifadesi sırasıyla 8.7, 4.2, 7.6, 1.42, 4.8, 1.6 kat artarken 700 µM DAPT uygulaması sonucu gen ifadesi 0.14 kat azaldı (Şekil 4.10-A). MMP-9 gen ifadesi 70 µM fenitoin, 70 µM fenitoin-7 µM DAPT, 70 µM fenitoin-70 µM DAPT, 70 µM fenitoin-700 µM DAPT, 7 µM DAPT, 70 µM DAPT ve 700 µM DAPT uygulaması sonucu sırasıyla 0.22, 0.28, 0.35, 0.82, 0.05, 0.59, 0.33 kat azaldığı saptandı. TIMP-1 gen ifadesi ise 70 µM fenitoin, 70 µM fenitoin-7 µM DAPT, 7 µM DAPT ve 70 µM DAPT uygulaması sonucu sırasıyla 0.25, 0.07, 0.05 ve 0.12 kat azalırken, 70 µM fenitoin-70 µM DAPT, 70 µM fenitoin-700 µM DAPT, 700 µM DAPT uygulaması sonucu sırasıyla 0.23, 1.1 ve 1.1 kat arttığı saptandı (Şekil 4.10-B).

A.



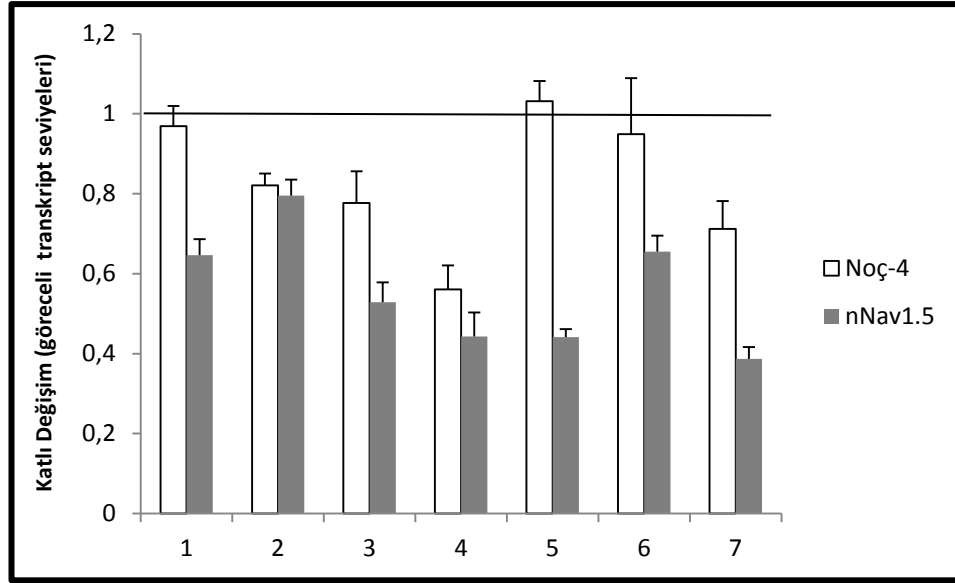
B.



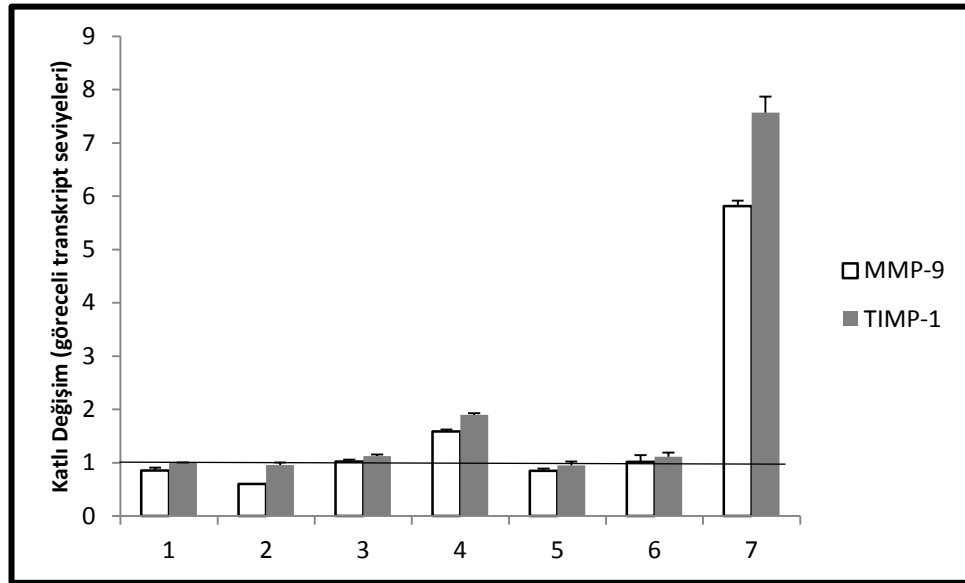
Şekil 4.10. 48 saatlik DAPT ve fenitoin uygulaması sonucu **A.** Noç-4, nNav1.5 ve **B.** MMP-9, TIMP-1 gen ifadelerindeki değişiklikler. 1: 70 μ M fenitoin, 2: 70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT, 3: 70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT, 4: 70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT, 5: 7 μ M DAPT, 6: 70 μ M DAPT, 7: 700 μ M DAPT uygulanmış örnekler.

72 saat sonrası gen ifadeleri incelendiğinde; Noç-4 gen ifadesi 70 µM fenitoin, 70 µM fenitoin- 7 µM DAPT, 70 µM fenitoin-70 µM DAPT, 70 µM fenitoin-700 µM DAPT, 70 µM DAPT, 700 µM DAPT uygulamasında sırasıyla 0.03, 0.18, 0.22, 0.51, 0.05, 0.29 kat azaldığı saptandı. nNav1.5 gen ifadesinin ise 70 µM fenitoin, 70 µM fenitoin- 7 µM DAPT, 70 µM fenitoin-70 µM DAPT, 70 µM fenitoin-700 µM DAPT, 7 µM DAPT, 70 µM DAPT, 700 µM DAPT farklı dozlarda inhibitör uygulaması sonucunda sırasıyla 0.35, 0.2, 0.48, 0.52, 0.56, 0.34 ve 0.61 kat azaldığı saptandı (Şekil 4.11-A). MMP-9 gen ifadesi 70 µM fenitoin, 70 µM fenitoin-7 µM DAPT ve 7 µM DAPT uygulaması sonucu sırasıyla 0.14, 0.4 ve 0.15 kat azalırken, 70 µM fenitoin-700 µM DAPT ve 700 µM DAPT uygulaması sonrasında MMP-9 gen ifadesi sırasıyla 0.59 ve 4.82 kat artmıştır. 70 µM fenitoin-70 µM DAPT, 70 µM fenitoin- 700 µM DAPT, 70 µM DAPT ve 700 µM DAPT dozlarında inhibitör kullanılması sonucu TIMP-1 gen ifadesi sırasıyla 0.13, 0.89, 0.11 ve 6.57 kat arttığı saptandı (Şekil 4.11-B).

A.



B.

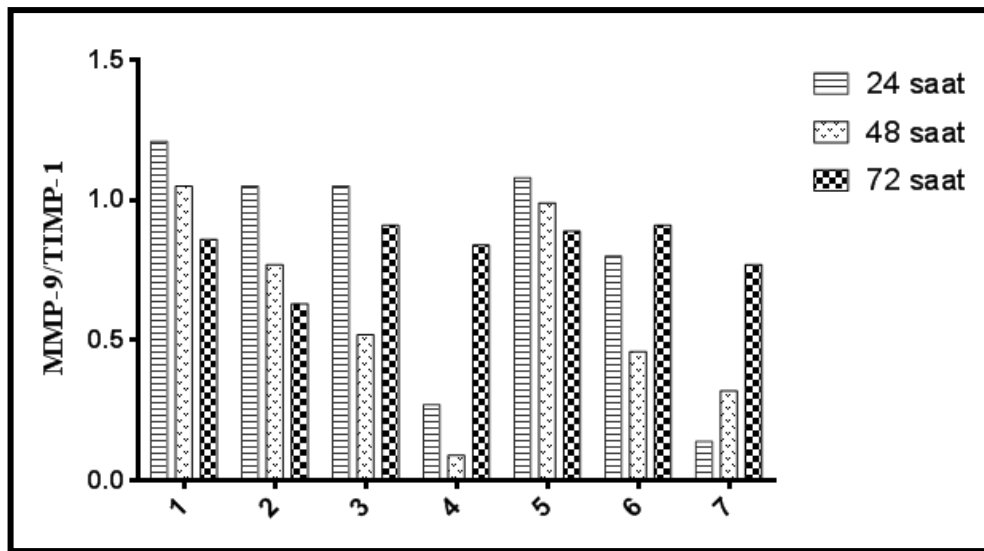


Şekil 4.11. 72 saatlik DAPT ve fenitoin uygulaması sonucu **A.** Noç-4, nNav1.5 ve **B.** MMP-9, TIMP-1 gen ifadelerindeki değişiklikler. 1: 70 μ M fenitoin, 2: 70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT, 3: 70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT, 4: 70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT, 5: 7 μ M DAPT, 6: 70 μ M DAPT, 7: 700 μ M DAPT uygulanmış örnekler.

Şekil 4.12’de görüldüğü üzere, 24 saatlik inhibitör uygulaması sonucu MMP-9/TIMP-1 oranları; 70 μ M fenitoin, 70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT ve 7 μ M DAPT dozları için sırasıyla % 21,% 5, % 5 ve % 8 artarken, 70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT, 70 μ M DAPT, 700 μ M DAPT inhibitör dozlarında ise sırasıyla % 73, % 20 ve % 86 azaldı.

48 saatlik inkübasyon sonucu MMP-9/TIMP-1 oranları, 70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT, 7 μ M DAPT, 70 μ M DAPT ve 700 μ M DAPT uygulaması sonucu sırasıyla % 33, % 48, % 9, % 1, % 54 ve % 68 oranında azalırken, 70 μ M fenitoin uygulaması sonucu % 5 arttı.

72 saat sonra MMP-9/TIMP-1 oranları; 70 μ M fenitoin, 70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT, 7 μ M DAPT, 70 μ M DAPT ve 700 μ M DAPT uygulaması sonucu sırasıyla % 14, % 37, % 9, % 16, % 11, % 9 ve % 23 oranında azalma olduğu saptandı.



Şekil 4.12. 24, 48 ve 72 saat DAPT ve fenitoin uygulamasından sonra MMP-9 ve TIMP-1 gen ifadelerinin katlı değişim oranları. 1: 70 μ M fenitoin, 2: 70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT, 3: 70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT, 4: 70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT, 5: 7 μ M DAPT, 6: 70 μ M DAPT, 7: 700 μ M DAPT uygulanmış örnekler.

Tablo 4.1. Fenitoin ve DAPT ile 24 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen gen ifadesi değişikliklerinin tanımlayıcı istatistikleri (ortalama \pm standart sapma).

Örnekler	Noç-4	nNav1.5	MMP-9	TIMP-1
70 μ M fenitoin	1,93 \pm 0,2	1,67 \pm 0,02	1,42 \pm 0,09	1,06 \pm 0,03
70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT	1,15 \pm 0,009	0,63 \pm 0,09	1,23 \pm 0,97	1,17 \pm 0,13
70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT	1,39 \pm 0,18	0,30 \pm 0,46	1,41 \pm 0,08	1,35 \pm 0,05
70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT	0,78 \pm 0,36	0,28 \pm 0,05	0,72 \pm 0,14	2,7 \pm 0,17
7 μ M DAPT	1,32 \pm 0,08	0,61 \pm 0,03	1,32 \pm 0,03	1,22 \pm 0,07
70 μ M DAPT	1,72 \pm 0,16	0,23 \pm 0,03	1,04 \pm 0,09	1,3 \pm 0,03
700 μ M DAPT	2,21 \pm 0,15	0,38 \pm 0,02	0,9 \pm 0,04	6,26 \pm 0,2

Tablo 4.2. Fenitoin ve DAPT ile 48 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen gen ifadesi değişikliklerinin tanımlayıcı istatistikleri (ortalama \pm standart sapma).

Örnekler	Noç-4	nNav1.5	MMP-9	TIMP-1
70 μ M fenitoin	0,72 \pm 0,07	9,7 \pm 0,3	0,78 \pm 0,13	0,74 \pm 0,06
70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT	0,99 \pm 0,12	5,19 \pm 0,16	0,72 \pm 0,14	0,93 \pm 0,15
70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT	0,67 \pm 0,14	8,55 \pm 0,45	0,65 \pm 0,09	1,23 \pm 0,12
70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT	0,56 \pm 0,04	2,42 \pm 0,37	0,18 \pm 0,03	2,08 \pm 0,1
7 μ M DAPT	0,78 \pm 0,1	5,84 \pm 0,17	0,93 \pm 0,01	0,95 \pm 0,14
70 μ M DAPT	0,68 \pm 0,03	2,55 \pm 0,17	0,41 \pm 0,04	0,88 \pm 0,08
700 μ M DAPT	0,93 \pm 0,09	0,86 \pm 0,03	0,67 \pm 0,02	2,09 \pm 0,09

Tablo 4.3. Fenitoin ve DAPT ile 72 saatlik inkübasyon sonucu elde edilen gen ifadesi değişikliklerinin tanımlayıcı istatistikleri (ortalama \pm standart sapma).

Örnekler	Noç-4	nNav1.5	MMP-9	TIMP-1
70 μ M fenitoin	0,97 \pm 0,05	0,65 \pm 0,04	0,86 \pm 0,05	1 \pm 0,002
70 μ M fenitoin-7 μ M DAPT	0,82 \pm 0,03	0,80 \pm 0,04	0,6 \pm 0,001	0,96 \pm 0,05
70 μ M fenitoin-70 μ M DAPT	0,78 \pm 0,08	0,53 \pm 0,05	1,02 \pm 0,04	1,1 \pm 0,03
70 μ M fenitoin-700 μ M DAPT	0,56 \pm 0,06	0,44 \pm 0,06	1,59 \pm 0,04	1,90 \pm 0,03
7 μ M DAPT	1,03 \pm 0,05	0,44 \pm 0,02	0,85 \pm 0,04	0,95 \pm 0,07
70 μ M DAPT	0,95 \pm 0,14	0,66 \pm 0,04	1,01 \pm 0,13	1,1 \pm 0,08
700 μ M DAPT	0,71 \pm 0,07	0,39 \pm 0,03	5,8 \pm 0,1	7,6 \pm 0,3

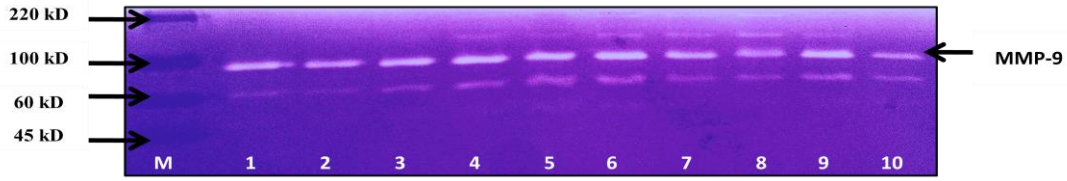
4.5. Jelatin Zimografi Analizleri

Matriks metalloproteinazların belirlenmesinde kullanılan zimografi yöntemi çizik kapanma yöntemi ile hücre göçü deneyi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir tepkimesinde kullanılan gama sekretaz inhibitörü DAPT ve voltaja duyarlı sodyum iyon kanalı inhibitörü fenitoinin kullanıldığı dozlarda kullanılarak, bu iki deneye paralel iki farklı jelatin zimografisi yapıldı. ImageQuant TL yazılımı ile bant yoğunlukları analiz edildi.

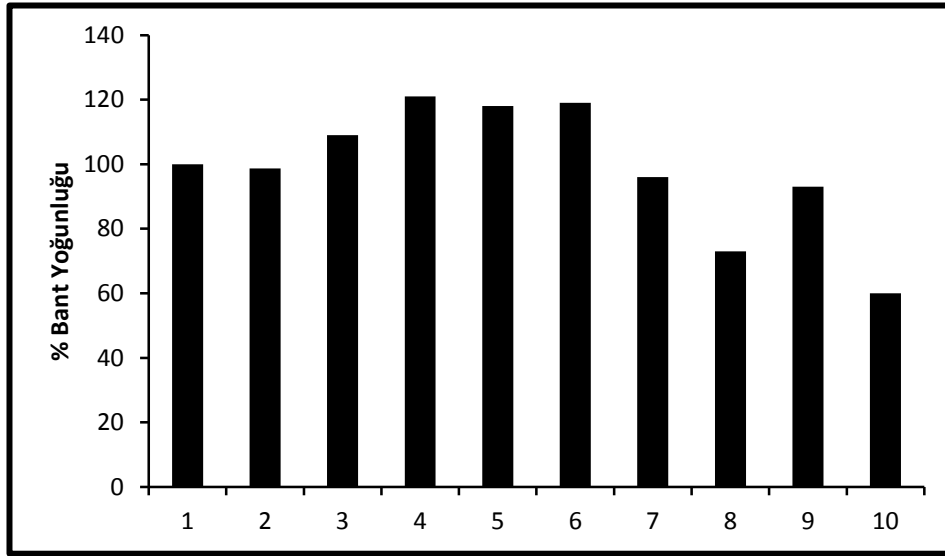
Hücrelerin DAPT ve fenitoin ile 24 saat inkübasyonu; 1. zimografi jeli hücre göçü, 2. zimografi jeli ise RT-PCR deneyinde uygulanan dozlara paralel olarak yapılmıştır.

MMP-9 bant yoğunluğu analizlerine göre, 7 μ M DAPT, 70 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 700 μ M DAPT, 700 μ M fenitoin ve 700 μ M DAPT-700 μ M fenitoin uygulaması sonucu sırasıyla bant yoğunlukları % 1.3, % 4, % 27, % 7 ve % 40 azalırken, 7 μ M fenitoin, 7 μ M DAPT-7 μ M fenitoin, 70 μ M DAPT ve 70 μ M fenitoin uygulaması sonucu MMP-9 proteinine ait bant yoğunlukları sırasıyla, % 9, % 21, % 18 ve % 19 oranında arttı (Şekil 4.13).

A.



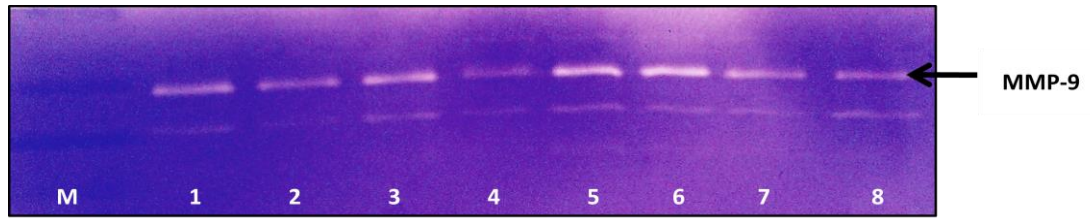
B.



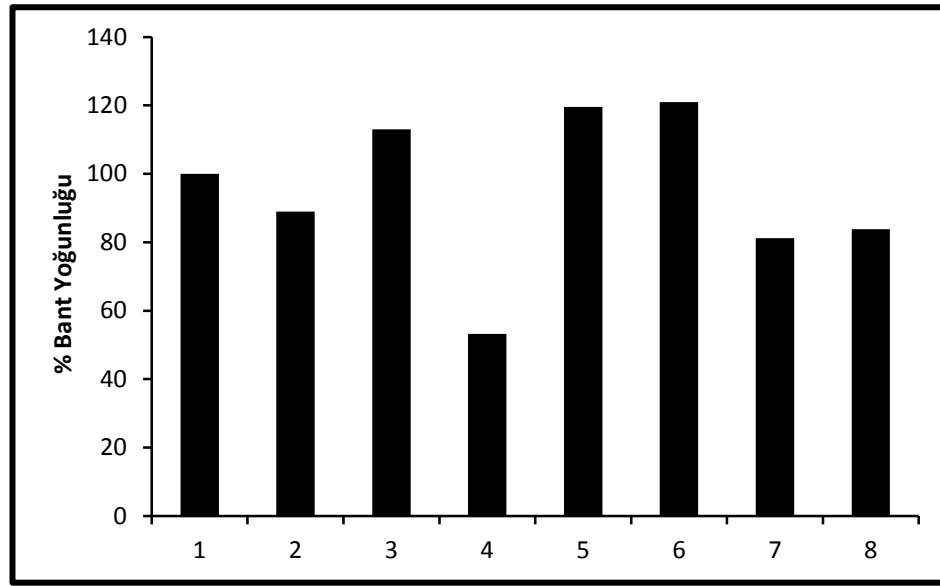
Şekil 4.13. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 24 saat inkübasyonu sonucu **A.**MMP-9'un jelatin zimografi ile görüntülenmesi. M: Protein molekül ağırlığı belirteci, 1: Kontrol 2: 7 μ M DAPT, 3: 7 μ M fenitoin, 4: 7 μ M DAPT-7 μ M fenitoin, 5: 70 μ M DAPT, 6: 70 μ M fenitoin, 7: 70 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 8: 700 μ M DAPT, 9: 700 μ M fenitoin, 10: 700 μ M DAPT-700 μ M fenitoin. **B.** Bantların yoğunluk analizleri (%)

MMP-9 bant yoğunluğu, 7 μ M DAPT, 700 μ M DAPT ve 70 μ M DAPT-70 μ M fenitoin uygulaması sonucu kontrole göre sırasıyla % 11, % 46.8, % 18.8 ve % 16.2 azalırken, 70 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin ve 7 μ M DAPT-70 μ M fenitoin uygulaması sonucu sırasıyla % 13, % 19.6 ve % 21 oranında artış saptandı (Şekil 4.14).

A.



B.

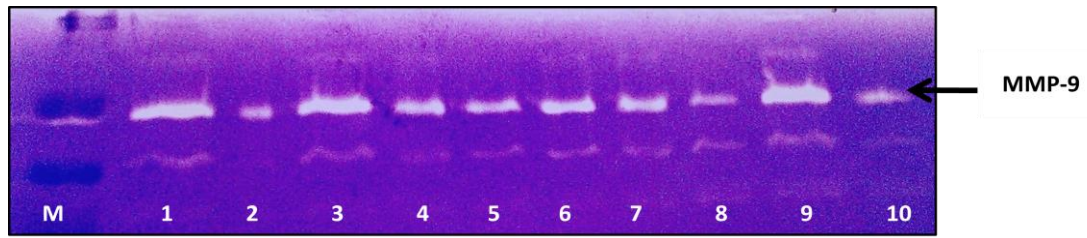


Şekil 4.14. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 24 saat inkübasyonu sonucu **A.** MMP-9'un jelatin zimografi ile görüntülenmesi. M: Protein molekül ağırlığı belirteci, 1: Kontrol, 2: 7 μ M DAPT, 3: 70 μ M DAPT, 4: 700 μ M DAPT, 5: 70 μ M fenitoin, 6: 7 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 7: 70 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 8: 700 μ M DAPT-70 μ M fenitoin. **B.** Bantların yoğunluk analizleri (%)

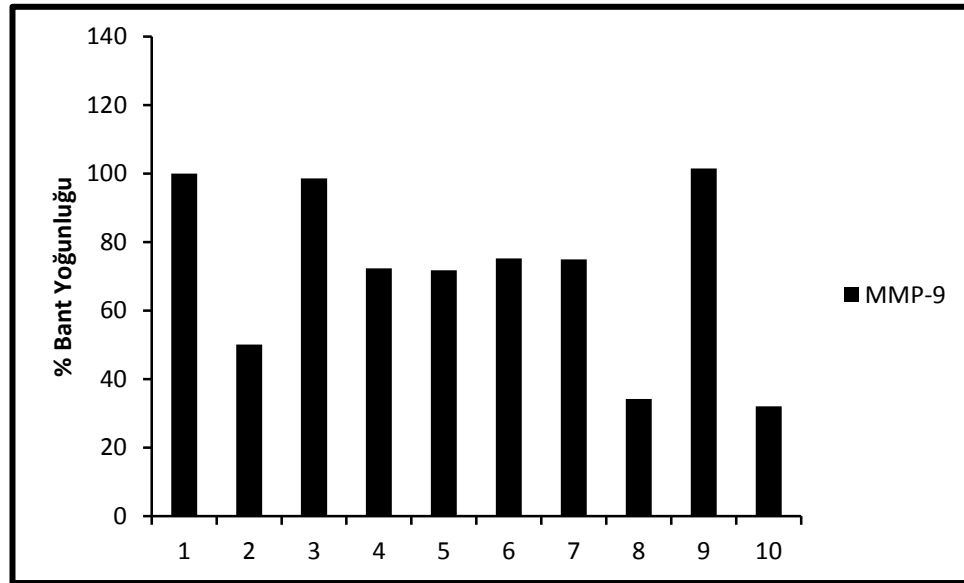
Hücrelerin DAPT ve fenitoin ile 48 saat inkübasyonu; 1. zimografi jeli hücre göçü, 2. zimografi jeli ise RT-PCR deneyinde uygulanan dozlara paraleldir.

MMP-9 proteinine ait bant yoğunluğu 7 μ M DAPT, 7 μ M fenitoin, 7 μ M DAPT-7 μ M fenitoin, 70 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin, 70 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 700 μ M DAPT, 700 μ M DAPT-700 μ M fenitoin uygulaması sonucu sırasıyla % 49.9, % 1.4, % 27.7, % 28.2, % 24.8, % 25.1, % 65.8 azalırken, 700 μ M fenitoin uygulanmış örneklerde MMP-9 proteinine ait bant yoğunluğu % 1.5 artış gösterdi (Şekil 4.15).

A.



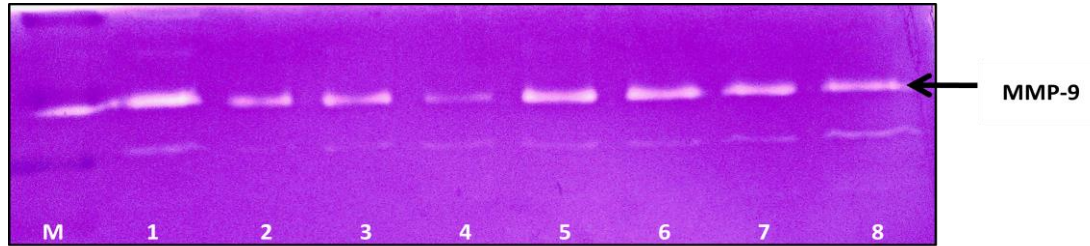
B.



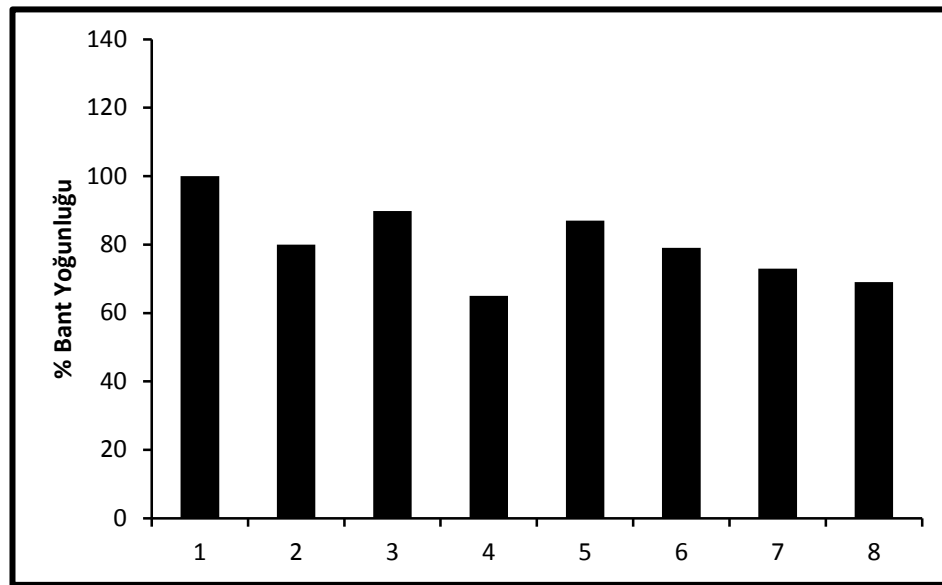
Şekil 4.15. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 48 saat inkübasyonu sonucu **A.** MMP-9'un jelatin zimografi ile görüntülenmesi. M: Protein molekül ağırlığı belirteci, 1: Kontrol 2: 7 μ M DAPT, 3: 7 μ M fenitoin, 4: 7 μ M DAPT-7 μ M fenitoin, 5: 70 μ M DAPT, 6: 70 μ M fenitoin, 7: 70 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 8: 700 μ M DAPT, 9: 700 μ M fenitoin, 10: 700 μ M DAPT-700 μ M fenitoin. **B.** Bantların yoğunluk analizleri (%)

MMP-9 bant yoğunlukları 7 μ M DAPT, 70 μ M DAPT, 700 μ M DAPT, 70 μ M fenitoin, 7 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 70 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 700 μ M DAPT-70 μ M fenitoin uygulanmış örnekler için sırasıyla % 20, % 10.2, % 35, % 13, % 21, % 27 ve % 31 oranında kontrole göre azaldı (Şekil 4.16).

A.



B.

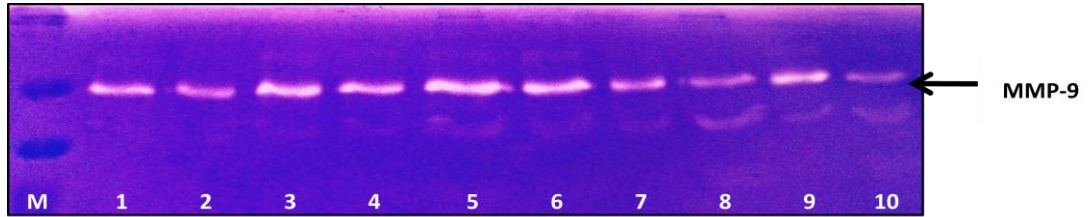


Şekil 4.16. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 48 saat inkübasyonu sonucu **A.** MMP-9'un jelatin zimografisi ile görüntülenmesi. M: Protein molekül ağırlığı belirteci, 1: Kontrol, 2: 7 μ M DAPT, 3: 70 μ M DAPT, 4: 700 μ M DAPT, 5: 70 μ M fenitoin, 6: 7 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 7: 70 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 8: 700 μ M DAPT-70 μ M fenitoin. **B.** Bantların yoğunluk analizleri (%)

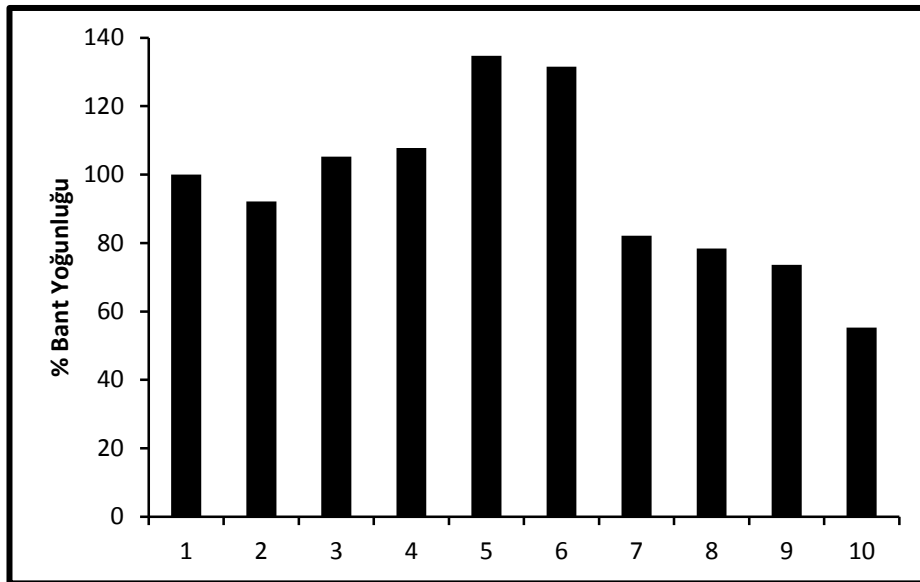
Hücrelerin DAPT ve fenitoin ile 72 saat inkübasyonu sonucu MMP-9 proteininin jelatin zimografi ile belirlenmesi.

MMP-9 bant yoğunluğu analizlerine göre en belirgin azalma 700 μ M DAPT-700 μ M fenitoin uygulanmış örnekte % 45 olarak saptandı.

A.



B.



Şekil 4.17. MDA-MB-231 hücrelerinin DAPT ve fenitoin ile 72 saat inkübasyonu sonucu **A.** MMP-9'un jelatin zimografi ile görüntülenmesi. M: Protein molekül ağırlığı belirteci, 1: Kontrol 2: 7 μ M DAPT, 3: 7 μ M fenitoin, 4: 7 μ M DAPT-7 μ M fenitoin, 5: 70 μ M DAPT, 6: 70 μ M fenitoin, 7: 70 μ M DAPT-70 μ M fenitoin, 8: 700 μ M DAPT, 9: 700 μ M fenitoin, 10: 700 μ M DAPT-700 μ M fenitoin. **B.** Bantların yoğunluk analizleri (%)

5. TARTIŞMA

Kanser gelişiminde görevli olan birçok moleküler mekanizma vardır. Çalışmamızda bu moleküllerden kanser hücrelerinin invazyon ve göçü üzerinde etkili olan voltaja duyarlı sodyum kanalı izoformu neonatal Nav1.5 iyon kanalı ve kanser hücrelerinin farklılaşma ve çoğalmasını etkileyen Noç-4 reseptörünün metastatik süreç üzerindeki etkisini inceledik. Çoğu iyon kanalının onkojenik gelişime katılan hücrenel süreçlerde gerekli olduğu bilinmektedir. Kanser hücreleri kontrolsüz çoğalmanın yanında, lenf ve kan dolaşımına ulaşmadan önce bazal laminayı sindirerek dokulara göç eder ve uygun dokuya ulaştıklarında ikinci bir tümör oluştururlar. Bu süreç, sistein katepsinler (114) ve matriks metalloproteazlar (115) gibi birçok hücre dışı proteazlar yardımıyla gerçekleşir. Hücre içi kalsiyumdaki artışla hücre göçünün gerçekleştiği bilinmektedir. Bu olay SK3 gibi potasyum kanalları tarafından kontrol edilmektedir (116). Son 10 yılda voltaj kapılı sodyum kanallarının *in vitro* koşullarda kanser hücrelerinin invazifliğini kuvvetlendirdiğine yönelik birçok kanıt elde edilmiştir (117).

Diğer taraftan, hücre farklılaşması, organ sınırı belirlenmesi, hücre çoğalması ve canlılığı gibi süreçlerde rol alan Noç reseptörlerinin kanser hücrelerinin invazyonu ve metastazına da katkıda bulunduğu dair bulgular vardır (103). Yapılan çalışmalarda MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Noç-2 reseptörünün tümör oluşumunu azalttığı, Noç-4 aktivasyonunun ise *in vivo* koşullarda tümör gelişimini arttırdığı gösterilmiştir (118). Bu bilgiler ışığında nNav1.5 iyon kanalı ve Noç-4 reseptörünün birlikte ve ayrı ayrı inhibisyonları sonucunda güçlü metastatik insan kaynaklı meme kanseri hücrelerinin çoğalması, göçü ve doku dışına çıkmasında görevli olan matriks metalloproteinazlar üzerindeki etkisini incelemek amacıyla nNav1.5 kanal inhibitörü olarak fenitoin, Noç-4 inhibitörü olarak gama sekretaz inhibitörü olan DAPT bileşiğini kullandık.

Hücrelerin fenitoin ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu hücre canlılığı ve hücre çoğalması üzerinde etki görülmemiştir. Bulgularımız yapılan çalışmaları desteklemektedir (119). İyon kanalı inhibisyonunun hücre çoğalmasını etkilemediği bilinmektedir. Yapılan sitotoksosite çalışmasında bu bilgiyi doğrulamaktadır. Voltaja duyarlı sodyum iyon kanalları hücrelerin metastatik potansiyelini etkileyen hücre göçü, invazyon gibi süreçlerde etkindir. Yapılan hücre göçü deneyi ile fenitoinin

etkin dozunun 70 μ M olduğu, bu dozdaki fenitoinin hücre göçünü % 87 azalttığı gözlenmiş ve buna dayanarak deneyimizin gen ifadesi çalışmalarında fenitoinin bu dozu kullanılmıştır. Başka bir çalışmada fenitoinin 50 μ M dozunda sodyum iyon kanalı akımı, hücre göçü ve invazyonunun baskılandığı gösterilmiştir (119). Farmakolojik veriler neonatal Nav1.5'in klinik açıdan önemli olan antiaritmikler ve lokal anestezikler tarafından bloke edildiğini göstermiştir. Lokal anestezik lidokain ve antikonvülzan fenitoin küçük hücreli akciğer kanseri hücre hatlarında VGSC bağımlı endositik membran aktivitesini azaltmaktadır (44). Ayrıca fenitoinin sıçan prostat kanseri hücrelerinin göçünü (21) ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinin göçünü önemli oranda azalttığı gösterilmiştir. Hücre göçü deneyimizde fenitoinin 70 μ M ve üzerinde meme kanseri hücrelerinin göçünü azaltması yapılan çalışmaları desteklemektedir.

DAPT ve fenitoinle MDA-MB-231 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucu, hücre göçü ve zimografi sonuçları arasında farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin, DAPT'ın 700 μ M uygulandığı dozda hücre göçü % 82 azalırken, MMP-9 bant yoğunluğu kontrole göre % 27 azalmıştır. Fenitoinin 70 μ M konsantrasyonunda ise hücre göçü % 87 azalırken, zimografi sonuçlarında MMP-9 proteinine ait bant yoğunluğu % 16 artmıştır. Ayrıca, yapılan tüm zimografi sonuçlarından elde edilen MMP-9 proteinine ait bant yoğunluklarındaki artış ve azalışlar RT-PCR ile elde edilen MMP-9 gen ifadesindeki artış ve azalışla uyumludur. mRNA'nın düzenlenmesi ve protein seviyeleri birbirinden ayrı ve bağımsız olabileceğinden zimografi ve hücre göçü sonuçları arasında tutarsızlık olabilir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda mRNA ve protein seviyeleri arasında tutarsızlık rapor edilmiştir (22). Diğer taraftan, kanser hücrelerinde iyon kanalının aktivitesindeki artıştan dolayı kanser hücrelerinin mikroçevresi asitleşmektedir. Asidik pH'da aktive olan katepsin B gibi sistein proteazlar ve bütün dokularda bulunan hyalüronidaz enzimi, hücreler arası matriksi yıkarak tümör hücrelerinin invaze olmasını sağlarlar (120). Bu bilgiler ışığında ve elde ettiğimiz verilere dayanarak hücre göçünde ve invazyonunda sadece MMP'lerin etkin rol oynamadığını söyleyebiliriz.

Noç-4 reseptörünü inhibe etmek için kullandığımız gama sekretaz inhibitörü DAPT için yapılan sitotoksosite çalışmalarında 690 μ M DAPT uygulamasında

hücreler % 50 oranında canlılıklarını yitirmiştir. DAPT'ın etkinliği 24 saat sonrasında azalmaya başlamıştır. Noç-4 mRNA seviyesini yüksek oranda azalttığı için gama sekretaz inhibitörleri içerisinde DAPT seçilmiştir (121).

Yapılan çalışmalarda tümör invazyonun gelişiminde matriks metalloproteinazlar ve onların doku inhibitörlerinin önemli işleve sahip olduğu gösterilmiştir (45). Matriks metalloproteinazlar, çinko içeren kalsiyum bağımlı bir endopeptidaz ailesidir. Latent formda salgılanırlar ve bu formu proMMP olarak adlandırılır. Latent MMP'lerin hücreler arası matriks bileşenlerini yıkabilmeleri için aktive olmaları gerekir. MMP'lerin aktivasyonu çeşitli inhibitörler tarafından düzenlenir, bunlar arasında en önemlisi metalloproteinazların doku inhibitörleridir (TIMP) (122). TIMP'ler hücre dışına salgılanabilirler ya da hücre zarında zara tutunmuş olan MMP'ler ile birlikte bulunurlar. MMP ve TIMP'ler arasındaki denge hücrelerarası matriks proteinlerinin yıkımını kontrol eder. TIMP'ler MMP'lerin aktivitesini 1:1 oranında kompleks oluşturarak inhibe eder. MMP'ler ve inhibitörü olan TIMP'ler arasındaki dengenin bozulması sonucu kronik inflamatuvar hastalıklardan kansere kadar çok sayıda patolojik durum ortaya çıkar. Hemen hemen insan kaynaklı kanserlerin tümünde MMP gen ifadesi ve aktivitesi artmaktadır (123). Çalışmamızda nNav1.5 ve Noç-4 inhibisyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde arttığı bilinen, MMP-9 proteini üzerindeki etkisini jelatin zimografi yöntemiyle analiz ettik. İlaç uygulamaları sonucu değişen MMP-9/TIMP-1 oranını RT-PCR yöntemi ile belirledik (124). Buna göre MMP-9 gen ifadesinin azalması ve inhibitörü olan TIMP-1 gen ifadesinin artması sonucu MMP-9/TIMP-1 oranı azalacaktır. Buna bağlı olarak da tümör invazyonu azalacaktır.

RT-PCR çalışmamızda MMP-9 gen ifadesindeki artış ve azalışlar ile jelatin zimografi deneyinde MMP-9'a ait bant yoğunluklarındaki artış ve azalışlar birbiri ile tutarlı bulunmuştur. Fakat sadece bu verilere dayanarak MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonu üzerinden değerlendirme yapmak doğru olmayacaktır. Bunun için MMP-9/TIMP-1 oranı invazyonun azalıp azalmadığı konusunda bize doğru sonucu verecektir. Öyle ki MMP-9 gen ifadesi artarken, MMP-9/TIMP-1 oranı azalıyorsa invazyonun azaldığını söyleyebiliriz.

Noç reseptör inhibitörü olarak kullandığımız gama sekretaz inhibitörünün Noç-4 reseptörünün yanında nNav1.5 gen ifadesini de baskıladığı görülmüştür.

Gama sekretaz inhibitörlerinin dezavantajlarından birisi de Noç reseptörleri dışında çok sayıda substrata sahip olmasıdır (125). Daha önce yapılan bir çalışmada voltaj kapılı sodyum kanalının β -alt biriminin bir gama sekretaz substratı olduğu sonucuna varılmış ve bu inhibisyon sodyum iyon kanalının Nav1.1 ve Nav1.3 izoformlarında gösterilmiştir. Çalışmamızda gama sekretaz inhibitörünün bu etkisini nNav1.5 iyon kanalında saptadığımızdan dolayı sodyum kanalının β -alt biriminin bir gama sekretaz substratı olduğu destekleyici bir bulgu olarak kabul edilebilir.

Ayrıca gen ifadesi çalışmalarımızda, MDA-MB-231 hücrelerinin fenitoin ve gama sekretaz inhibitörü ile 48 saatlik inkübasyonunun ardından yapılan RT-PCR sonuçlarında nNav1.5 gen ifadesinin kontrole göre arttığı görülmüştür. Bizim bulduğumuz bu sonuç, başka bir araştırmada MDA-MB-231 hücrelerinde sodyum iyon kanalı inhibitörü olan tetrodotoksin ile 24 saatlik inkübasyon sonrası nNav1.5 gen ifadesinde görülen artış ile tutarlıdır (47). Bu durum voltaja duyarlı iyon kanalı mRNA ifadesinin aktivite bağımlı oto-düzenleniminin karmaşık olmasından ve hücrenin kaynaklanabilir. Hücre tipi ve deney koşulları da bunda etkili olabilir. Ayrıca kullanılan inhibitörlerin etkinliğinde hücre dışı ortamın biyokimyasal içeriği de önem taşımaktadır. Yapılan bir çalışmada % 5 serum içeren ortama voltaja duyarlı sodyum kanal inhibitörü tetrodotoksin eklendiğinde VGSC kanalları yüksek oranda inhibe olurken, serum içermeyen ortamda hücrelere uygulandığında ise tam tersi etki yaptığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda, 700 μ M DAPT uygulaması hem nNav1.5 hem de Noç-4 gen ifadelerini azaltarak MMP-9/TIMP-1 oranının anlamlı şekilde düşmesine sebep olmuştur. Diğer taraftan, fenitoin ve DAPT'ın birlikte uygulanması nNav1.5 ve Noç-4 gen ifadelerini ve MMP-9/TIMP-1 oranını anlamlı seviyede düşürmüştür. Buradan yola çıkarak bu iki molekül arasında bir etkileşim olduğunu ve iki molekülün birlikte inhibisyonlarının MMP-9/TIMP-1 oranını düşürerek kanser hücrelerinin invazyonunu azalttığı sonucuna varabiliriz. Bu bulgular ışığında neonatal Nav 1.5 sodyum kanalı ve Noç-4 reseptörünün meme kanserinde anti-metastatik bir hedef olabileceğini söyleyebiliriz.

Neonatal Nav 1.5 sodyum kanalı ve Noç-4 reseptörünü meme kanserinde anti-metastatik hedef yapan başka özellikleri de vardır. Poliklonal bir antikorun üretilmesi ile (NESO pAb) aNav1.5 ve nNav1.5 arasındaki 7 amino asitlik fark açığa çıkmıştır.

Bu antikör nNav1.5 kanalında hücre dışı bir bir epitobu seçici olarak tanımaktadır, hücre dışı epitop örn. D1: S3-S4 bağlantısı (56). *In vitro* koşullarda, NESOpAb'nin kullanılması nNav1.5'in zayıf metastatik MCF-7 hücreleri ile karşılaştırıldığında yüksek metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde daha fazla ifade edildiğini doğrulamaktadır (56). Elektrofizyolojik analizlerle tutarlı olarak, NESOpAb'in *in vitro* koşullarda metastatik meme kanseri hücrelerinde invazyon ve migrasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Bu bulgu meme kanseri invazyonunda nNav1.5'in gerekliliğini doğrulamaktadır (37). nNav1.5 metastatik sürece katkısından dolayı meme kanserinin tedavisinde önemli bir hedeftir.

Noç sinyal yolağı ise çeşitli karakteristik özellikleri ile meme kanserinde etkileyici bir hedef haline gelmektedir. Bunlardan ilki, Noç yolağı sadece meme kanseri hücrelerinin çoğalma ve canlılığını değil, meme kanseri kök hücrelerinde çoğalma ve canlılığını düzenlemektedir (126). Aynı zamanda Noç sinyali, tümör endotel hücrelerinde özellikle Delta-4 ligandının etkili olduğu farklı bir pro-anjiogenik işleve sahiptir (127). Sonuç olarak, meme kanseri primer lezyonlarında Noç sinyalinin farmakolojik ajanlarla inhibisyonu tümörün yenilenmesinden sorumlu olan meme kanseri kök hücrelerinin kendini yenilemesini ve damar oluşumunu engelleyerek metastaz oluşumunu önleyebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Noç-4 ve nNav1.5'in metastatik MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinin metastatik potansiyeli üzerinde etkisi olduğu, birlikte inhibe edilmelerinin kanser hücrelerinin invazyonunu matriks metalloproteinazlar ve inhibitörleri üzerinden azalttığı gösterilmiştir. Moleküler düzeyde Noç sinyali, Hedgehog ve Wnt gibi farklılaşma, çoğalma ve hücre canlılığı üzerinde etkili olan birçok yolak ile etkileşim içerisinde olduğundan bu yollar üzerinden de çalışma yapılması gerekmektedir (128). Sonuçta, Noç sinyal yolağının inhibisyonu aynı anda çok sayıda ikincil tedavi hedeflerini etkileyebilir.

KAYNAKLAR

1. Allinen, M., Beroukhi, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H. ve diğeri. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, 6, 17-32.
2. Hille, B. (1992). Axons, Ions, and Dons. *Science*, 258 (5079), 144-5.
3. Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P. ve diğeri. (2009). Voltage-Gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-Dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (13), 8680-91.
4. Le Guennec, J. Y., Ouadid-Ahidouch, H., Soriani, O., Besson, P., Ahidouch, A., ve Vandier, C. (2007). Voltage-Gated Ion Channels, New Targets in Anti-Cancer Research. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2 (3), 189-202.
5. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. ve Thun, M. J. (2006). Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, 56 (2), 106-30.
6. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70.
7. Chaffer, C.L., Weinberg, R.A. (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, 331.
8. Liizumi, E., Liu, W., Pai, S.K., Furuta, E., Watabe, K. (2008). Drug development against metastasis-related genes and their pathways: A rationale for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica ACTA Reviews on Cancer*, 1786(2), 87-104.
9. Bacac, M., Stamenkovic, I. Metastatic Cancer Cell. (2008). *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, (3), 221-47.
10. Welch, D.R., Steeg, P.S., Schaeffer-Rinker, C.W. (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis genetic regulation of human breast carcinoma metastasis. *Breast Cancer Research*, 2, 408-416.
11. Palmer, C. P., Mycielska, M. E., Burcu, H., Osman, K., Collins, T., Beckerman R., Perrett, R. ve diğeri. (2008). Single Cell Adhesion Measuring Apparatus (Scama): Application to Cancer Cell Lines of Different Metastatic Potential and Voltage-Gated Na⁺ Channel Expression. *The European Biophysics Journal*, (37), 359-68.
12. Callahan, R., Raafat, A. Notch Signaling in Mammary Gland Tumorigenesis. (2001). *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6, 23-36.

13. Catterall, W.A. (1995). Structure and Function of Voltage Gated Ion Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 493-531.
14. Goldin, A.L. (2002). Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *The Journal of Experimental Biology*, 205, 575–584.
15. Diss, J.K.J., Fraser, E.S.P., Djamgoz, M.B.A. (2004). Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *The European Biophysics Journal*, 33, 180–193.
16. Bennett, E.S., Smith, B.A., Harper, J.M. (2004). Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447, 908–914.
17. Roger, S., Besson, P., Le Guennec, J.Y. (2003). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica Biophysica Acta*, 1616, 107–111.
18. Fraser, S.P, Ding, Y.L.A., Foster, C.S., Djamgoz, M.B. (1999). Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. *Cell Tissue Research*, 295, 505–512.
19. Djamgoz, M.B.A., Mycielska, M., Madeja, Z., Fraser, S.P., Korohoda, W. (2001). Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltage gated Na⁺ channel activity. *Journal of Cell Science*, 114, 2697–2705.
20. Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska M, Pan H, Yamaci RF. ve diğeri. (2005). Voltage gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*, 11, 5381–5389.
21. Fraser, S.P., Salvador, V., Manning, E.A., Mizal, J., Altun, S., Raza, M. ve diğeri. (2003). Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviors involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: I. lateral motility. *Journal of Cellular Physiology*, 195, 479–487.
22. Brackenbury, W.J., Djamgoz, M.B. (2006). Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *The Journal of Physiology*, 573 (2), 343–356.
23. Palmer, C.P., Mycielska, M.E., Burcu, H., Osman, K., Collins T, Beckerman, R. ve diğeri (2008). Single cell adhesion measuring apparatus (SCAMA):

- application to cancer celllines of different metastatic potential and voltage-gated Na⁺ channel expression. *The European Biophysics Journal*, 37, 359–368.
24. Mycielska, M.E., Palmer, C.P., Brackenbury, W. J., ve Djamgoz, M. B.(2005). Expression of Na⁺-Dependent Citrate Transport in a Strongly Metastatic Human Prostate Cancer Pc-3m Cell Line: Regulation by Voltage-Gated Na⁺ Channel Activity. *The Journal of Physiology*, 563, (2), 393-408.
 25. Nakajima, T., Kubota, N., Tsutsumi, T., Oguri, A., Imuta, H., Jo, T., Oonuma, H., ve diğeri. (2009). Eicosapentaenoic Acid Inhibits Voltage-Gated Sodium Channels and Invasiveness in Prostate Cancer Cells. *British Journal of Pharmacology*, 156, (3), 420-31.
 26. Krasowska, M., Grzywna, Z. J., Mycielska, M. E., ve Djamgoz, M.B. (2004). Patterning of Endocytic Vesicles and Its Control by Voltage-Gated Na⁺ Channel Activity in Rat Prostate Cancer Cells: Fractal Analyses. *European Biophysics Journal*, 33 (6), 535-42.
 27. Williams, E.L., Djamgoz, M.B.A. (2005). Nitric oxide and metastatic cell behaviour. *BioEssays*, 27 (12), 1228-1238.
 28. Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., Fujiyoshi, Y. (2001). The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature*, 409, 1047–1051.
 29. Diss, J.K.J., Stewart, D., Pani, F., Foster, C.S., Walker, M.M., Patel, A, Djamgoz MBA. (2005). A potential novel marker for human prostate cancer: voltage-gated sodium channel expression in vivo. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 8, 266-273.
 30. Clare, J.J., Tate, S.N., Nobbs, M., Romanos, M.A. (2000). Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discovery Today*, 5(11), 506-520.
 31. Morgan, K., E. B. Stevens, B. Shah, P. J. Cox, A. K. Dixon, K. Lee, R. D., ve diğeri (2000). Beta 3: An Additional Auxiliary Subunit of the Voltage-Sensitive Sodium Channel That Modulates Channel Gating with Distinct Kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, (5), 2308-13.
 32. Yu, F. H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., McCormick, K. A., Lawson, D., Ge, P. ve diğeri. (2003). Sodium Channel Beta4, a New Disulfide-Linked

- Auxiliary Subunit with Similarity to Beta2. *The Journal of Neuroscience*, 23 (20), 7577-85.
33. Ratcliffe, C. F., Qu, Y., McCormick, K. A., Tibbs, V. C., Dixon J. E., Scheuer, T. ve diğeri. (2000). A Sodium Channel Signaling Complex: Modulation by Associated Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Beta. *Nature Neuroscience*, 3 (5), 437-44.
 34. Fein, A. J., Wright, M. A., Slat, E. A., Ribera, A. B., ve Isom, L. L. (2008). Scn1bb, A Zebrafish Ortholog of Scn1b Expressed in Excitable and Nonexcitable Cells, Affects Motor Neuron Axon Morphology and Touch Sensitivity. *The Journal of Neuroscience*, 28 (47), 12510-22.
 35. Chioni, A. M., Brackenbury, W. J., Calhoun, J. D., Isom L. L., ve Djamgoz, M. B.(2009). A Novel Adhesion Molecule in Human Breast Cancer Cells: Voltage-Gated Na⁺ Channel Beta1 Subunit. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41 (5), 1216-27.
 36. Herfst, L. J., Rook, M. B., ve Jongma, H. J. (2004). Trafficking and Functional Expression of Cardiac Na⁺ Channels. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*, 36 (2), 185-93.
 37. Brackenbury, W.J, Chioni, A.M., Diss, J.K.J., Djamgoz, M.B.A. (2007). The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 101, 149-160.
 38. Fraser, S.P., Diss, J.K.J., Chioni, A.M., Mycielska, M.E., Pan, H., Yamaci ve diğeri. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical. Cancer Research*, 11, 5381–5389.
 39. Gao, R., Wang, J., Shen, Y., Lei, M., Wang, Z. (2009). Functional expression of voltagegated sodium channels Nav1.5 in human breast cancer cell line MDA-MB-231. *Journal of Medical. Sciences*, 29, 64–67.
 40. Grimes, J.A., Djamgoz, M.B., (1998). Electrophysiological characterization of voltagegated Na⁺ current expressed in the highly metastatic Mat-LyLu cell line of ratprostate cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 175, 50–58.
 41. Abdul, M., Hoosein, N. (2002). Voltage-gated sodium ion channels in prostate cancer:expression and activity. *Anticancer Research*, 22, 1727–1730.

42. Brackenbury, W.J., Djamgoz, M. B. (2006). Activity-dependent regulation of voltage-gated Na⁺ channel expression in Mat-LyLu rat prostate cancer cell line. *The Journal of Physiology*, 573,343–356.
43. Fraser, S.P., Diss, J.K., Lloyd, L.J., Pani, F., Chioni, A.M., George, A.J., Djamgoz, M.B., (2004). T-lymphocyte invasiveness: control by voltage-gated Na⁺ channel activity. *FEBS Letters*, 569, 191–194.
44. Onganer, P.U., Djamgoz, M.B., (2005). Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na⁺ channel expression in vitro. *The Journal of Membrane Biology*, 204, 67–75.
45. Blandino, J.K., Viglione, M.P., Bradley, W.A., Oie, H.K., Kim, Y.I. (1995). Voltage-dependent sodium channels in human small-cell lung cancer cells: role in action potentials and inhibition by Lambert–Eaton syndrome IgG. *The Journal of Membrane Biology*, 143, 153–163.
46. Onganer, P.U., Seckl, M.J., Djamgoz, M.B. (2005). Neuronal characteristics of small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 93, 1197–1201.
47. Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P.I., Iochmann, S. ve diğ erleri. (2007). Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 774–786.
48. Fulgenzi, G., Graciotti, L., Faronato, M., Soldovieri, M.V., Miceli, F., Amoroso, S. ve diğ erleri. (2006). Human neoplastic mesothelial cells express voltage-gated sodium channels involved in cell motility. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38, 1146–1159.
49. Ou, S.W., Kameyama, A., Hao, L.Y., Horiuchi, M., Minobe, E., Wang, W.Y. ve diğ erleri. (2005). Tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A. *European Journal of Neuroscience*, 22, 793–801.
50. Allen, D.H., Lepple-Wienhues, A., Cahalan, M.D., (1997). Ion channel phenotype of melanoma cell lines. *The Journal of Membrane Biology*, 155, 27–34.
51. Diaz, D., Delgadillo, D.M., Hernández-Gallegos, E., Ramírez-Domínguez, M.E., Hinojosa, L.M., Ortiz, C.S. ve diğ erleri. (2007). Functional expression of

- voltage-gated sodium channels in primary cultures of human cervical cancer. *The Journal of Cell Physiology*, 210, 469–478.
52. Shang, L.L., Dudley, S.C. (2005). Tandem Promoters and Developmentally Regulated 5'- and 3'-mRNA Untranslated Regions of the Mouse Scn5a Cardiac Sodium Channel. *J Biol Chem*, 280, 933-940.
 53. Palmer, C. P., Mycielska, M.E., Burcu, H., Osman, K., Collins, T., Beckerman R. ve diğeri. (2008). Single Cell Adhesion Measuring Apparatus (Scama): Application to Cancer Cell Lines of Different Metastatic Potential and Voltage-Gated Na⁺ Channel Expression. *The European Biophysics Journal*, 37 (4), 359-68.
 54. Diss, J.K., Calissano, M., Gascoyne, D., Djamgoz, M.B., ve Latchman, D.S. (2008). Identification and Characterization of the Promoter Region of the Nav1.7 Voltage-Gated Sodium Channel Gene (Scn9a). *Molecular and Cellular Neuroscience*, 37 (3), 537-47.
 55. Brackenbury, W.J., Davis, T.H., Chen, C., Slat, E.A., Detrow, M.J., Dickendesher, T.L. ve diğeri. (2008). Voltage-Gated Na⁺ Channel Beta1 Subunit-Mediated Neurite Outgrowth Requires Fyn Kinase and Contributes to Postnatal Cns Development in Vivo. *The Journal of Neuroscience*, 28 (12), 3246-56.
 56. Chioni, A.M., Fraser, S.P., Pani, F., Foran, P., Wilkin, G.P., Diss, J.K. ve diğeri. (2005). A Novel Polyclonal Antibody Specific for the Na(V)1.5 Voltage-Gated Na(+) Channel 'Neonatal' Splice Form. *Journal of Neuroscience Methods*, 147 (2), 88-98.
 57. Ou, Y., Niu, X.L., Ren, F.X., Zhang, Y. ve Ling, F.D. (2005). Expression of L-Type Calcium Channel Alpha1c Subunit in Adult Rat Heart. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 25 (11), 1400-4.
 58. Ben-Porath I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W. ve diğeri. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 40 (5), 499-507.

59. Ma, R., ve Sansom, S. C.(2001). Epidermal Growth Factor Activates Store-Operated Calcium Channels in Human Glomerular Mesangial Cells. *Journal of American Society of Nephrology*, 12 (1), 47-53.
60. Sarao, R., Gupta, S.K., Auld, V.J. ve Dunn, R.J. (1991). Developmentally Regulated Alternative Rna Splicing of Rat Brain Sodium Channel mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 19 (20), 5673-9.
61. Copley, R.R. (2004). Evolutionary Convergence of Alternative Splicing in Ion Channels. *Trends in Genetics*, 20 (4), 171-6.
62. Onkal, R., Mattis, J.H., Fraser, S.P., Diss, J.K., Shao, D., Okuse, K. ve diğerleri. (2008). Alternative Splicing of Nav1.5: An Electrophysiological Comparison of 'Neonatal' and 'Adult' Isoforms and Critical Involvement of a Lysine Residue. *The Journal of Cell Physiology*, 216 (3), 716-26.
63. Plummer, N.W., Galt, J., Jones, J.M., Burgess, D.L., Sprunger, L.K., Kohrman, D.C. ve diğerleri. (1998). Exon Organization, Coding Sequence, Physical Mapping, and Polymorphic Intragenic Markers for the Human Neuronal Sodium Channel Gene Scn8a. *Genomics*, 54 (2), 287-96.
64. Raymond, C.K., Castle, J., Garrett-Engle, P., Armour, C.D., Kan, Z., Tsinoremas, N. ve diğerleri. (2004). Expression of Alternatively Spliced Sodium Channel Alpha-Subunit Genes. Unique Splicing Patterns Are Observed in Dorsal Root Ganglia. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (44), 46234-41.
65. Diss, J.K., Archer, S.N., Hirano, J., Fraser, S.P. ve Djamgoz, M.B. (2001). Expression Profiles of Voltage-Gated Na(+) Channel Alpha-Subunit Genes in Rat and Human Prostate Cancer Cell Lines. *Prostate*, 48 (3), 165-78.
66. Ouwerkerk, R., Jacobs, M. A., Macura, K.J., Wolff, A.C., Stearns, V., Mezban S.D. ve diğerleri. (2007). Elevated Tissue Sodium Concentration in Malignant Breast Lesions Detected with Non-Invasive ²³Na MRI. *Breast Cancer Research and Treatment*, 106 (2), 151-60.
67. Mycielska, M.E. ve Djamgoz, M.B.(2004). Cellular Mechanisms of Direct-Current Electric Field Effects: Galvanotaxis and Metastatic Disease. *Journal of Cell Science*, 117 (9), 1631-9.

68. Roger, S., Potier, M., Vandier, C., Besson, P. ve Le Guennec, J. Y.(2006). Voltage-Gated Sodium Channels: New Targets in Cancer Therapy? *Current Pharmaceutical Design*, 12 (28), 3681-95.
69. Artavanis-Tsaonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that serves homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell*, 43, 567-581.
70. Lewis, J. (1998). Notch Signalling and the Control of Cell Fate Choices in Vertebrates. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9 (6), 583-9.
71. Artavanis-Tsakonas, S.R ve Lake, R.J.(1999). Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science*, 284 (5415), 770-706.
72. Blaumueller, C. M.,Qi, H., Zagouras, P. ve Artavanis-Tsakonas, S.(1997). Intracellular Cleavage of Notch Leads to a Heterodimeric Receptor on the Plasma Membrane. *Cell*, 90 (2), 281-91.
73. Miele, L.,Miao, H. ve Nickoloff, B.J. (2006). Notch Signaling as a Novel Cancer Therapeutic Target. *Current Cancer Drug Targets*, 6 (4), 313-23.
74. Kintner, C. R.A. Bradshaw, E.A. Dennis. (2003). Notch signaling in vertebrate development, *Handbook of Cell Signaling*, 2, (813-831) .
75. Kopan, R. ve Ilagan, M. X. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, 137 (2), 216-33.
76. Mumm, J.S.,ve Kopan, R.. (2000). Notch Signaling: From the Outside. *The International Journal of Developmental Biology*, 228 (2), 151-165.
77. Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano A. ve diğeri. (2000). A Novel Proteolytic Cleavage Involved in Notch Signaling: The Role of the Disintegrin-Metalloprotease Tace. *Molecular Cell*, 5 (2), 207-16.
78. Edbauer, D.,Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H. ve Haass, C. (2003). Reconstitution of Gamma-Secretase Activity. *Nature Cell Biology*, 5 (5), 486-8.
79. Mumm, J. S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J. ve Kopan, R.(2000). A Ligand-Induced Extracellular Cleavage

- Regulates Gamma-Secretase-Like Proteolytic Activation of Notch1. *Molecular Cell*, 5 (2), 197-206.
80. Bray, S. J. (2006). Notch Signalling: A Simple Pathway Becomes Complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7 (9), 678-89.
81. Hsieh, J.J., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B. ve Hayward, S.D.(1999). Cir, a Corepressor Linking the DNA Binding Factor Cbf1 to the Histone Deacetylase Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 96 (1), 23-8.
82. Wu, L. ve Griffin, J.D.(2004). Modulation of Notch Signaling by Mastermind-Like (Maml) Transcriptional Co-Activators and Their Involvement in Tumorigenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14 (5), 348-56.
83. Wu, L., Sun, T., Kobayashi, K., Gao, P. ve Griffin, J.D. (2002). Identification of a Family of Mastermind-Like Transcriptional Coactivators for Mammalian Notch Receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 22 (21), 7688-700.
84. Fiuza, U.M. ve Arias, A.M.(2007). Cell and Molecular Biology of Notch. *The Journal of Endocrinology*, 194 (3), 459-74.
85. Parr, C.,Watkins, G. ve Jiang, W.G. (2004). The Possible Correlation of Notch-1 and Notch-2 with Clinical Outcome and Tumour Clinicopathological Parameters in Human Breast Cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 14 (5), 779-86.
86. Fan, X., Mikolaenko, I., Elhassan, I., Ni, X., Wang, Y., Ball, D.,Brat, D.J., Perry, A. ve Eberhart, C.G. (2004). Notch1 and Notch2 Have Opposite Effects on Embryonal Brain Tumor Growth. *Cancer Research*, 64 (21), 7787-93.
87. Sriuranpong, V., Borges, M.W., Ravi, R.K., Arnold, D.R., Nelkin, B.D., Baylin, S.B. ve Ball, D.W. (2001). Notch Signaling Induces Cell Cycle Arrest in Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Research*, 61 (7), 3200-5.
88. Nosedá, M.,Chang, L., McLean, G., Grim, J.E., Clurman, B.E., Smith, L.L. ve Karsan, A.(2004). Notch Activation Induces Endothelial Cell Cycle Arrest and Participates in Contact Inhibition: Role of P21cip1 Repression. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (20), 8813-22.

89. Curry, C. L., Reed, L.L., Golde, T.E., Miele, L., Nickoloff, B.J. ve Foreman, K. E.(2005). Gamma Secretase Inhibitor Blocks Notch Activation and Induces Apoptosis in Kaposi's Sarcoma Tumor Cells. *Oncogene*, 24 (42), 6333-44.
90. Hallahan, A. R., Pritchard, J. I., Hansen, S., Benson, M., Stoeck, J., Hatton, B. A., Russell, T. L. ve diğerleri. (2004). The Smo1 Mouse Model Reveals That Notch Signaling Is Critical for the Growth and Survival of Sonic Hedgehog-Induced Medulloblastomas. *Cancer Research*, 64 (21), 7794-800.
91. Ohishi, K.,Varnum-Finney, B., Flowers, D., Anasetti, C., Myerson, D. ve Bernstein, I.D. (2000). Monocytes Express High Amounts of Notch and Undergo Cytokine Specific Apoptosis Following Interaction with the Notch Ligand, Delta-1. *Blood*, 95 (9), 2847-54
92. Guan, E., Wang, J., Laborda, J., Norcross, M., Baeuerle, P. A. ve Hoffman, T.(1996). T Cell Leukemia-Associated Human Notch/Translocation-Associated Notch Homologue Has I Kappa B-Like Activity and Physically Interacts with Nuclear Factor-Kappa B Proteins in T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 183 (5), 2025-32.
93. Jogi, A., Ora, I., Nilsson, H., Lindeheim, A., Makino, Y., Poellinger, L., Axelson H. ve Pahlman, S.(2002). Hypoxia Alters Gene Expression in Human Neuroblastoma Cells toward an Immature and Neural Crest-Like Phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 99 (10), 7021-6.
94. Soares, R.,Balogh, G., Guo, S., Gartner, F., Russo, J. ve Schmitt, F.(2004). Evidence for the Notch Signaling Pathway on the Role of Estrogen in Angiogenesis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 18 (9), 2333-43.
95. Haines, N. ve Irvine, K.D.(2003). Glycosylation Regulates Notch Signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4 (10), 786-97.
96. Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C.A. ve diğerleri. (2003). Notch Mediates Tgf Alpha-Induced Changes in Epithelial Differentiation During Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 3 (6), 565-76.
97. Santagata, S., Demichelis, F., Riva, A., Varambally, S., Hofer, M. D., Kutok, J. ve diğerleri. (2004). Jagged1 Expression Is Associated with Prostate Cancer Metastasis and Recurrence. *Cancer Research*, 64 (19), 6854-7.

98. Gray, G.E., Mann, R.S., Mitsiadis, E., Henrique, D., Carcangiu, M.L., Banks, A. ve diğeri. (1999). Human Ligands of the Notch Receptor. *American Journal of Pathology*, 154 (3), 785-94.
99. Purow, B.W., Haque, R.M., Noel, M.W., Su, Q., Burdick, M.J., Lee, J. ve diğeri. (2005). Expression of Notch-1 and Its Ligands, Delta-Like-1 and Jagged-1, Is Critical for Glioma Cell Survival and Proliferation. *Cancer Research*, 65 (6), 2353-63.
100. Nickoloff, B.J., Osborne, B.A., ve Miele, L. (2003). Notch Signaling as a Therapeutic Target in Cancer: A New Approach to the Development of Cell Fate Modifying Agents. *Oncogene*, 22 (42), 6598-608.
101. Callahan, R. ve Egan, S. E. (2004). Notch Signaling in Mammary Development and Oncogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 9 (2), 145-63.
102. Zeng, Q., Li, S., Chepeha, D.B., Giordano, T.J., Li, J., Zhang, H. ve diğeri. (2005). Crosstalk between Tumor and Endothelial Cells Promotes Tumor Angiogenesis by Mapk Activation of Notch Signaling. *Cancer Cell*, 8 (1), 13-23.
103. Wang, Z., Banerjee, S., Li, Y., Rahman, K.M., Zhang, Y. ve Sarkar, F.H. (2006). Down-Regulation of Notch-1 Inhibits Invasion by Inactivation of Nuclear Factor-KappaB, Vascular Endothelial Growth Factor, and Matrix Metalloproteinase-9 in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research*, 66 (5), 2778-84.
104. Wang, Z., Zhang, Y., Banerjee, S., Li, Y. ve Sarkar, F.H. (2006). Inhibition of Nuclear Factor KappaB Activity by Genistein Is Mediated Via Notch-1 Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *The International Journal of Cancer*, 118 (8), 1930-6.
105. Imatani, A. ve Callahan, R. (2000). Identification of a Novel Notch-4/Int-3 Rna Species Encoding an Activated Gene Product in Certain Human Tumor Cell Lines. *Oncogene*, 19 (2), 223-31.
106. Miele, L., Golde, T. ve Osborne, B. (2006). Notch Signaling in Cancer. *Current Molecular Medicine*, 6 (8), 905-18.

107. Berridge, M.V. ve diğeri. (1996). The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4, 15-19.
108. Patricia, A. M., Snoek-van, B., Johannes W. V.H. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*, 38, 73-83.
109. Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G. (1994). Quantitative Zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical Biochemistry*, 218, 328-329.
110. Nolan, T., Hands, E., Bustin, S.A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1 (3), 1559-82.
111. Wong, M.L., Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 75-85.
112. Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *The Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1); 23-39.
113. Rodriguez, L.G., Wu, X., Guan, J.L. (2005). Wound-healing assay. *Methods in Molecular Biology*, 294, 23-29.
114. Podgorski, I., Sloane, B. (2003). Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochemical Society Symposia*, 70, 263-276.
115. Deryugina, E., Quigley, J. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25, 9-34.
116. Potier, M., Joulin, V., Roger, S., Besson, P., Jourdan, M.L., Le Guennec, J.Y. ve diğeri. (2006). Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Molecular Cancer Research*, 5, 2946-2953.
117. Roger, M., Potier, M., Vandier, C., Besson, P., Le Guennec, J.Y. (2006). Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy? *Current Pharmaceutical Design*, 12, 3681-3695.
118. O'Neill, C. F., Urs, S., Cinelli, C., Lincoln, A., Nadeau, R.J., León, R. ve diğeri. (2007). Notch2 signaling induces apoptosis and inhibits human MDA-MB-231 xenograft growth. *American Journal of Pathology*, 171(3), 1023-1036.

119. Yang, M., Kozminski, D.J., Wold, L.A., Modak, R., Calhoun, J.D., Isom, L.L., Brackenbury, W.J. (2012). Therapeutic potential for phenytoin: targeting Nav1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 134, 603-615.
120. Bourguignon, L.Y.W., Singleton, P.A.,Diedrich, R.S., Gilad, E. (2004). CD44 Interaction with Na⁺-H⁺Exchanger (NHE1) Creates Acidic Microenvironments Leading to Hyaluronidase-2 and Cathepsin B Activation and Breast Tumor Cell Invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 26991-27007.
121. McGowan, P.M., Simeone, C., Ribot, E.J., Chambers, A.F. (2011).Notch1 inhibition alters the CD44^{hi}/CD24^{lo} population and reduces the formation of brain metastases from breast cancer. *Molecular Cancer Research*, 9, 834-844.
122. Patricia, A.M., Beurden, S., Von den Hoff, J.W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*, 38, 73-83.
123. Kim, Y., Remagle, A.G., Chernov, A.V., Liu, H., Shubayev, I., Lai, C. ve diğeri. (2012). The MMP-9/TIMP-1 Axis Controls the Status of Differentiation and Function of Myelin-Forming Schwann Cells in Nerve Regeneration. *Plos One*, 7(3), 33664.
124. Wang, X.Y., Wang, Y., Liu, H.C. (2011). Tamoxifen lowers the MMP-9/TIMP-1 ratio and inhibits the invasion capacity of ER-positive non-small cell lung cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 65, 525–528.
125. Kopan, R., Ilagan, M.X. (2004). γ -secretase: proteasome of the membrane? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,5(6), 499–504.
126. Stylianou, S., Clarke, R.B., Brennan, K. (2006). Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Research*, 66(3), 1517-1525.
127. Yan, M., Plowman, G.D. (2007). δ -like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. *Clinical Cancer Research*, 13(24), 7243-7246.
128. Rizzo, P., Osipo, C., Foreman, K.E. ve diğeri. (2008). Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene*, 27,5124–5131.