

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Meme Kanseri Hücrelerinde PI-103 İnhibitörünün
Aktive Reseptör Tirozin Kinaz
Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi

Uzm. Biol. Mustafa Emre GEDİK

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. A. Lale DOĞAN

ANKARA
2014

Anabilim Dalı : **Temel Onkoloji**
 Program : **Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi**
 Tez Başlığı : **Meme Kanseri Hücrelerinde PI-103 İnhibitörünün Aktive Reseptör Tirozin Kinaz Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi**
 Öğrenci Adı-Soyadı : **Mustafa Emre GEDİK**
 Savunma Sınavı Tarihi : **29.12.2014**

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

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Dicle GÜÇ

Hacettepe Üniversitesi

Tez danışmanı:

Prof. Dr. A. Lale DOĞAN

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Başkent Üniversitesi

Üye:

Yrd. Doç. Dr. Füsün ÖZMEN

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 FADILMOĞLU
Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu özveriyle büyük emek sarfeden, hiçbir zaman yardımını ve desteğini benden esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. A. Lale Doğan'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bilgi birikimi, vizyoner kişiliği ile her konuda örnek aldığım, her sunumundan ayrı feyzaldığım ve sayesinde farklı bakış açıları kazandığım Sayın Prof. Dr. Emin Kansu'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Gerek derslerde gerekse ders dışında, her konuda desteklerini, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Dicle Güç'e, Sayın Dr. Hande Canpınar'a, Sayın Doç. Dr. Güneş Esendağlı'ya, Sayın Yrd. Doç. Dr. Füsün Özmen'e, Sayın Dr. Emre Yiğitbaş'a ve değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Özlem Darcansoy İşeri'ye teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü konuda tecrübesine ve bilgisine danıştığım, her zaman desteğini yanımda hissettiğim ve yüksek lisans eğitimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim takım arkadaşım ve ablam Burcu Şirin'e teşekkürü bir borç bilirim.

Gerçekleştirdiğimiz bilimsel sohbetler ile yeni şeyler öğrenmemi ve tavsiyeleri ile kendimi geliştirmemi sağlayan Gürcan Tunalı'ya, ders döneminde ve tez döneminde arkadaşlıkları ve yardımları ile yanımda olan Dr. Sevil Oskay'a, Dr. Altuğ Kesikli'ye, Yusuf Dölen'e, Diğdem Yöyen Ermiş'e, Didem Özkazanç'a, Övgü Öner'e, Pınar Karaşar'a, Parisa Sarmadi'ye, Dr. Mohammed Azim Ebrahimi'ye, Haleh Ainesaz'a, Gürcan Günaydın'a teşekkürlerimi sunarım. Yardımları ve sohbetleriyle yanımda olan, Temel Onkoloji ailesinin güler yüzlü personelleri; Semra Solmaz'a, Burçin Taşbasan'a, Banu Avşar'a, Necla Çelik'e, Dr. Süreyya Bozkurt'a, Ayten İnanç'a, Gözde Gören'e, Canip Ulubey'e, Halime Mesci'ye teşekkürlerimi sunarım.

Maddi manevi yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim, haklarını hiçbir zaman ödeyemeceğim sevgili aileme minnet ve şükranlarımı sunarım. İyi günde, kötü günde her daim yanımda olan, varlığı ve sohbetinden beni mahrum bırakmayan kız arkadaşım Elif Gözde Arslan'a teşekkür ederim.

Yakın zamanda vefat eden, enstitümüzün kurucusu ve eğitim gördüğümüz kurumu bizlere bahşeden Sayın Prof. Dr. Dinçer Fırat'ı rahmet ve şükranla anıyorum.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (BAP Proje No: 013 D12 104 001).

ÖZET

Gedik, M. E., Meme kanseri hücrelerinde PI-103 inhibitörünün aktive reseptör tirozin kinaz ekspresyonuna etkisinin incelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2014. Meme kanserinde, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının onkojenik aktivasyonuna sıklıkla rastlanılmaktadır. PI3K inhibitörleri, tirozin kinaz inhibitörleri ve/veya monoklonal antikolar ile yapılan sinyal yolağı inhibisyonu, RTK ekspresyonlarında ve aktivasyonlarında artışa yol açmaktadır. Bu çalışmada, HER2⁺, PTEN ve PIK3CA mutasyonu taşımayan SKBR3 insan meme kanseri hücre dizisinde, PI3K/mTOR dual inhibitörü olan PI-103, Akt inhibitörü AKTi ve mTOR inhibitörü Rapamisin'in HER2 ve HER3 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi incelendi. AKTi ve PI-103'ün 8 ve 24 saatlik inkübasyonları sonucunda HER2 ve HER3 mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Rapamisin ise, 24 saatlik inkübasyon sonucunda, hem HER2 hem de HER3 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışa sebep oldu ($p < 0,05$). Bu sonuç, Rapamisin'in bu hücrelerde re-aktivasyonu tetikleyici etkisine işaret etmektedir. Çünkü, SKBR3 hücrelerinde Rapamisin ile HER3 protein sentezinin de arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, daha sonra, PI-103'ün aktive reseptör tirozin kinaz (p-HER2 ve p-HER3) ekspresyonlarına etkisi zamana bağlı olarak incelendi. Dual inhibitörün, kontrol hücrelerinde izlenen fosfoprotein paternini değiştirmedeği saptandı. SKBR3 hücrelerinde, aktive RTK düzeylerinin değişmemesi, total protein düzeylerinin ilaçtan etkilenmemesi ile uyumlu bulundu.

Sonuç olarak, HER2⁺ SKBR3 hücrelerinde, en güçlü onkojenik sinyal iletim yolağı olan PI3K/Akt/mTOR'un PI-103 ile zamana bağlı olarak inhibisyonu HER2 ve HER3 ekspresyonunu ve re-aktivasyonunu tetiklememektedir. Ancak, kalıcı sinyal inhibisyonu yapamayan bu ajanın potent anti-tümöral etkiyi sağlamak için diğer inhibitörler ile kombinasyonuna ihtiyacı olduğu akılda tutulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, PI3K, mTOR, p-HER2, p-HER3, PI-103

Destekleyen kurumlar: H.Ü.B.A.P (BAP Proje No: 013 D12 104 001)

ABSTRACT

Gedik, M. E., Evaluation of the effect of PI-103 inhibitor on the expression of activated receptor tyrosine kinase in breast cancer cells, Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master Thesis in Tumor Biology and Immunology, Ankara, 2014. Oncogenic activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway is frequently seen in breast cancer. Inhibition of signaling pathway by PI3K inhibitors, tyrosine kinase inhibitors and/or monoclonal antibodies causes increase in RTKs expression and activation. In this study, the effects of PI-103 (dual inhibitor of PI3K/mTOR) and AKTi (inhibitor of Akt) and Rapamycin (inhibitor of mTOR) on HER2 and HER3 mRNA expression were investigated in HER2⁺ SKBR3 breast cancer cells which does not have PTEN and PIK3CA deficiency. AKTi and PI-103 did not cause any significant difference on HER2 and HER3 mRNA expression after 8 and 24 hours of incubation. On the other hand, Rapamycin treatment for 24 hours, changed both HER2 and HER3 mRNA levels significantly ($p < 0,05$). This result points out reactivation inducing effect of rapamycin in these cells. Because, it is shown that Rapamycin increases HER3 protein expression in SKBR3 cells. In our study, time-dependent effects of PI-103 inhibitor on the expression of activated receptor tyrosine kinase (p-HER2 and p-HER3) were also investigated. Dual inhibitor did not change phosphoprotein pattern of cells that was observed in control cells. In SKBR3 cells, the finding of unchanged activated RTK levels were in accordance with total protein levels which were not affected from drug treatment. As a result, time-dependent inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway which is the most prominent oncogenic signaling pathway in HER2 overexpressing SKBR3 cells with PI-103 did not trigger HER2 and HER3 expression and reactivation. But, it should be kept in mind that this agent, which can not provide a sustainable signal inhibition, is needed to be combined with other inhibitors for receiving potent antitumoral effect.

Keywords: Breast Cancer, PI3K, mTOR, p-HER2, p-HER3, PI-103

Supported by H.U.S.R.C (SRC Project No: 013 D12 104 001)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Meme Kanseri	5
2.2 Reseptör Tirozin Kinaz (RTK)	6
2.2.1 Reseptör Tirozin Kinaz Yapısı	8
2.2.2 Reseptör Tirozin Kinaz İşlevi ve Aktivasyonu	9
2.3 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri (EGFR) ve Regülasyonu	10
2.4 Epidermal Büyüme Faktörü (EGFR) ve Kansere İlişkisi	13
2.5 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolu	16
2.5.1 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolu ve Meme Kanseri	20
2.6 Hedefe Yönelik Tedavinin Biyolojisi	23
2.7 İnhibitörler	25
2.7.1 EGFR İnhibitörleri	27
2.8 PI3K/Akt/mTOR Yoluна Yönelik Terapötik Yaklaşım	29
2.8.1 PI3K İnhibitörleri	29
2.8.2 Akt İnhibitörleri	30
2.8.3 mTOR İnhibitörleri	31
2.8.4 Dual PI3K-mTOR İnhibitörleri	31
2.9 Amaç	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1 Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar	34
3.2 Aletler ve Cihazlar	38

3.3 Hücre Kültürü	41
3.4 Tripsinizasyon	41
3.5 Hücre Pasajı	43
3.6 Hücre Dondurma	43
3.7 Mikoplazma Testi	43
3.8 İlaç Uygulama	45
3.9 RNA İzolasyonu	46
3.10 cDNA Sentezi	48
3.11 <i>Sybr Green</i> ile Eş Zamanlı Pzr (qPCR) ve Analiz	49
3.12 Lizat Hazırlama	52
3.13 Protein Kantitasyonu	55
3.14 <i>Western Blot</i> ve Protein Analizi	56
3.14.1 Poliakrilamid Jel Elektroforezi	57
3.14.2 <i>Ibnot™ Dry Blotting</i> Sistemi ile Transfer ve Blotlama	59
3.14.3 Kemoluminesans Görüntüleme	62
3.14.4 β -Aktin ile Reblot	62
3.14.5 Dansitometrik Analiz	63
3.15 İstatistiksel Analiz	63
4. BULGULAR	64
4.1 SKBR-3 Hücre Dizisinde AKTi ile PI3K Yolağının Farmakolojik İnhibisyonunun HER2 ve HER3 Ekspresyonlarına Etkisi	64
4.1.1 SKBR-3 Hücre Dizinde AKTi'nin Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER2 Ekspresyonuna Etkisi	64
4.1.2 SKBR-3 Hücre Dizinde AKTi'nin Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER3 Ekspresyonuna Etkisi	65
4.2 SKBR-3 Hücre Dizisinde Rapamisin ile PI3K Yolağının Farmakolojik İnhibisyonunun HER2 ve HER3 Ekspresyonlarına Etkisi	67
4.2.1 SKBR-3 Hücre Dizinde Rapamisin'in Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER2 Ekspresyonuna Etkisi	67
4.2.2 SKBR-3 Hücre Dizinde Rapamisin'in Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER3 Ekspresyonuna Etkisi	68

4.3 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI-103 ile PI3K Yolağının Farmakolojik İnhibisyonunun HER2 ve HER3 Ekspresyonlarına Etkisi	70
4.3.1 SKBR-3 Hücre Dizinde PI-103'ün Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER2 Ekspresyonuna Etkisi	70
4.3.2 SKBR-3 Hücre Dizinde PI-103'ün Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER3 Ekspresyonuna Etkisi	71
4.4. <i>Western Blot</i> Deneyi Optimizasyonu	72
4.4.1 Protein Optimizasyonunun Kantitasyonu	72
4.4.2 Poliakrilamid Jel Elektroforezi Protokolünün Optimizasyonu	75
4.5 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI3K Yolağının PI-103 ile Farmakolojik İnhibisyonunun Zamana Bağlı Olarak p-HER2 Ekspresyonuna Etkisi	77
4.6 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI3K Yolağının PI-103 ile Farmakolojik İnhibisyonunun Zamana Bağlı Olarak p-HER3 Ekspresyonuna Etkisi	79
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	92
EKLER	
Ek 1. Etik Kurul İzni	

SİMGELER VE KISALTMALAR

4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
Adb	Adaptör Bağlanma Bölgesi
AML	Akut Myeloid Lösemi
AR	Amfiregulin
ATP	Adenozin trifosfat
BAD	<i>Bcl-2 associated death promoter</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	B hücre lenfoma-2
Bcl-XL	B hücre lenfoma-ekstra büyük
BH3	Bcl-2 homoloji domaini 3
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
BRCA 1/2	Meme kanseri geni 1/2
BTC	Betasellülin
CDC42	Hücre bölünmesi döngüsü 42
CDK4	Siklin bağımlı kinaz 4
Chk	Kontrol noktası kinaz
CK5/6	Sitokeratin 5/6
Crk	<i>Adapter molecule crk</i>
CTMP	Karboksi-uç modulatör protein
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
eIF4E	Ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 4E
EPR	Epiregulin

EPG	Epigen
ErbB	<i>Avian erythroblastosis oncogene B</i>
ErbB1	<i>Avian erythroblastosis oncogene B1</i>
ErbB2	<i>Avian erythroblastosis oncogene B2</i>
ErbB3	<i>Avian erythroblastosis oncogene B3</i>
ErbB4	<i>Avian erythroblastosis oncogene B4</i>
ER	Östrojen reseptörü
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR	Fibroblast büyüme faktör reseptörü
FKBP12	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 12</i>
FOXO	Forkhead Box Protein O
FYVE	<i>Fab 1, YOTB, Vac 1, and EEA1 zinc finger domain</i>
Gab1	Grb2-ilişkili bağlayıcı protein-1
GFR	Büyüme faktörü reseptörü
GPCR	G-protein-eşleşmiş reseptör
Grb2	Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2
GSK-3 β	Glikojen sentez kinaz-3 beta
GTP	Guanozin trifosfat
HB-EGF	Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü
HER1	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 1
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HER3	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 3
HER4	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 4
HRAS	Harvey sarkoma virus onkogen homologu
IGF-1R	İnsulin-benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü

IgG ₁	İmmunoglobulin G ₁
IR	İnsülin reseptörü
IRS	İnsülin reseptör substratı
JAK	Janus kinaz
KRAS	Kirsten sarkoma virus onkogen homologu
LRR	Lösün-zengin tekrar
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
Mcl-1	<i>Myeloid leukemia cell differentiation protein-1</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
mTOR	Memeli/rapamisinin moleküler hedefi
mTORC1	Memeli/rapamisinin moleküler hedefi kompleksi 1
mTORC2	Memeli/rapamisinin moleküler hedefi kompleksi 2
NF- κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGF	Sinir büyüme faktörü
NRAS	Nöroblastoma viral-ras onkogen homologu
NRG	Nörogulin
PDK1	Fosfotinositid-bağlı kinaz-1
PH	Pleckstrin homolog
PHLPP	<i>PH domain and leucine rich repeat protein phosphatases</i>
PI-103	<i>pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pyrimidine</i>
PI3K	Fosfatidil inositol-3-kinaz
PIK3CA	Fosfatidil inositol 3 kinaz, katalitik altbirimi alfa
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat
PIP3	Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfat

PKB	Protein kinaz B (Akt)
PKC	Protein kinaz C
PLC γ	Fosfolipaz C γ
PR	Progesteron reseptörü
PTB	Fosfotirozin bağlanma bölgesi
PtdIns	Fosfatidil inositol
PTEN	Onuncu kromozom üzerinde silinmiş fosfataz ve tensin homoloğu
PX	<i>Phox homology</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RICTOR	mTOR'un Rapamisin-insensitif eşlikçisi
RTK	Reseptör tirozin kinaz
S6K	Ribozomal protein S6 kinaz
Ser(S)/Thr(T)	Serin/Treonin
SGK	Serum ve Glukokortikoid-indüklenebilir kinaz
SH2	Src homoloğu 2 domaini
Shc	Src homoloğu 2 domaini içeren protein
SHIP1/2	SH2 domaini içeren lipit fosfataz
Src	Sarkoma
STAT	Transkripsiyonun sinyal dönüştürücü ve aktivatörleri
TACE	TNF α dönüştürücü enzim
TGF- α	Transforme edici büyüme faktörü-alfa

TKİ	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TSC2	<i>Tuberous sclerosis protein 2</i>
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

ŞEKİLLER

		Sayfa
2.1.	Reseptör kinaz aktivasyonu ve hücre içi sinyal yolağı	7
2.2.	Reseptör tirozin kinaz ailesi ve yapısal çeşitlilikleri	9
2.3.	EGFR reseptör tirozin kinaz ailesi yapı ve özellikleri	11
2.4.	EGFR ailesi reseptörlerinin dimerizasyon kolu aracılığı ile etkileşimi	12
2.5.	HER ailesi dimerizasyonlarının sinyal aktivitesi	15
2.6.	PI3K/Akt/mTOR yolağı ve hücre içi aracı moleküller	19
2.7.	PI3K'da gerçekleşen mutasyonlar	21
2.8.	Meme kanserinde görülen genetik değişiklikler	22
2.9.	Monoklonal antikor tipleri	24
2.10.	Meme kanserinde kullanılan inhibitörler	25
3.1.	Deney planı	40
3.2.	Mikoplazma testi	45
3.3.	AKTi ile inkübe edilmiş örneklerin RNA eldesi (Saf RNA)	47
3.4.	AKTi ile inkübe edilmiş örneklerin RNA eldesi (Kontamine RNA)	48

3.5.	AKTi ile inkübe edilmiş örneklerin cDNA eldesi	49
3.6.	Livak modeline göre $\Delta\Delta Ct$ formülü	51
3.7.	Eş zamanlı PZR sonucu mRNA eldesi	52
4.1.	SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat AKTi ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi	65
4.2.	SKBR-3 hücre dizinde 24 saat AKTi ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi	65
4.3.	SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat AKTi ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi	66
4.4.	SKBR-3 hücre dizinde 24 saat AKTi ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi	66
4.5.	SKBR-3 hücre dizisinde AKTi'nin zamana bağlı olarak HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi	66
4.6.	SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat Rapamisin ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi	68
4.7.	SKBR-3 hücre dizisinde 24 saat Rapamisin ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi	68
4.8.	SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat Rapamisin ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi	69

4.9.	SKBR-3 hücre dizisinde 24 saat Rapamisin ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi	69
4.10.	SKBR-3 hücre dizisinde Rapamisin'in zamana bağlı olarak HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi	69
4.11.	SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat PI-103 ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi	70
4.12.	SKBR-3 hücre dizisinde 24 saat PI-103 ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi	70
4.13.	SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat PI-103 ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi	71
4.14.	SKBR-3 hücre dizisinde 24 saat PI-103 ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi	71
4.15.	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi	72
4.16.	β -aktin ekspresyonu	73
4.17.	Protein kantitasyonu standart eğrisi	74
4.18.	Daha önce uygulanan <i>Western blot</i> protokolü ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü	76
4.19.	Modifiye protokol ile hazırlanan jelde protein bantlarının görüntüsü	77

4.20.	SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER2 ekspresyonuna etkisi	77
4.21.	SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER2 relatif bant yoğunluğuna etkisi	78
4.22.	SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER3 ekspresyonuna etkisi	79
4.23.	SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER3 relatif bant yoğunluğuna etkisi	80
4.24.	SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER2 ve p-HER3 ekspresyonlarına etkisi	81

TABLOLAR

		Sayfa
3.1.	Konvansiyonel PZR ve eş zamanlı PZR'lerde kullanılan primer listesi	50
3.2.	Optimize eş zamanlı PZR koşulu	50
3.3.	EBC tamponu bileşenlerinin konsantrasyonları ve kullanılan bileşenlerin hacimleri	53
3.4.	Lizis tamponu bileşenlerinin konsantrasyonları ve kullanılan bileşenlerin hacimleri	53
3.5.	SDS-jel yükleme tamponu bileşenleri ve kullanılan bileşenlerin hacimleri	58
3.6.	Jel hazırlamak için kullanılan çözelti miktarları	59
3.7.	Yürütme tamponu bileşenleri ve kullanılan bileşenlerin hacimleri	60
4.1.	Protein kantitasyonu yöntemi	73
4.2.	Daha önce hazırlanan protokole göre jel hazırlamak için kullanılan çözelti miktarları	75
4.3.	Yeni protokole göre jel hazırlamak için kullanılan çözelti miktarları	76
4.4.	SKBR-3 hücre dizinde p-HER2 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	78
4.5.	SKBR-3 hücre dizinde p-HER3 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	80

1. GİRİŞ

Meme kanseri insidansı kadınlar arasında birinci, genel sıralamada ise ikinci sırada yer almaktadır [1]. 2012 verilerine göre, dünya genelinde 1.67 milyon meme kanseri vakası gözlenmiştir. Bu durum, tüm yeni kanser vakalarının %25'ini oluşturmaktadır. Yaklaşık olarak 522 000 kişide meme kanserine bağlı ölüm saptanmıştır [2]. Buna göre, meme kanseri kadınlar arasında en sık ölümle sonuçlanan kanser türüdür. Tüm kanser türleri içinde ise, beşinci sırada yer almaktadır [3].

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinde de, normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesi çok basamaklı bir süreç sonucu gerçekleşmektedir. Bu dönüşüm, sinyal iletim yolağı ile gerçekleşmektedir. Bu durum, malign hücrelere sağkalım ve büyüme avantajı sağlamaktadır [4].

Sinyal iletimi, hücre dışından alınan sinyaller ile gerçekleşmektedir. Bu sinyaller, hücre yüzeyinde bulunan çeşitli reseptör tirozin kinazlar (RTK) aracılığı ile hücre dışından hücre içine taşınırlar. Böylece hücre içindeki sinyal yolaklarını aktive ederek hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını, gelişimini, sağkalımını ve migrasyonunu düzenlerler. Reseptör tirozin kinazların ve sinyal yolaklarında rol alan moleküllerin ekspresyon düzeylerinde ve/veya yolakların düzenlenmesinde meydana gelen değişiklikler kanserin gelişimine katkıda bulunmaktadır [5].

İnsan kanser türlerinde PI3K sinyal iletim yolağında gerçekleşen bozukluklara sık olarak rastlanılmakta ve farklı proteinlerin mutasyonlarına sebep olmaktadır [6]. PI3K (Fosfatidilinozitol 3-kinaz) protein ailesi, hücrenin büyümesi, sağkalımı, proliferasyonu, hücre metabolizmasının kontrolü, açısından önemli bir role sahiptir [7]. Hücre zarında yerleşmiş bulunan reseptör tirozin kinazlara , özgül ligandlarının (Büyüme Faktörleri, İnsülin vb.) bağlanması sonucu sinyal iletim mekanizması aktive olmaktadır. Reseptör – ligand etkileşimi sonucu, RTK'ların tirozin kinaz domainlerinin katalitik etkileri aracılığıyla spesifik tirozin rezidüleri fosforile olur. Buna otofosforilasyon

denilmektedir. PI3K'in regülatuar alt birimi olan p85, aktive olan RTK'ların fosfotirozin rezidülerine bağlanır. Bu bağlanma sonucu, PI3K'in katalitik alt birimi olan p110'un intermoleküler inhibisyonu ortadan kalkar. Bu sayede PI3K, PIP₂ (Fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat)'ı fosforile ederek PIP₃ (Fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfat)'a dönüştürmektedir. PIP₃ hücre içi sinyal iletimini, Akt ve PDK1 (Fosfoinozimid Bağımlı Kinaz 1) moleküllerinin PH (Plekstrin Homoloğu) domainlerine direkt olarak bağlanarak devam ettirir. PDK1, AKT'nin treonin 308 rezidüsünü, mTORC2 (Memeli Rapamisin Hedef Kompleksi 2) ise Akt'nin serin 473 rezidüsünü fosforile ederek aktive eder. Aktif Akt, hedef proteinlerini fosforile ederek aktivasyon veya inhibisyonlarına yol açmaktadır. Bu hedef proteinlerden, Bcl-2 protein ailesinde yer alan BAD ve BAX pro-apoptotik etkili proteinlerini inhibe ederek hücrelerin sağkalımını tetiklemektedir. Bununla birlikte, NF-κB transkripsiyon faktörünü aktive ederek anti-apoptozis ve sağkalım ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırır. Aktif Akt, Mdm2 transkripsiyon faktörünü fosforile ederek p53-aracılı apoptozisi engeller ve FOXO transkripsiyon faktörünü negatif olarak düzenleyerek hücrede apoptozisi destekleyen proteinlerin ekspresyonunu azaltır. Aynı zamanda Akt, TSC2 transkripsiyon faktörünü fosforile ederek, Rheb antagonisti TSC1/TSC2 dimer aktivasyonunu inhibe etmekte ve Rheb GTPase aktivasyonunu gerçekleştirmektedir. Aktive olmuş Rheb, mTORC1'i indüklemekte ve böylece inisiyasyon faktörü olan 4E-BP1'in biyolojik cevabı olarak protein sentezi oluşmaktadır. mTORC1'in indüklediği S6 kinaz da PI3K aktivasyonunu negatif geri-bildirim yoluyla düzenlemektedir [8].

PI3K yolağının meme kanseri hücrelerinde sıklıkla uğradığı genetik değişimler, EGFR, HER2 ve HER3 RTK amplifikasyonları, PTEN mutasyonu/kaybı, PI3K katalitik altbirimi (p110α) mutasyonları olarak sıralanabilir. Bu değişiklikler, PI3K/Akt yolak aktivasyonunun artmasına ve onkojenik bir potansiyel kazanmasına yol açmaktadır [9, 10].

Hücrede gerçekleşen bu değişimler, karsinogenezi ve hücrelerin fizyolojik kontrol mekanizmalarından kaçmasını sağlamaktadır. Sinyal yolağında oluşan işlev bozukluklarına müdahale etmek için değişik terapötik stratejiler geliştirilmektedir [11].

Trastuzumab, Lapatinib gibi HER reseptörlerine (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri) özgül hedeflenmiş tedavi ajanlarının meme kanserinde kullanımı oldukça yaygındır. Rapamisin, Temsirolimus, Everolimus gibi rapalog sınıfı inhibitörler mTOR inhibisyonu yapmaktadır. MK-2206 Akt inhibitörü olarak, Buparlisib PI3K inhibitörü olarak, PI-103 ise dual etki gösteren PI3K/mTOR inhibitörü olarak kullanılan ajanlardır [11, 12].

Kullanılan bu terapötik ajanlar ile, PI3K/Akt/mTOR yolağı moleküllerinin hücre proliferasyonu, sağkalım ve motilite artışına yol açan etkilerinin inhibe edilmesi hedeflenmektedir. Bu aşamada, hücrelerin ilaca direnç göstermesi, ilaç toksisitesinin yüksek olması gibi ilaç etkinliğini azaltan durumlarda ise birden fazla terapötik ajanın kombinasyonu yapılarak farklı tedavi stratejileri geliştirmek gerekmektedir [13].

PI3K/Akt/mTOR kaskadı, RTK'lardan aldığı sinyali efektör moleküllere ileterek hücrede metabolizmayı, çoğalmayı, büyümeyi, sağkalımı ve motiliteyi kontrol etmektedir. Tümör hücrelerinde, RTK mutasyonu (ör:EGFR), gen amplifikasyonu (ör:HER2), PI3K mutasyonu ve/veya PTEN delesyonu sıklıkla görülmektedir. Bu değişiklikler, sinyal yolağının kontrolsüz aktivasyonuna yol açmaktadır [14].

HER reseptörlerinden HER2'nin ligand bağlanma bölgesi yoktur. Diğer bir HER reseptörü olan HER3 ise kinaz aktivitesine sahip bölge içermemektedir. Buna göre, HER2 ile HER3 heterodimer oluşturarak hücre içi sinyal iletiminde rol oynamaktadır [15]. HER2 reseptörünün HER3 reseptörü ile oluşturduğu heterodimer güçlü mitojenik sinyaller oluşturması bakımından meme kanseri patolojisinde önemlidir. Özellikle HER2'nin aşırı eksprese edildiği hücrelerde HER3, tümör gelişimi ve hücre proliferasyonu için gerekli bir reseptördür [16].

HER2 amplifikasyonu olan tümör hücrelerinde PI3K/Akt aktivasyonu negatif geri-bildirim yapmak suretiyle, HER3 aktivasyonunu ve ekspresyonunu inhibe etmektedir. İnsan meme kanseri tümör hücre dizisi olan BT-474 hücrelerinde, Akt inhibitörü uygulanarak yapılan deneyler, bu negatif geri-bildirim yolağının bozulduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak,

Akt inhibisyonu sonrasında fosforile-HER3 ekspresyonu indüklenmiştir. Buna ilaveten, Rapamisin ile mTORC1 inhibisyonu yapılması da yine negatif geri bildirim mekanizmasını bozarak PI3K molekülünün re-aktivasyonuna yol açmaktadır [14].

AKT inhibitörü ile AKT aktivasyonu inhibe edildiğinde de, mTORC1 aracılı negatif geri bildirim mekanizmasının ortadan kalkması söz konusudur. Ayrıca, Akt inhibisyonu olduğunda FOXO transkripsiyon faktörü üzerinde Akt'ın inhibitör etkisi ortadan kalkmaktadır. Bunun sonucunda, FOXO aracılı RTK ekspresyonu artmakta ve yine PI3K re-aktivasyonu olmaktadır [14, 17].

Dual PI3K ve mTOR inhibitörü olan PI-103, PI3K ve mTOR komplekslerinin aktivasyonunu engeller. PI-103, PI3K'nın katalitik altbirimi olan p110 α ile etkileşime girerek PI3K'ı inaktive ederken aynı zamanda mTOR kompleksleri olan mTORC1 ve mTORC2'nin aktivasyonlarını da bloke etmektedir [18-20].

Anabilim Dalımızda daha önce yapılan bir çalışmada, HER2 amplifikasyonu olan insan meme kanseri hücre dizisi olan SKBR-3 hücrelerinde, PI-103'ün total HER2 ve total HER3 reseptör tirozin kinazların ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, PI-103'ün yolak aktivasyonu üzerinde zamana bağlı geçici inhibitör etkisi gösterilmiş olup, total HER2 ve total HER3 ekspresyonlarında anlamlı bir fark izlenmemiştir [21]. Bu aşamada, PI-103 inhibitörünün, aktive RTK ekspresyonlarına (p-HER2 ve p-HER3) etkisinin de incelenmesi, farmakolojik inhibisyonun sinyal yolağı dinamiğini nasıl etkilediğine ışık tutacaktır.

Bu çalışmada PTEN tümör baskılayıcı geni mutasyona uğramamış olan ve HER2 amplifikasyonu olan SKBR-3 hücrelerinde; 1) PI-103'ün aktive reseptör tirozin kinaz (p-HER2 ve p-HER3) ekspresyonuna etkisi, 2) PI-103, AKTi ve Rapamisin'in HER2 ve HER3 gen ekspresyonlarına etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Meme Kanseri

Meme kanseri morfolojik açıdan homojen bir karakter göstermekle birlikte, biyolojik karakteri ve klinik seyri açısından heterojen bir yapıya sahiptir [22]. Gen ekspresyon profili açısından meme kanseri Luminal A, Luminal B, HER2⁺ ve Basal Benzeri (*Basal-like = Triple Negative Breast Cancer (TNBC)*) olmak üzere 4 alt tipe ayrılmaktadır. Bu alt tipler, patolojik dokuların immünohistokimyasal çalışmalar sonucu ER (Östrojen Reseptörü = *Estrogen Receptor*), PR (Progesteron Reseptörü = *Progesterone Receptor*) ve HER2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü = *Human Epidermal Growth Factor Receptor*) ifadelerine göre belirlenmektedir [23]. Luminal A ve B alt tipi, bir diğer adıyla hormon reseptör-pozitif meme kanseri tipi, diğer alt tiplere oranla daha iyi prognoz göstermekte olup 5 yıllık sağkalım %80-85 düzeylerindedir. Hormon reseptör-pozitif meme kanseri alt tipine ait vakaların %40'ı PIK3CA mutasyonu taşır, PI3KCA mutasyonu olmasına ve yolağın aktif olmasına karşın düşük mTORC1 sinyal aktivitesi düşüktür. Bazal benzeri veya Triple-negatif meme kanseri tipi, hormon reseptörleri ve HER2 açısından negatif, CK5/6 (*cytokeratin 5/6 = sitokeratin 5/6*) veya EGFR açısından pozitiflik göstermektedir. Genel olarak aşırı PI3K aktivasyonu ve PTEN kaybı ile ilişkilidir ve kötü prognoz göstermektedir. HER2⁺ meme kanseri tipi ise agresif fenotipte olup, kötü prognoz göstermektedir. Ortalama sağkalım süresi diğer gruplara oranla daha kısadır [4, 24]. Konvansiyonel sınıflandırmalara ilave olarak yeni yapılan çalışmalar meme kanseri vakalarında mutasyona uğrayan genlerin genomik ve transkriptomik ifadeleri açısından 10 farklı alt tipe sahip olduğunu göstermektedir [25].

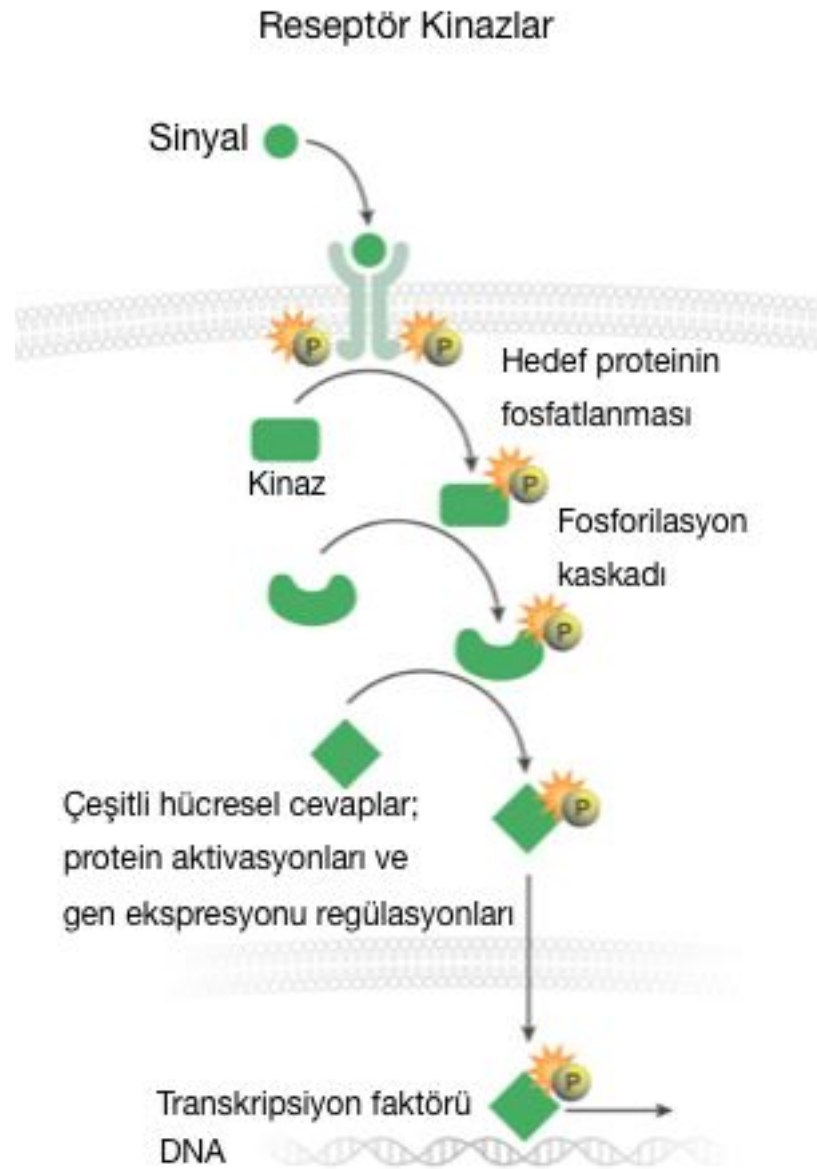
Tüm kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinde de, normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesi çok basamaklı bir süreç sonucu gerçekleşmektedir [4]. Bu süreç sonucu, normal hücrede gerçekleşen genetik değişimler hücreye malign karakter kazandırmaktadır [26, 27]. Hücre

fonksiyonlarının regülasyonunu sağlayan büyüme, proliferasyon ve apoptozis ile ilişkili sinyal mekanizmalarının kontrolünün ortadan kalkması ve/veya bozulması neoplastik hücre transformasyonunun temelini oluşturmaktadır. Karsinojenik süreç içerisinde yer alan ve büyüme faktörü reseptörleri (*Growth Factor Receptor = GFR*) aracılı sinyal iletim yolağı olan PI3K/Akt/mTOR (*Phosphatidylinositol 3-kinase/ Protein Kinase B/ Mammalian Target of Rapamycin = Fosfatidil inositol-3-kinaz/Protein Kinaz B/Memeli Rapamisinin Moleküler Hedefi*) kaskadı meme kanseri gelişiminde önemli rol oynamaktadır [4, 28].

Genomik stabiliteyi koruyan genlerden (caretaker) olan BRCA1 ve BRCA2 (*Breast Cancer Susceptibility Gene*) genlerinin mutasyonu veya az eksprese edilmesi kalıtsal veya sporadik meme kanseri riskini arttıran önemli unsurlardan bir tanesidir [29, 30].

2.2 Reseptör Tirozin Kinaz (RTK)

Tüm çok hücreli organizmalarda hücreler, direkt olarak hücre-hücre etkileşimi ile veya salgılanarak parakrin/otokrin modelde sunulan sinyal molekülleri tarafından uyarılır. Ligand olarak adlandırılan bu sinyal molekülleri hücre yüzeyinde transmembran protein olarak yer alan reseptörler tarafından tanınır. Özgül ligandın reseptöre bağlanması sonucu hücre içi sinyal yolağı aktivasyonu gerçekleşir. Sinyal yolağı aktivasyonu ile hücre içi proteinlerin fosforilasyonu gerçekleşir. Bu sayede sinyal molekülünün uyarısı ile gen ekspresyonu değişikliği ve biyolojik cevap oluşur (Şekil 2.1) [5, 31].



Şekil 2.1. Reseptör kinaz aktivasyonu ve hücre içi sinyal yolağı

(Wilson E.O., 2014'den (Ref. 31) uyarlanmıştır.)

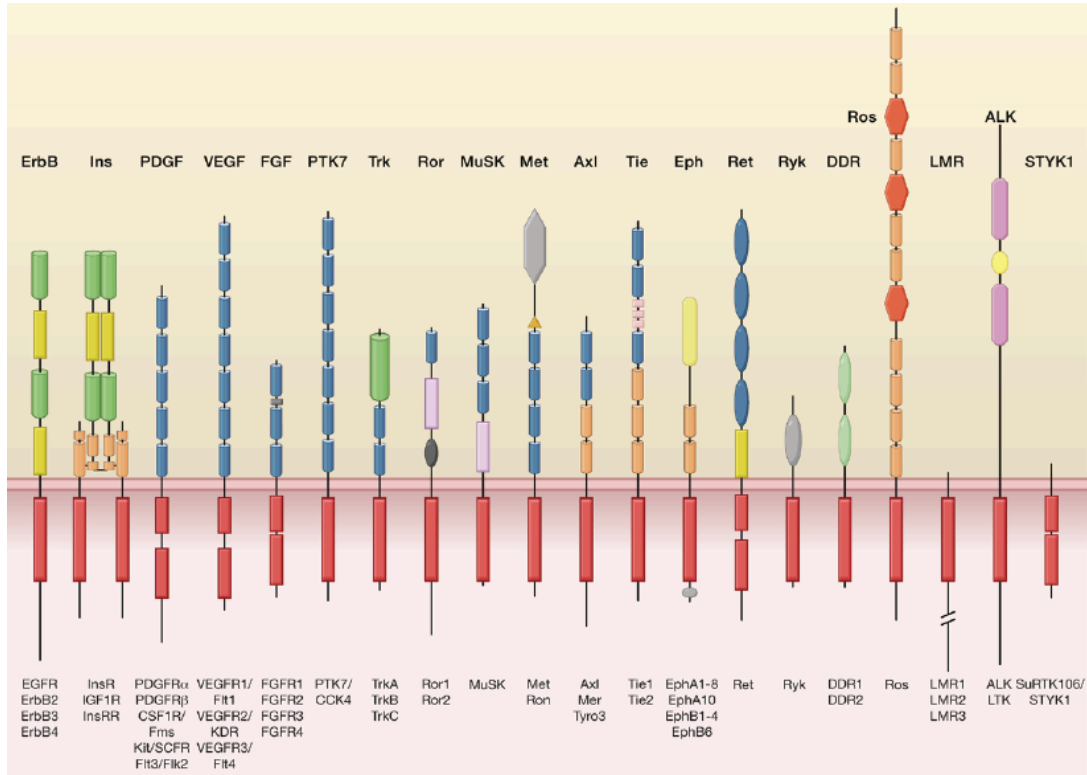
Hücre yüzeyi reseptör proteinlerinden biri olan reseptör tirozin kinazlar (RTK) hücreyel sağkalım, proliferasyon, diferansiyasyon, migrasyon ve hücre döngüsü gibi biyolojik cevapların regülasyonunda önemli rol oynamaktadır [32]. İnsan genomunda 90 farklı tirozin kinaz geni tanımlanmakla beraber, insanda 20 altgruba ait toplamda 58 adet farklı RTK olduğu bilinmektedir (Şekil 2.2) [5, 33]. Hücrenin çeşitli etkenlere maruziyeti ile birlikte oluşan

genetik değişiklikler ve anomaliler sonucu RTK'ların aktivasyonlarında, hücre yüzeyindeki dağılımlarında ve regülasyonlarında değişimler ortaya çıkmaktadır. RTK'larda oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkan hücre içi sinyal yolağının aşırı aktivasyonu çeşitli anomaliler oluşturduğu gibi karsinogenik süreci de tetiklemektedir [5, 34].

2.2.1 Reseptör Tirozin Kinaz Yapısı

Tüm RTK'ların hücre dışında bulunan ligand bağlanma domaini, membrana yakın (juktamembran = *juxtamembrane*) bölgede bulunan transmembran heliks, sitoplazmik bölgede bulunan tirozin kinaz domaini ve karboksi (C-) terminal bölgesi bulunmaktadır [5]. İnsülin reseptörü (IR) grubu haricinde bilinen tüm reseptör tirozin kinaz grupları hücre yüzeyinde monomerik yapıda ve inaktif formda bulunurlar [35].

RTK'ların hücre dışında bulunan immunoglobulin benzeri (*Ig-like*) domainleri, sisteince zengin (*cistein-rich*) domainleri, fibronektin tip III benzeri domainleri ve EGF benzeri (*Epidermal Growth Factor-like* = Epidermal Büyüme Faktörü benzeri) domainleri gibi farklı modüllerin varlığı gruplar arası çeşitliliği sağlamaktadır. Bu çeşitlilik, RTK'lara spesifik ligandların özgül bir şekilde bağlanmasını sağlamaktadır. Transmembran heliks domaini sayesinde RTK'lar hücre membranına bağlanmış olarak bulunurlar. Sitoplazmik bölgede bulunan tirozin kinaz domaini, katalitik aktiviteyi oluşturmakta ve sinyal yolağı aktivasyonunu sağlamaktadır [36, 37].



Şekil 2.2. Reseptör tirozin kinaz ailesi ve yapısal çeşitlilikleri

(Lemmon M.A., Schlessinger J., 2010'dan (Ref. 5) alınmıştır.)

2.2.2 Reseptör Tirozin Kinaz İşlevi ve Aktivasyonu

İnaktif formda bulunan reseptör tirozin kinazların aktivasyonları iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Polipeptit bivalent ligandların monomerik yapıları RTK'ların hücre dışı ligand bağlanma bölgesine spontan olarak tutunması ile birlikte RTK'ların dimerizasyonu gerçekleşir. Ligandların reseptör ile etkileştiği ve reseptörlerin direkt olarak etkileşiminin olmadığı modele ligand aracılı dimerizasyon, monomerik reseptörlerin direkt olarak etkileştiği dimerizasyona reseptör aracılı dimerizasyon denilmektedir. Ligand aracılı dimerizasyona örnek olarak VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* = Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü), reseptör aracılı dimerizasyona örnek olarak EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor* = Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) verilebilir [5]. Her iki durum için de RTK aktivasyonu için ligand ile uyarım gerekmektedir.

Bu aşamadan sonra RTK aktivasyonu için iki temel ihtiyaç vardır. Birincisi reseptörün katalitik aktivasyonu, ikincisi ise yolak proteinleri uyarımını sağlayacak tirozin rezidülerinin fosforilasyonudur. Ligandın uyarımı ile birlikte RTK yapısında transmembran heliks ve sitoplazmik bölgede konformasyonel değişim gerçekleşir. Bu sayede, ATP yapısında bulunan Y-fosfat katalizlenir ve reseptörün tirozin rezidülerinde bulunan hidroksil gruplarına (aktivasyon ilmeği) transferi gerçekleşir. Bu olaya otofosforilasyon denir. Fosforile olmuş tirozin rezidüleri, SH2 (*Src homology 2* = Src Homolog Domaini), SH3 (*Src homology 3* = Src Homolog Domaini), PTB (*Phosphotyrosine-binding* = Fosfotirozin-bağlayıcı Domain) adı verilen fosfotirozin tanıyan rezidülere sahip proteinlerin bağlanmasını sağlar. Bu sayede liganda ve RTK'ya özgül sinyal iletim yolağı kaskad proteinlerinin fosforillenmesi sonucunda transkripsiyonel regülasyon sağlanır ve biyolojik cevap oluşturulur [5, 32, 35, 36, 38-40].

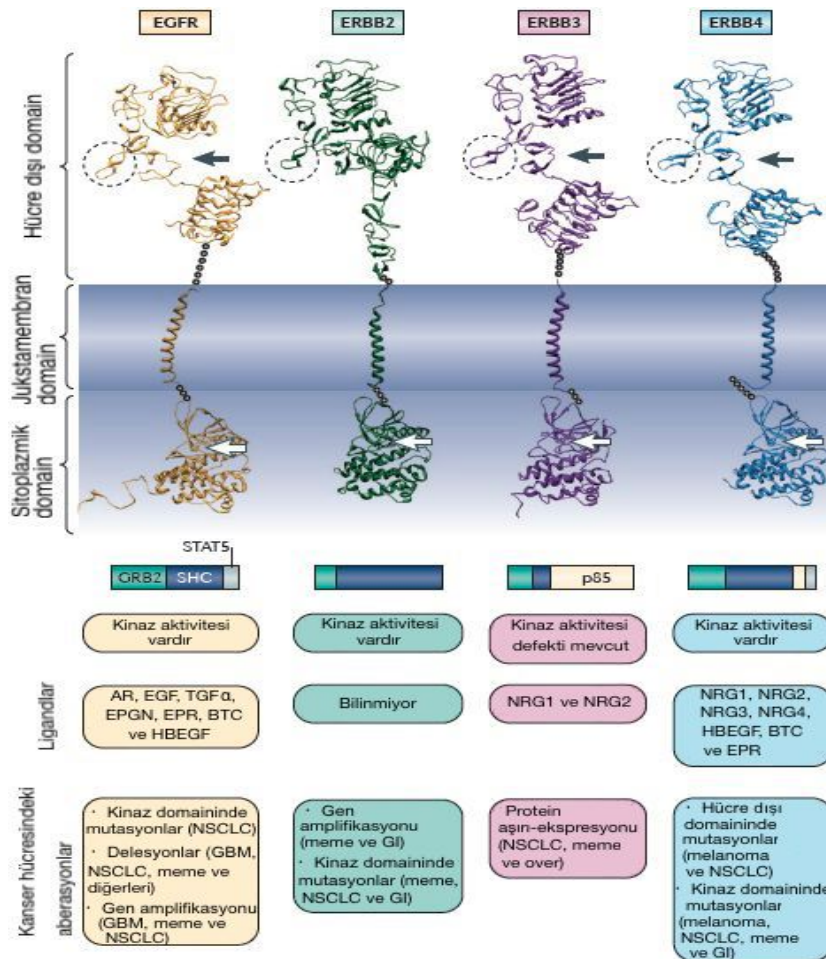
RTK aracılı sinyal iletim mekanizmasında oluşan onkojenik füzyon proteinleri (kromozomal translokasyon), mutasyonlar veya delesyonlar sebebiyle oluşan aşırı aktivasyon ve gen amplifikasyonları sebebiyle RTK'ların aşırı ifadesi sonucu kanser oluşumu gözlemlenmektedir [41, 42]. Meme kanserinde en sık karşılaşılan RTK irregülasyonları, EGFR tirozin kinaz ailesinde gözlemlenmektedir [43].

2.3 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri (EGFR) ve Regülasyonu

RTK süperalesinin tanımlanan ilk ailesi olan EGFR (HER = ERBB = Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü = *Epidermal Growth Factor Receptor*) aynı zamanda intrinsik protein kinaz aktivitesi gösteren prototipik bir reseptör ailesidir [44]. Nobel ödüllü Rita Levi- Montalcini ve Stanley Cohen'in 1957 yılında tümör hücrelerinden izole ettikleri NGF'nin (Sinir Büyüme Faktörü = *Nerve Growth Factor*) yenidoğan fareye enjeksiyonu sayesinde farenin fizyolojik gelişiminin hızlandığı ve gözlerinin normalden daha kısa sürede açıldığı gözlemlenmiştir [45, 46]. Bu çalışmalardan sonra Cohen ve ekibi

keşfedilen ikinci polipeptid olan EGF'yi izole etmeyi başarmışlar ve Graham Carpenter ile yaptıkları çalışmalar ile EGFR'yi tanımlamışlardır [47, 48].

ErbB (*Avian erythroblastosis oncogene B*, EGFR) grubu reseptör tirozin kinazlar 4 üyeden oluşmaktadır. Bunlar, Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (EGFR, ErbB1), HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* = İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü, ErbB2), HER3 (ErbB3) ve HER4 (ErbB4)'tür [49]. ErbB ligandları HER2'ye direkt olarak bağlanamamaktadır. Ancak, diğer ErbB reseptör ailesi elemanları ile dimerizasyonu sayesinde kinaz aktivitesi sağlamaktadır [49]. HER3 ise kinaz aktivitesinden yoksun olduğu için sadece heterodimer formda reseptör aktivasyonu gösterebilmektedir [50-52] (Şekil 2.3)

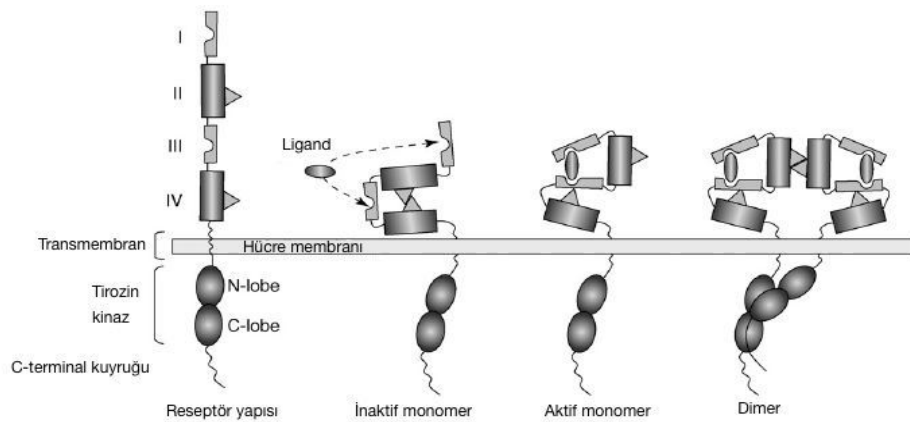


Şekil 2.3. EGFR reseptör tirozin kinaz ailesi yapı ve özellikleri

(Yarden Y., Pines G., 2012'den (Ref. 46) uyarlanmıştır.)

EGFR ailesine spesifik olarak bağlanabilen şimdiye kadar tanımlı 13 ligand bulunmaktadır [53]. Bunlar 3 gruba ayrılmaktadır. İlk grubu oluşturan ligandlar EGF, TGF- α (*Transforming Growth Factor* = Dönüştürücü Büyüme Faktörü), AR (*Amphiregulin* = Amfiregülin) ve EPG (*Epigen* = Epigen) spesifik olarak EGFR'ye bağlanmaktadır. İkinci grubu oluşturan BTC (*Beta-cellulin* = Betaselülin), HB-EGF (*Heparin-binding EGF* = Heparin-bağlı EGF) ve EPR (*Epiregulin* = Epiregülin) hem EGFR hem de ErbB4'e bağlanan dual spesifik ligandlardır. Son grubu oluşturan NRG'ler (*Neuregulins* = Nörogülinler) ise hem ErbB3 hem de ErbB4'e özgül olan ligandlardır [54, 55].

ErbB reseptörlerinin hücre dışı bölgesinde 4 domaini (I-IV) bulunur. Bu yapının I. ve III. domainleri ligand bağlanma domainleri olarak bilinmektedir. II. ve IV. domain ise reseptör-reseptör etkileşiminin sağlandığı dimerizasyon kolu olarak bilinmektedir. Spesifik ligandların EGFR, HER3 veya HER4'ün hücre dışı bölgesine bağlanması ile hetero veya homo-oligomer kinaz aktif formun oluşması tetiklenmektedir [50]. HER2'nin diğer ErbB reseptör ailesi üyelerinden farklı olarak, bilinen bir ligandı yoktur. HER2'nin I. ve III. domain bölgelerinin birbirine çok yakın olması EGF ilişkili bir ligandın bağlanmasını imkansız hale getirmektedir. Ayrıca HER2'nin bu özel yapısal formundan dolayı homodimerize olması, elektrostatik itme gücü oluşmasına yol açmaktadır. Bu durum HER2'nin tirozin aktivasyonu için neden heterodimer oluşturması gerektiğini açıklamaktadır [15, 55] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. EGFR ailesi reseptörlerinin dimerizasyon kolu aracılığı ile etkileşimi (Sergina N. V., Moasser M. M., 2007'den (Ref. 105) uyarlanmıştır.)

ErbB reseptör ailesi ligand-bağımlı aktivasyon modeline göre aktive olmaktadır. Ligand bağlandıktan sonra ErbB reseptörleri homo veya heterodimer oluştururlar. Dimerizasyon basamağından sonra reseptörlerin sitoplazmik bölgede bulunan tirozin kinaz domainlerinin otofosforilasyonu gerçekleşir. Fosforile olan C-terminal tirozin rezidüleri SH2, SH3 ve PTB domainlerine sahip adaptör proteinlerin, protein kinazların veya protein tirozin fosfatazların bağlanması için özgül olarak fosforile olurlar. Adaptör proteinlere Shc, Crk, Grb2, Grb7 ve Gab1, kinazlara Src, Chk ve PI3K ve protein tirozin fosfatazlara da SHIP1 ve SHIP2 örnek verilebilir. Hücre içi aracı moleküllerin fosforilasyonu ile birlikte sinyal yollarının aktivasyonu gerçekleşir. PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase* = Fosfatidil inositol-3-kinaz) ve Ras/MAPK (*Rat sarcoma/mitogen activated protein kinase* = Fare sarkoma/mitojen aktive edilmiş protein kinaz) yolları tüm ErbB reseptörleri ile aktive olabilir. Bunlar dışında JAK/STAT ve PKC yollarının aktivasyonları da sağlanmaktadır [15, 52].

2.4 Epidermal Büyüme Faktörü (EGFR) ve Kansere İlişkisi

ErbB onkogenik bir retrovirüs olmakla birlikte, yaklaşık 30 yılı aşkın süredir insanda kanser patogeneziyle ilişkili bir reseptör ailesi olduğu bilinmektedir [50, 56]. ErbB reseptörlerinin dimerizasyon artışı sonucu hem hücre dizilerinde hem de primer insan tümörlerinde onkogenik transformasyon gözlenmiştir [52].

ErbB1, normal fizyolojik koşullarda deri ve skuamöz epitelin gelişmesinden sorumlu birincil büyüme faktörü reseptörüdür. Ailenin diğer 3 üyesi ise meme dokusunun gelişiminin yanısıra, kardiyovasküler sistem ve sinir sistemi gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar [53].

ErbB2 veya HER2'nin kanser gelişiminde rol aldığı ilk olarak, fare ortoloğu olan Neu onkogeninin mutant cDNA'sının karsinojenle indüklenen nöroblastomadan izole edilmesi ile bulunmuştur. HER2/neu gen amplifikasyonunun meme kanseri vakalarında %30 oranında görüldüğü ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca mide, özafagus ve over

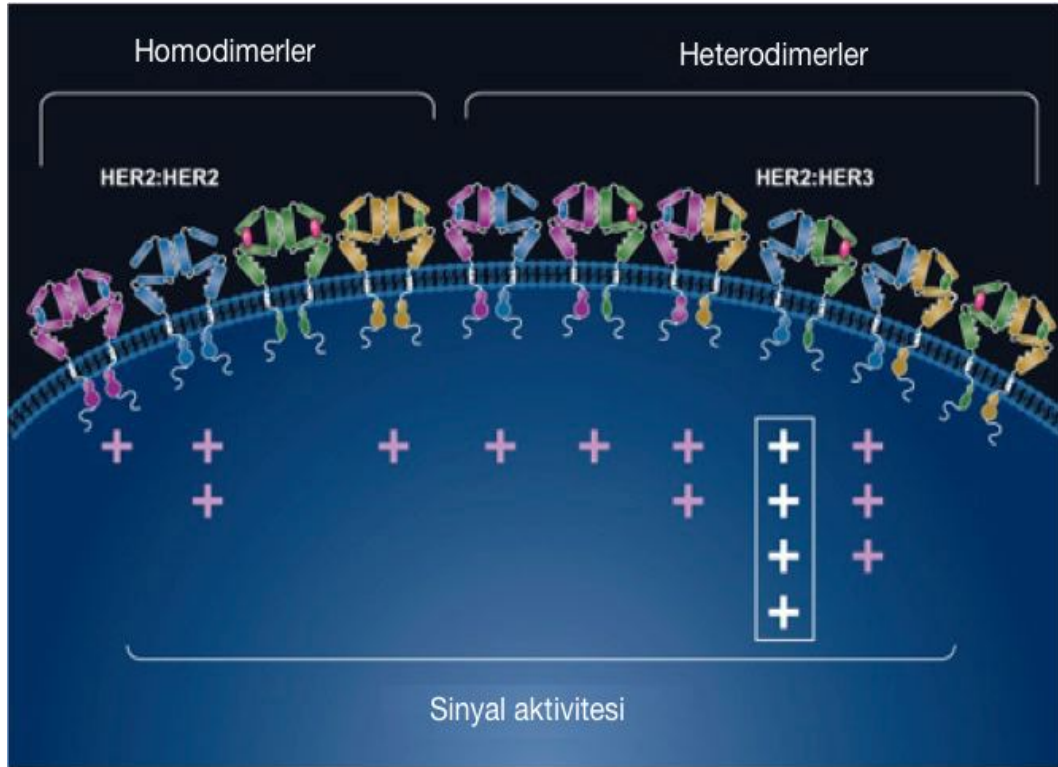
kanseri gelişiminde de rol oynadığı bilinmektedir [49, 53, 57]. HER2/neu geni 17q kromozomunda lokalize olmakta ve transmembran tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörü olarak kodlanmaktadır [58]. Normal bir hücrede yaklaşık olarak 100.000 HER2 reseptörü bulunurken kanserli bir hücrede bu sayı yaklaşık olarak 2 milyon reseptöre ulaşmaktadır [46, 53]. HER2⁺ tümörlerde yüksek oranlarda anöploidi, somatik mutasyonlar, TP53 mutasyonları ve FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor* = Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü), EGFR, CDK4 (*cyclin dependent kinase-4* = siklin bağımlı kinaz-4) ve siklin D1 amplifikasyonları görülmektedir [49]. ErbB2'nin aşırı ekspresyonu büyük ölçüde meme ve over kanseri oluşumunu tetiklemekte ve kötü prognoz göstermektedir [59].

ErbB3 (HER3), diğer ErbB ailesi üyelerinden iki yönden farklılık göstermektedir. İlk olarak HER3, kinaz domaini defektine sahiptir. ATP bağlamasına rağmen katalitik olarak fosfo-transfer reaksiyonunu gerçekleştirememektedir. İkinci olarak HER3, C-terminal fragmentinde 6 fosfo-tirozin bölgesine sahip olup, bu sayede PI3K/AKT yolağının en güçlü aktivatörüdür [60]. HER3'ün kinaz aktivasyonu eksikliğinden dolayı HER3 homodimerizasyonu sinyal yolağı aktivasyonunu gerçekleştiremez. Dolayısıyla, diğer RTK ailesi üyeleri ile heterodimerizasyon yaparak aktive olur [61].

ErbB4 mutasyonlarına genellikle melanoma, akciğer adenokarsinomu ve medullablastoma vakalarında karşılaşılmaktadır. ErbB4'ün bilinen 7 ligandı bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar miyokard ekspresyonunda ve dolayısıyla ventriküler diferansiyasyonda önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu sebepten dolayı, ErbB4 mutasyonu olan farelerde aritmilerin geliştiği bilinmektedir [49, 62].

Meme kanseri tümör gelişiminde rol oynayan ErbB3 ile ErbB2'nin spontan heterodimer oluşturması ile proliferasyonu arttırmaktadır. NIH 3T3 fibroblast hücre dizilerinde ErbB3 ekspresyonu ErbB2 aracılı transformasyonu ve tümorojenik büyümeyi arttırdığını göstermiştir. Bu tip

sinerjik etkilerin aşırı ifadeleri sonucu hücre çoğalmasının düzensizliği ile birlikte tümör progresyonu gelişmektedir [52]. HER3'ün hücre dışı domaininde oluşan mutasyonlar sonucu heterodimerin onkojenik potansiyeli artmakta ve HER2'nin aşırı ekspresyonu ile birlikte ligand-bağımsız tirozin kinaz aktivasyonu oluşmaktadır. Bu durum, bazı konvansiyonel terapilerin inhibitör etkilerini etkisiz hale getirmektedir [49, 52, 59, 63] (Şekil 2.5)



Şekil 2.5. HER ailesi dimerizasyonlarının sinyal aktivitesi
(www.biooncology.com'dan uyarlanmıştır.)

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda ErbB reseptör ailesinin kontrolsüz şekilde ekspresyonu, spontan dimerizasyonu ve aşırı tirozin kinaz aktivasyonu sonucu mitojenik sinyal yolları sürekli aktive olmakta ve bu süreç ile birlikte tümör hücresinin proliferasyonu hız kazanmaktadır.

2.5 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı

PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase* = Fosfatidil inositol-3-kinaz) farklı genler tarafından kodlanan, regülatör ve katalitik birimlerden oluşan, heterodimerik yapıda bulunan bir lipid kinazdır. PI3K sinyal yolağı, hücre proliferasyonu ve büyümesi, apoptozis ve hücre iskeletinin düzenlenmesi gibi birçok hücresele süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [10, 64].

PI3K proteini üç sınıfa ayrılmaktadır. PI3K sınıf I, p85 regülatör ve p110 katalitik olmak üzere iki altbirimlerden oluşmaktadır. PI3K sınıf I kendi içerisinde A ve B olmak üzere iki altsınıfa ayrılmaktadır. PI3K sınıf IA direkt olarak reseptör tirozin kinazlar tarafından aktive edilmektedir. PI3K sınıf IB ise GPCR (*G Protein Coupled Receptor* = G protein-eşleşmiş reseptör) tarafından aktive edilmektedir [65, 66]. PI3K sınıf II'nin membrana lokalizasyonunun ve Adb (*Adaptor-binding site* = Adaptör bağlanma bölgesi) domaininin mevcut olmamasıyla birlikte, yüzey reseptörlerin endositozundan sorumlu olan klatrin molekülüyle ilişkili aktivasyonu olduğu bilinmektedir [66-68]. PI3K sınıf III, Vps34p geni tarafından kodlanmaktadır. İlk olarak mayalarda PtdIns (fosfatidilinositoller) fosforilleyerek PtdIns-3-P (PIP₃)'a dönüşümünü sağlayan tek protein olarak keşfedilmiştir. Sadece FYVE ve PX (*Phox homology*) domainine sahip proteinler tarafından tanınabilmektedir [66, 69, 70].

Ligand tarafından otofosforile olan RTK, PI3K'ı direkt olarak veya indirekt olarak fosforile etmektedir. İndirekt fosforilasyonda, aktive olmuş RTK, adaptör protein olan IRS 1/2 (*Insulin Receptor Substrate* = İnsülin Reseptör Substrat)'yi fosforile eder. Daha sonra, adaptör protein, membrana lokalize olmuş PI3K'ın regülatör altbirimi olan p85'li SH2 (*SRC Homology 2*) domainini fosforile ederek aktive etmektedir. Direkt fosforilasyonda ise, aktive RTK adaptör proteine ihtiyaç duyulmadan direkt olarak membrana lokalize olan PI3K'ın p85 altbiriminin SH2 domainini fosforile ederek aktivasyonu sağlar. Her iki durumda da PI3K'ın katalitik altbirimi olan p110, p85'in inhibitör etkisinden kurtulur ve katalitik domaini ile PIP₂ (*Phosphatidylinositol*

4,5-diphosphate = Fosfatidilinositol 4,5-difosfat)'tan, PIP_3 (*Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate* = Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat)'a dönüşümünü gerçekleştirir [10, 71]. Normal fizyolojik koşullarda heterodimerik yapıda p85, p110 aktivasyonunu baskılamaktadır [72].

PI3K yolağı, hücre büyümesi, apoptozis direnci, invazyon ve migrasyon ile ilişkilidir. PIP_2 'in PIP_3 'a dönüşümü sonrası, PIP_3 membrana lokalize olarak PH (*Pleckstrin homology* = Plekstrin Homoloğu) domainine sahip proteinler için bağlanma ve aktivasyon bölgesi oluşturmaktadır [66]. PIP_3 oluşumu ile PH domainine sahip ve serin/treonin protein kinaz olan Akt'nin membrana translokasyonu ile birlikte aktivasyon başlamış olur [71, 73]. Yolağın inaktif olduğu koşullarda, CTMP (*Carboxy-terminal Modulator Protein* = Karboksi-uç Modulatör Protein), Akt'nin fosforilasyonunu engellemektedir. Akt'nin membrana translokasyonu sonrası CTMP fosforile olur ve Akt üzerindeki inhibitör etkisini kaybeder ve Akt'nin fosforilasyonu gerçekleşir [10].

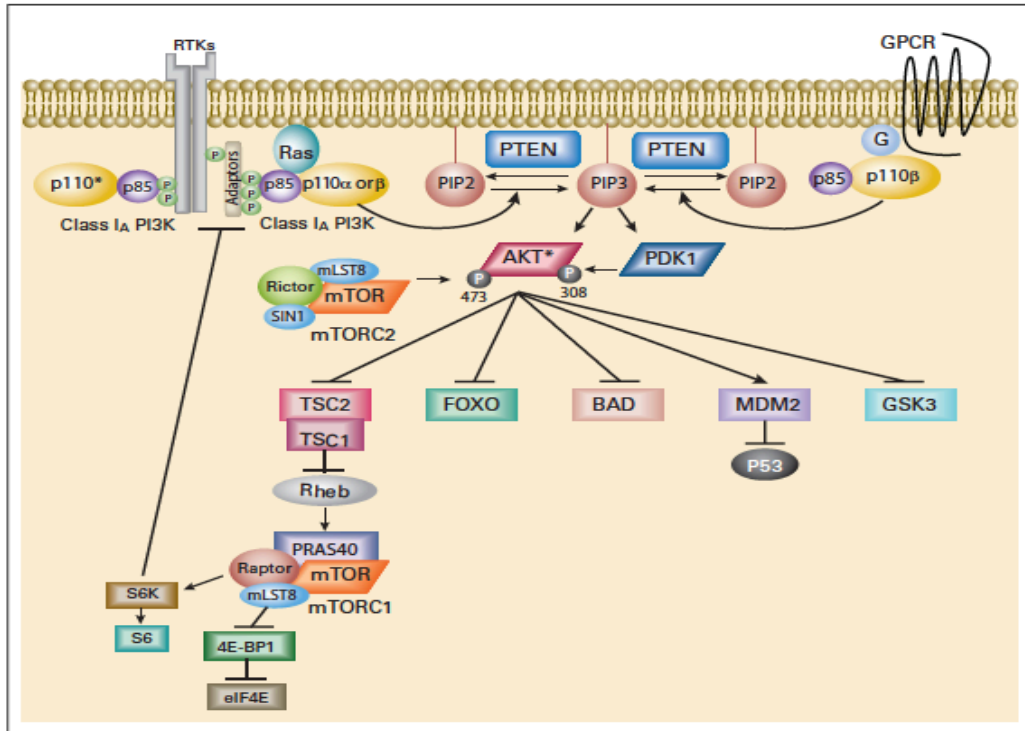
Akt proteini hücre proliferasyonu, metabolizması, sağkalımı, invazyonu, migrasyonu, apoptozisi ve DNA onarımı gibi biyolojik süreçlerde anahtar regülatör görevi görmektedir [4]. Akt veya c-Akt 57 kDa ağırlığında ve farelerde lösemiye sebebiyet veren viral onkoprotein olan v-Akt'ın hücre homoloğu olan bir Ser/Thr kinazdır [71, 74]. Memeli genomunda Akt geninin 3 izoformu mevcuttur. Bunlar Akt1, Akt2 ve Akt3'tür. Amino asit dizilimi açısından Akt1, Akt2 ile %81 ve Akt3 ile %83 homoloji göstermektedir [71, 75]. Akt proteini N-ucunda PH domainine, orta bölgede kinaz domainine ve C-ucunda ise regülatör domainine sahiptir [71]. Akt1/PKB- α 'nın tam aktivasyonu için iki bölgeden fosforillenmesi gerekmektedir. Akt'nin ve PDK1'in PIP_3 'a bağlanması ile PDK1 Akt'nin aktivasyon lobunun T308 rezidüsünden fosforilasyonunu gerçekleştirir. Daha sonra, RTK tarafından aktivasyonu sağlanan mTORC2 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 2* = Memeli/Rapamisin'in moleküler hedefi kompleksi 2), Akt'nin regülatör lobunun S473 rezidüsünden fosforilasyonunu gerçekleştirir. Bu sayede Akt'nin tam aktivasyonu sağlanmış olur. S473 rezidüsünün PHLPP

fosfataz proteini tarafından defosforilasyonu sağlanarak, Akt aktivasyonu durdurulur [17, 76-78].

Akt direkt olarak BAD (*Bcl-2 associated death promoter*) pro-apoptotik proteinini fosforilleyerek aktivasyonunu bloke etmekte ve bu sayede anti-apoptotik fonksiyona sahip heterodimeri olan BCL-X_L (*B cell lymphoma-extra large*) proteinin ifadesini arttırarak hücrel sağkalımı sağlamaktadır [79]. Buna paralel şekilde kaspaz-9 ve FKHR/FOXO1 (*Forkhead Family of Transcription Factors* = Forkhead Kutusu Transkripsiyon Faktörü) proteinlerini fosforile ederek apoptotik faaliyeti baskılamaktadır [10]. Ayrıca, NF-κB (*Nuclear Factor of κB*)'yi fosforile ederek hücrel sağkalımı regüle etmekte ve pro-apoptotik tümör supresör geni olan p53'ün negatif regülatörü olan MDM2'yi fosforilleyerek p53'ün E3 ubiquitin ligaz aktivasyonu ile degradasyonunu sağlamaktadır [80-82]. Akt proteininin aktivasyonu ile fosforile olan GSK-3β (*Glycogen Synthase Kinase-3β* = Glikojen Sentez Kinaz-3β)'nin kinaz aktivitesi engellenmekte, siklin D1'in degradasyonunu önlemekte ve bu sayede hücre siklusu-proliferasyonu devam etmektedir [83]. Akt proteininin aktivasyonu ile fosforile olan serin/threonin kinaz olan mTOR'un aktivasyonu ile hücre büyümesi regüle edilmektedir. mTOR aktivasyonu ile p70S6 kinaz proteini fosforillenmektedir. Bu sayede mRNA 5' cap yapısı translasyonel represörü olan 4E-BP1 inhibe olmakta ve mRNA translasyonu artmaktadır [10, 77, 84]. PI3K AKT'den bağımsız olarak SGK (*Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase* = Serum ve Glukokortikoid-indüklenebilir kinaz) fosforile ederek hücrenin sağkalımını, küçük GTP-bağlanma proteinleri olan RAC1/CDC42 fosforile ederek hücrel ve hücre iskeletinin hareketini, PKC fosforile ederek transformasyonu regüle etmektedir [10].

PIP₃ fosfatazlar, PIP₃'ün PIP₂'a dönüşümünü sağlayarak PI3K mitojenik sinyal yolağını regüle etmektedirler. PTEN (*Phosphatase and Tensin Homology, MMAC1* = Onuncu kromozom üzerinde silinmiş fosfataz ve tensin homoloğu) 3' pozisyonunda bulunan fosfatı defosforile eden fosfatazdır. SHIP 1/2 ise 5' pozisyonunda bulunan fosfatı defosforile eden

fosfatazdır. PH domainine sahip sekonder mesajcı olan Akt proteini gibi, D3 pozisyonuna bağlanarak aktivasyon sağlayan proteinlerin aktivasyonunu engellemesi yönünden PTEN, mitojenik aktiviteyi kontrol etmesi açısından önemli bir fosfataz özelliğine sahiptir [10]. Yapılan çalışmalar, PTEN'in önemli bir tümör süpresör gen olduğunu ve PTEN mutasyonu sonucu meme kanseri, prostat kanseri ve glioblastoma riskini artırdığını göstermektedir [85, 86].



Şekil 2.6. PI3K/Akt/mTOR yoluğu ve hücre içi aracı moleküller

(Courtney KD., Corcoran RB., Engelman JA., 2010 (Ref. 8)'dan alınmıştır.)

PI3K sınıf IA RTK'lar tarafından aktive olmakta ve bazı kanser türlerinde fizyolojik fonksiyonunun deregüle olduğu bilinmektedir [10]. PI3K/Akt yoluğu, birçok kanser vakasında yolak proteinlerinin mutasyonları sonucu deregüle durumdadır. Özellikle PI3K altbirimi olan p110 α mutasyonu meme kanseri vakalarının %20-25'inde görülür. HER2⁺ meme kanseri vakalarında genellikle Akt mutasyonu görülmemektedir. Ayrıca birçok meme kanseri vakasında PTEN ekspresyonu düşük bulunmaktadır [54].

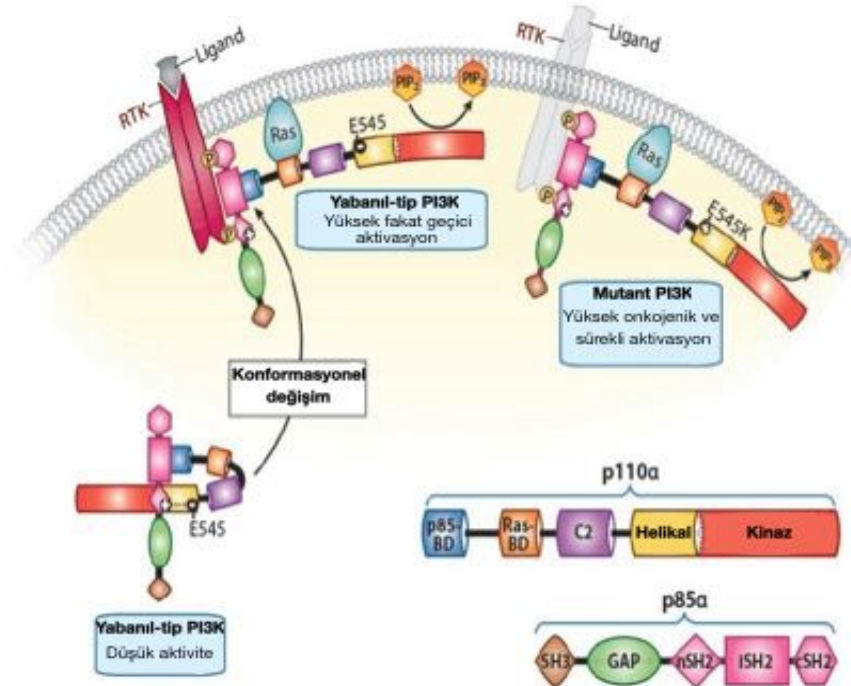
2.5.1 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı ve Meme Kanseri

PI3K/Akt/mTOR yolağı proteinlerinin mutasyonu sonucu sinyal yolağının regülasyonu birçok kanserde bozulmaktadır. PI3K sinyali direkt olarak, mutasyon sonucu (RTK ve Ras) aktivasyon kaynaklı, yolak proteinlerini kodlayan genlerin (Örn: PIK3CA ve Akt1) amplifikasyonu sonucu, PTEN gibi tümör supresörlerin kaybı gibi durumlarda artmaktadır [8, 69, 87, 88].

Kanser vakalarında en sık karşılaşılan genetik değişim PTEN tümör supresör genin inaktivasyonudur. Bu durum PIP₃ akümüülasyonuna (yığılımına) sebep olmaktadır. PTEN'de oluşan bir mutasyon veya gen delesyonu sonucu inaktivasyonu birçok kanser vakasında görülmektedir. PTEN inaktivasyonları, homozigot veya hemizigot delesyonu, transkripsiyonel düzeyde baskılanması, promotör bölgede hipermetilasyonu gibi epigenetik düzeyde olabilmektedir [10, 86, 89]. PIK3CA'nın ekzon 9 ve 20'de nokta mutasyonu sık rastlanan bir diğer durumdur. Ekzon 20 p110 α 'nın katalitik domainini kodlamakta ve burada oluşan mutasyon sonucu katalitik aktivite artmaktadır. Ekzon 9 p110 α 'nın helikal domainini kodlamakta ve burada oluşan mutasyon sonucu p110 α ile p85'in N-terminaldaki SH2 domaini ile oluşan kinaz aktivasyon etkileşimini ortadan kaldırmaktadır [87]. Birçok kanser vakasında p85 molekülünün altbirimi olan PIK3R1'de oluşan mutasyonlara sıklıkla rastlanılmaktadır [8]. Meme kanseri vakalarında PIK3CA, Akt, PTEN KRAS, HRAS, NRAS ve BRAF genlerinin mutasyonları sıklıkla görülmekte olup [88], tüm bu mutasyonların en az bir tanesi meme kanseri vakalarında %70 olasılıkla görülmektedir [4].

Meme kanserinde, PI3K'nın katalitik altbirimi olan p110 α mutasyonları %20-25 oranında görülmektedir. PI3KCA geni tarafından kodlanan p110 α altbiriminde görülen en sık mutasyonlar E542K, E545K ve H1057R olmakla birlikte bu mutasyonlar sonucu katalitik aktivite güçlenmektedir (PI3K onkojenik potansiyel kazanmaktadır). Yapılan çalışmalar sonucu, PI3K'ın regülatör altbirimi olan p85 α defekti olan farelerin B hücre gelişiminde bozukluk ve serum immunoglobulinlerinde azalma görülmüştür [68, 90-92].

Ayrıca, PI3K'in katalitik altbirimi olan p110'da oluşan D910A mutasyonu B ve T hücrelerinde antijen reseptör sinyali düzensizliği ve zayıflamış immün cevaba yol açtığı gösterilmiştir [93, 94]. Meme kanserinde PIK3CA mutasyonu östrojen ve progesteron reseptör (ER/PR) ekspresyonu, lenf nodu metastazı ve ErbB2 aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir [95] (Şekil 2.7).

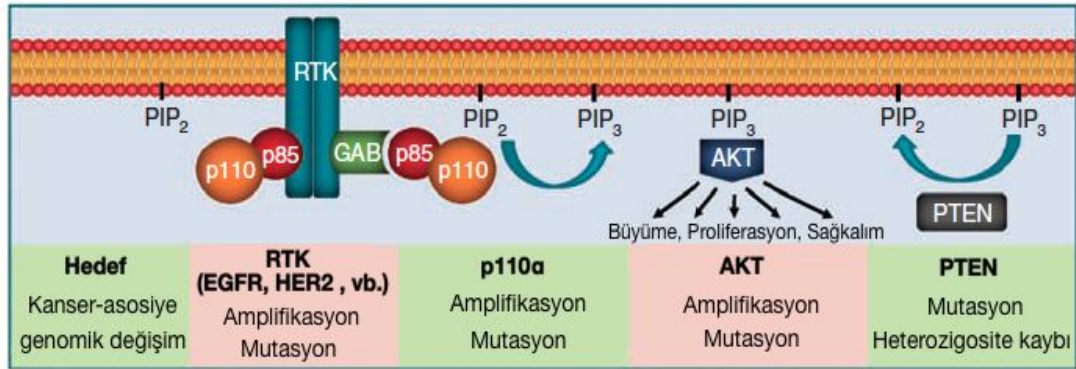


Şekil 2.7. PI3K'da gerçekleşen mutasyonlar

(Chalhoub N., Vaker S.J., 2009'dan (Ref. 89) uyarlanmıştır.)

Meme kanserinde, Akt'nin somatik aktivasyon mutasyonları %3-5 oranında görülmektedir. Akt'de görülen en sık mutasyon ise E17K'dır. Akt'nin tam aktivasyonu için C-terminal hidrofobik motifi S473'ün fosforilasyonu gereklidir. T308 motifinin PDK2 kinaz tarafından fosforilasyonu ile Akt'nin aktivasyonu sağlanmaktadır [17]. Ancak yapılan çalışmalar mTORC2 kompleksindeki RICTOR'un küçük interferans RNA (siRNA) ile selektif bozulması sonucu ser-473 fosforilasyonunun baskılandığını göstermektedir [78, 96].

Ayrıca bazı meme kanseri vakalarında düşük düzeyde PTEN aktivasyonu görülmektedir. Bu sayede PI3K yolağı aktivasyonu ve hücre proliferasyonu sürekli olarak devam etmektedir. PTEN *knock-out* fare embriyolarında letal etki görülmekte ve PTEN heterozigot farelerin bazı organlarında tümör oluşumu görülmektedir [91, 92] (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Meme kanserinde görülen genetik değişiklikler

(Yuan T.L., Cantley L.C., 2008'den uyarlanmıştır.)

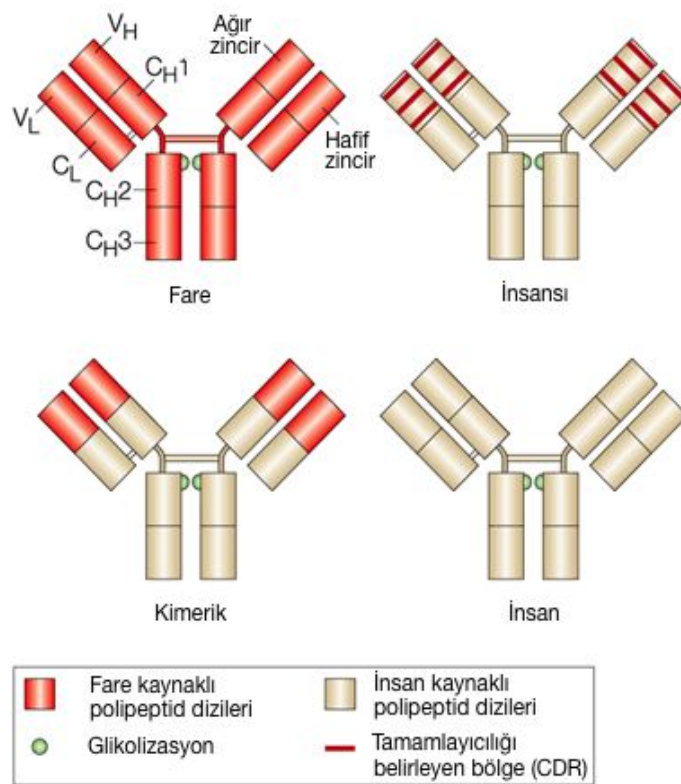
HER2⁺ meme kanserinde reseptörün aşırı ekspresyonundan dolayı PI3K'in sürekli aktivasyonu diğer meme kanseri tiplerine oranla daha kötü prognoz göstermektedir [54, 97]. Yapılan çalışmalar HER2 dimerizasyonunun hücre büyümesi, anti-apoptosis ve invazyon yollarının potansiyel aktivatörü olduğunu göstermektedir. Özellikle HER2'nin aşırı ekspresyonu ile birlikte HER3 ile yaptığı heterodimer formunun, HER3'ün sahip olduğu ve PI3K'ın p85 regülatör altbiriminin SH domainine bağlanabilen 6 adet fosforilasyon rezidüsünden dolayı, PI3K-Akt yolağı aktivasyonunun tümörlü hücrelerde daha fazla olduğu görülmektedir [71, 98, 99]. Kanser hücreleri, 'onkojen bağımlılığı' sebebiyle PI3K sinyal yolağı farklı RTK'lar tarafından kompanse edilebilmektedir [100].

2.6 Hedefe Yönelik Tedavinin Biyolojisi

Güncel olarak kullanılan sitotoksik kemoterapi temel olarak, hücre bölünmesinin inhibisyonuna dayanmaktadır. Hızlı bir şekilde bölünen kanser hücrelerinin yanında saç hücreleri, gastrointestinal epitelyum ve kemik iliği hücreleri gibi hızlı bölünen sağlıklı hücrelerde kemoterapötik ilaçlardan etkilenmektedirler. Buna karşın hedefe yönelik terapide hedef, kanser hücrelerin gelişiminde ve büyümesinde rol oynayan moleküllerdir. Bu sayede kanser hücrelerinin proliferasyonu bloke edilmiş olur. Bu moleküller sağlıklı dokuda da mevcut olabilir ancak kanserli dokuda bu moleküller genellikle aşırı ifade edilmekte ve/veya mutant formda bulunmaktadır. Örnek olarak meme, akciğer ve kolorektal kanser vakaları gibi solid tümörlerde genel olarak EGFR, VEGF ve HER2/neu hedeflenmektedir. Bu hedefler, reseptöre bağlanacak ligandı nötralize ederek, reseptörde ligand bağlanacak bölgeye bağlanarak ve bu sayede ligand bağlanmasını bloke ederek, reseptör sinyalini bloke ederek veya yolak içerisinde bulunan hücre içi molekülleri inhibe ederek hedeflenebilmektedir.

Monoklonal antikolar genellikle suda çözünen, büyük (yaklaşık 150.000 Da), ligandı veya reseptör üzerinde ligandın bağlanacağı hücre dışı bölgeyi hedefleyen moleküllerdir. Buna karşın, küçük inhibitör molekülleri ortalama 500 Da olan, hücre içerisine girebilen reseptör sinyalini bloke edebilen veya hücre içi spesifik yolak proteinlerini inhibe edebilen moleküllerdir. İlk monoklonal antikor 1986 yılında FDA (*Food and Drug Administration*) tarafından onaylanmıştır. Muromonab-CD3 adlı antikor, organ transplantasyonlarında T-hücre fonksiyonlarını bloke ederek akut organ reddini önlemektedir. Biyoteknolojik çalışmaların gelişmesiyle birlikte son 20 yıllık süreçte monoklonal antikor dizaynında birçok değişimler yaşandı. Önceleri hedef antijenler ile fareler immünize edilmekteydi. Üretilen monoklonal antikolar tamamiyle fare proteinlerinden oluştuğundan ve bu sebepten yüksek oranda insana antijenik olduğundan dolayı kişiye infüzyonu ile hipersensitivite reaksiyonu geliştirme riski mevcuttu. Bu riski sınırlayabilmek için yeni dizayn edilen antikolarda insan komponentleri daha

fazla içermektedir. Kimerik antikorlarda %65 oranında, insansı antikorlarda %95 oranında ve insan antikorlarda %100 oranında insan komponenti bulunmaktadır (Şekil 2.9). Antikorların tipleri son eklerinden anlaşılabilir: -momab ile biten antikorlar (örnek ^{131}I -Tositumomab) fare kaynaklı, -ximab ile biten antikorlar (örnek Cetuximab) kimerik kaynaklı, -zumab ile biten antikorlar (örnek Trastuzumab) insansı kaynaklı ve -mumab ile biten antikorlar (örnek Panitumumab) insan kaynaklı olmaktadır [101, 102].

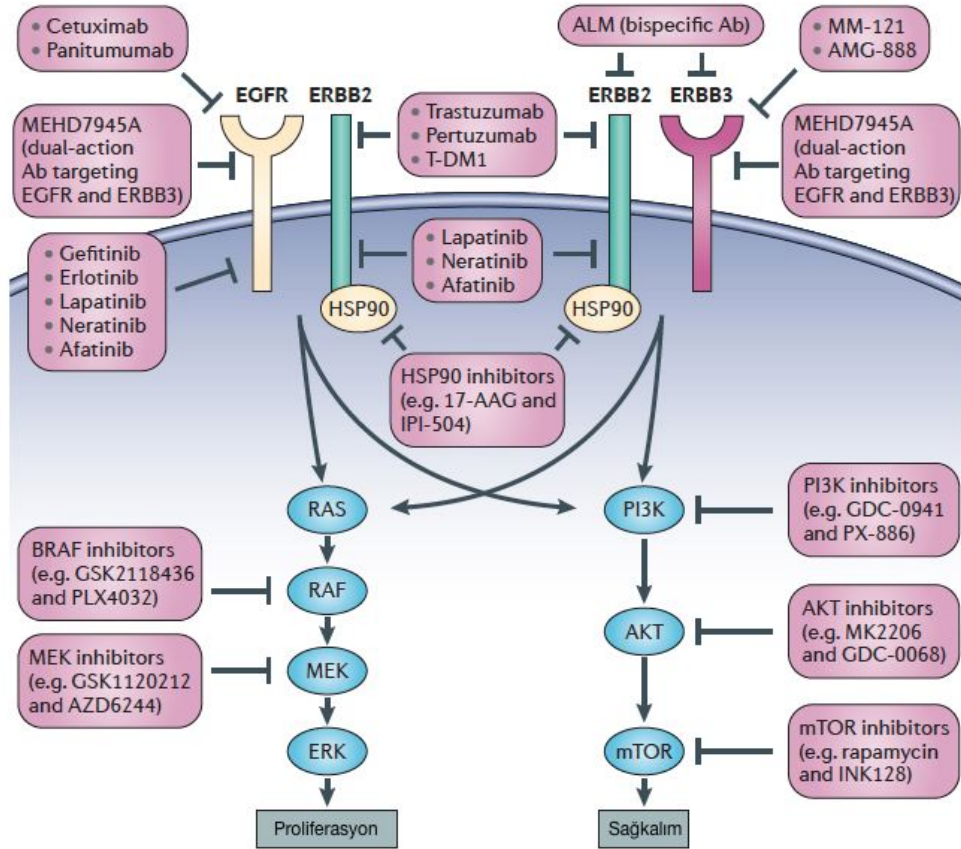


Şekil 2.9. Monoklonal antikor tipleri

(Carter P., 2001'den (Ref. 102) uyarlanmıştır.)

Küçük moleküllü inhibitörler, hücre içi tirozin kinaz sinyalini bloke ederek hücresel süreci inhibe eder. Tirozin kinaz sinyali hem normal dokuda hem de malign dokuda moleküler kaskadı başlatarak, hücrenin büyümesini, proliferasyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenezi sağlamaktadır. Bazı küçük moleküllü inhibitörlerin birden fazla hedef bölgesi olduğu için monoklonal

antikorlara göre daha az spesifite göstermektedir. Birçok küçük molekülü inhibitör, sitokrom P450 enzimi ile metabolize olduğu için bazı antibiyotik veya proteaz inhibitörleri gibi ilaçlarla etkileşime girebilmektedirler. Monoklonal antikorların yarı ömürleri günler veya haftalarca sürerken, küçük molekülü inhibitörlerin yarı ömürleri saatlerle sınırlıdır [101, 103].



Şekil 2.10. Meme kanserinde kullanılan inhibitörler

(Yarden Y., Pines G., 2012'den (Ref. 46) alınmıştır.)

2.7 İnhibitörler

Birçok onkogen ve tümör supresör gen, hücrel regülasyonu sağlayan protein kinazları veya proteinleri kodlamaktadır. Bu sebepten kanser gelişiminde rol oynayan ve deregüle olmuş protein kinazlara spesifik inhibitörlerin geliştirilmesi etkin bir tedavi yöntemi olarak kullanılabilirliği fikrini meydana getirmiştir. Örnek olarak, EGF reseptörünün mutant formu

kanserli hücrelerde ligand bağımlı veya bağımsız olarak sürekli aktifliğini korumakta ve hücrenin bölünmesini sağlamaktadır. İnvazif meme kanseri vakalarının yaklaşık %30'unda HER2/neu'nun mutant formu mevcut olmakla birlikte RTK aktivitesi normal hücreye oranla 100 kat artmaktadır. Protein kinazların ATP ile yarışmalı modelde ATP bağlanma bölgelerini işgal ederek, aktif formlara dönüşmelerini engelleyecek şekilde protein kinazlara spesifik ilaç dizaynları üretilmektedir [104].

Enzim inhibitörleri, enzimatik reaksiyonları yavaşlatan veya durduran moleküllerdir. İki farklı enzim inhibitörü mevcuttur: Tersinir inhibitör ve tersinir olmayan inhibitör. Tersinir inhibitörler, iyonik bağlar, hidrojen bağlar gibi zayıf etkileşimlerle enzimlere bağlanırlar. Tersinir inhibitörler yarışmalı, yarışmasız ve karışık inhibitörler olmak üzere üç kategoriye ayrılmaktadır. Substrat ile inhibitör molekülünün, enzimin aktif bölgesine ayrı zamanlarda bağlanması durumu yarışmalı inhibisyona örnektir. Ayrıca, yarışmalı inhibitörler yapısal olarak substratlarla benzerlik göstermektedirler. Yarışmasız inhibitörler, enzim-substrat kompleksine ve enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanan inhibitörlerdir. Karışık inhibitörler ise, hem enzim-substrat kompleksinin aktif bölge harici farklı bir bölgesine bağlanabilmekte hem de substrat ile yarışarak enzimin aktif bölgesine bağlanabilmektedir. Tersinmez inhibitörler, enzime kovalent bağ ile bağlanan veya enzimatik aktivasyonda önemli rol oynayan fonksiyonel grupların yıkımını sağlayan inhibitörlerdir. Bazı özel durumlarda tersinmez inhibitörlerin kovalent bağlanmasına ihtiyaç duyulmaz. Bu tip kovalent olmayan fakat sıkı bağlanan inhibitörlere geçiş bölgesi analogları (*transition-state analogs*) denilmektedir. Spesifik enzimin aktif bölgesine kovalent olarak bağlanarak ve enzimin normal yapısını değişime uğratarak enzimatik reaksiyonu inaktive eden inhibitörlere intihar inaktivatörleri veya mekanistik tabanlı inaktivatörler (*suicide inactivators = mechanism-based inactivators*) denilmektedir [104].

2.7.1 EGFR İnhibitörleri

EGFR, birçok tümör tipinde, kanser hücresinin proliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu sağlamaktadır. EGFR normal epitelde de bulunmasından dolayı inhibisyonu ciddi dermatolojik ve gastrointestinal toksisiteye sebebiyet verebilir [101]. HER2/neu geni, meme kanseri vakalarında genellikle aşırı eksprese olan, PI3K/Akt/mTOR yolağı ile sinyal iletimini gerçekleştiren bir RTK'dır. Anti-HER2 antikoru olan trastuzumab ve dual HER2/EGFR tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib güncel olarak HER2⁺ meme kanseri tedavisinde kullanılan ve RTK aracılı sinyal yolağı aktivasyonunu inhibe eden ilaçlardır. Trastuzumab, insansı immünooglobulin G₁ (IgG₁) antikoru HER2 reseptörünün jukstramembran IV. bölgesindeki epitopa bağlanmaktadır. Trastuzumab, HER2 hücre içi domainini inhibe etmekte, ligand-bağımsız HER2 dimerlerini ayırarak yolağın sinyal iletimini parsiyal olarak inhibe etmekte ve antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksisiteyi tetiklemektedir. Hücre aracılı sitotoksisite artışı T hücre popülasyonunun toplanmasını sağlayarak bölgede adaptif immün yanıt oluşturmakta ve tümör yıkımını kuvvetlendirmektedir. Pertuzumab monoklonal antikoru, HER2'nin heterodimerizasyon domaini olan II. domaini epitopuna bağlanır. Bu sayede, ligand-aracılı HER2-HER3 dimerizasyonunu önler ve PI3K/Akt sinyalini parsiyal olarak inhibe eder. Lapatinib, EGFR ve HER2'nin ATP-yarışmalı ve tersinir küçük moleküllü inhibitördür. Lapatinib hızlı bir şekilde PI3K/Akt ve MAPK yolağı sinyal aktivasyonunu inhibe eder. Afatinib ve neratinib ise ATP yarışmalı ve tersinmez EGFR/HER2 küçük moleküllü inhibitörlerdir [49, 105, 106]. Ancak, yapılan çalışmalar klinik yararlarının ötesinde kazanılmış direnç mekanizmalarının geliştiğini göstermektedir. Erken evre meme kanseri vakalarında trastuzumab gibi HER2-hedefli terapilerde hastalar rekürens göstermektedirler. PI3K yolağı bu direnç mekanizmasının gelişmesinde önemli rol oynamaktadır [13, 107].

Kazanılmış direnç, çeşitli mekanizmalar ile hücre içi sinyal yolağının reaktivasyonunu gerçekleştirmektedir. HER2'nin blokasyonu HER3, EGFR ve IGF-1R (*insulin-like growth factor-1 receptor*) gibi RTK'ların upregülasyonunu

sağlamaktadır. Ayrıca, HER2 reseptörünün trunke (kesik) formu olan p95HER2 fragmenti ekspresyonu, ilaç dirençliliğine sebep olmakta ve PI3K/Akt/mTOR yolağı aktivasyonunu sürekli kılmaktadır [13, 108]. Trastuzumaba dirençli olan HER2⁺ meme kanseri vakalarında, tirozin kinaz ve enzim inhibitörleri ile kombine bir tedavi uygulanması, tekli monoklonal antikor tedavilerine oranla daha kuvvetli bir anti-tümöral etki göstermektedir [3, 13, 59, 109].

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) HER proteinlerinin katalitik aktivitelerini inhibe etmektedir. Ayrıca doza bağımlı yarışmalı enzim inhibitörleri olmalarından dolayı monoklonal antikorlarla karşılaştırıldığında daha kuvvetli ajanlardır. Spontan EGFR mutasyonlarının ve amplifikasyonlarının sıklıkla karşılaşıldığı glioblastoma vakalarında TKİ'lerin, kan-beyin bariyerini diğer ilaçlara oranla daha kolay geçebilmesi sebebiyle etkili ve umut vaadeden bir ilaç grubu olduğu söylenebilir [105]. HER3'ün tirozin kinaz aktivasyonu defekti olması sebebiyle tirozin kinaz inhibitörleri ile bu reseptör direkt olarak hedeflenememektedir [110]. Bu yüzden, HER3'e yönelik direkt terapiler monoklonal antikorlar ile sağlanabilmektedir. Faz çalışmaları devam eden MM-121 ve LJM716 monoklonal antikorları HER3'ün hücre dışı bölgede bulunan II. ve IV. domainlerine bağlanarak ligand bağımlı ve bağımsız aktivasyonunu bloke etmektedir [60].

Meme kanseri vakalarının %25'i HER2⁺ meme kanseri vakası olduğundan etki gösterebildiği hedef kitlesi sınırlıdır. %75 meme kanseri vakasında HER2/neu eksprese olmadığı için, HER2 hedefli antikorlar bu hastalarda etkili olamamaktadır [106]. Bu sebepten dolayı, RTK'ların aktivasyonları sonrası sinyal iletiminin sağlandığı yolak proteinlerinin hedeflenmesi, kanser hücrelerinin progresyonlarını engellemek adına rasyonel bir yaklaşım sunmaktadır.

2.8 PI3K/Akt/mTOR Yolağına Yönelik Terapötik Yaklaşım

PI3K yolağı kanser vakalarında, tümör supresör gen olan PTEN'in kaybı veya mutasyonu sonucu inaktivasyonu sebebiyle, PI3K'in katalitik altbirimi olan p110 α 'yı kodlayan PI3KCA geninin fonksiyon kazandırıcı mutasyonları (*gain-of-function mutations*) sebebiyle, RTK'ların veya Ras onkogeninin mutant formu sebebiyle sürekli aktif halde bulunmaktadır. Bu bağlamda, PI3K aktivasyonunun inhibisyonu anti-tümör stratejilerinde sıklıkla kullanılmakta olan bir hedeftir [111].

2.8.1 PI3K İnhibitörleri

p110 α 'yı kodlayan PIKCA3 geninde sıklıkla görülen mutasyonlar sebebiyle PI3K α tümörögenizde önemli rol oynamaktadır. PI3K β plateletleri aktive etmekte ve bu sebepten tromboz ile ilişkili hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. PI3K γ ve PI3K δ ise enflamasyon gelişiminde rol oynamaktadır. Bu nedenlerden ötürü, PI3K hem kanserde hem de diğer hastalıklarda potansiyel bir terapötik hedef olmaktadır [18].

1990'ların başında ilk olarak pan-PI3K (PI3K α , PI3K β , PI3K γ ve PI3K δ) inhibitörü olan LY-294002 üretildi. Devamında, yine izoform spesifik olmayan wortmannin inhibitörü üretildi. Her iki inhibitörde fungal metabolitlerdir. Wortmannin, PI3K'in fosfat bağlayan lizin rezidüsüne kovalent olarak bağlanan ve tersinmez inhibitördür. LY294002 ise ATP-yarışımli tersinir inhibitördür. İlerleyen senelerde yeni jenerasyon PI3K inhibitörleri, PI3K'in izoformlarına spesifik olarak üretilmeye başlandı. Faz çalışmaları devam eden birçok ilaç mevcut bulunmaktadır [4].

PI3K inhibitörleri pan-PI3K inhibitörleri, izoform-spesifik PI3K inhibitörleri ve dual PI3K/mTOR inhibitörleri olarak üç grup halinde kategorize edilebilir. İlk gruba dahil olan inhibitörlerin zayıf farmakokinetik özellikleri ve düşük selektiviteleri sebebiyle limitli bir terapötik potansiyeli bulunmaktadır. Bu sebeplerden ötürü, yeni nesil PI3K inhibitörlerinden olan p110 α izoform-spesifik inhibitörlerin kullanımı spesifiteyi arttırmakta ve toksisiteyi

azaltmaktadır. PI3K ve mTOR proteinlerinin benzer yapısal özelliklere sahip olmasından dolayı, üçüncü grup inhibitörleri dual PI3K/mTOR inhibitörleri oluşturmaktadır. Diğer inhibitörlere oranla p110 α izoform-spesifik inhibitörler PI3K yolağını daha etkili bir biçimde inhibe etmektedirler [112].

2.8.2 Akt İnhibitörleri

Akt veya diğer adıyla PKB (Protein Kinaz B) bir serin/treonin kinazdır. Akt1, Akt2 ve Akt3 olmak üzere üç izoformu mevcuttur. Üç izoformunda *N*-terminalde PH domaini, orta bölgede serin/treonin katalitik domaini ve *C*-terminalde regülatör (hidrofobik motif) domaini olmak üzere üç benzer izoformik organizasyonu bulunmaktadır. PI3K'in büyüme faktörü tarafından uyarımı sonrası, Akt hücre membranına toplanır ve Akt'de bulunan PH domaini PIP₃ ile etkileşir. PDK1'in hücre membranına kolokalizasyonu ile birlikte PDK1, Akt'yi Thr308 rezidüsünden fosforilleyerek aktivasyonunu sağlamaktadır. Maksimum enzimatik reaksiyon için Akt'nin *C*-terminal bölgesinin Ser473 rezidüsünden mTORC2 tarafından fosforilasyonu gerekmektedir [113].

Akt izoformları birçok insan tümörlerinde aşırı eksprese olmaktadır. Örnek olarak Akt1 mide adenokarsinomlarında, Akt2 over, pankreas ve meme kanserleri vakalarında aşırı eksprese olmaktadır. Kontrolsüz Akt aktivasyonu hücre döngüsü inhibitörlerini inaktive etmekte ve hücre döngüsü proteinlerinin ifadesini arttırmaktadır. Hücresel proliferasyonun kontrolsüz olarak arttırması ile hücrenin apoptotik yoldan kaçışı sağlanmaktadır [113, 114].

Akt ailesi inhibitörleri genellikle ATP yarışmalı, PIP₃ analogları, allosterik inhibitörler, psödo-substrat peptidleri olarak kategorileştirilebilmektedir. Preklinik çalışmalar izoform spesifik Akt inhibitörlerin pan-Akt inhibitörlerine oranla toksisitesinin daha az olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalar Akt1/2 izoform selektif dual inhibitörlerin Akt1 veya Akt2 izoform selektif inhibitörlere oranla daha etkili bir inhibisyon sağladığını göstermektedir. Allosterik Akt inhibitörleri PDK1-

bağımlı Akt fosforilasyon bölgesini inhibe etmektedir. Buna karşın ATP-yarışmalı inhibitörler daha spesifik ve izoform selektivitesi açısından allosterik inhibitörlere oranla daha etkilidirler [4, 115].

2.8.3 mTOR İnhibitörleri

mTOR, hücre büyümesinde ve hücre döngüsünde önemli rol oynayan proteinlerin mRNA translasyonlarını arttırmaktadır. mTOR'in iki tane multi-protein kompleksi bulunmaktadır. mTORC1 protein sentezi regülasyonunda ve hücre büyümesinde rol oynamaktadır. mTORC2, Akt'yi fosforilleyerek aktive etmekte ve bu sayede hücre büyümesinde ve hücrenin sağkalımında anahtar regülatör protein görevi görmektedir. Kansere vakalarında, PI3K/Akt sinyal yolağında yaygın olarak gelişen regülasyon bozukluğu mTOR'i kuvvetli rasyonel bir hedef molekül haline getirmektedir [114].

1975 yılında keşfedilen ilk mTOR inhibitörü olan rapamisin, kansere karşı kullanılan potansiyel bir ajan olmaktadır. Rapamisin, mTOR proteinini inhibe ederek protein sentezinde rol oynayan S6K ve 4EBP1/EBP2 proteinlerinin fosforilasyonunu regüle etmektedir. Preklinik çalışmalar, meme kanseri vakalarında kemoterapi ile birlikte kullanılan rapamisinin göstermiş olduğu sinerjik etkiden dolayı kanserli hücre apoptozunu kuvvetlendirdiğini göstermektedir [4].

Rapamisin ve analogları (rapaloglar) FKBP12 (FK-506 bağlayıcı protein-12) proteinine bağlanarak mTORC1 kompleksini inhibe etmektedir. Temsirolimus, everolimus ve ridaforolimus gibi rapaloglar güncel olarak kullanılan terapötiklerdir. Ayrıca, curcumin ve resveratol içeren doğal maddeler de mTOR inhibitörü olarak kullanılabilir [114].

2.8.4 Dual PI3K-mTOR İnhibitörleri

Dual PI3K/mTOR inhibitör molekülleri, mTOR'in ATP bağlanan bölgelerini ve PI3K'ı aynı kuvvetle hedefleyen inhibitörlerdir. Tek hedefli inhibitörlerin aksine en az üç protein (PI3K, Akt ve mTOR) inhibisyonu bu

grup inhibitörlerin avantajlarından biridir. Rapaloglar tarafından tek başına inhibe edilen mTORC1 proteini sebebiyle, mTOR-S6K-IRS1 negatif geribildirim döngüsü inaktive olmakta ve bu sebepten ötürü PI3K aktivasyonu artmaktadır. Bu bağlamda, PI3K/mTOR hedefine yönelik dual inhibitör kullanımı PI3K yolağı reaktivasyonunu etkili bir şekilde engelleyebilmektedir. Preklinik çalışmalar dual PI3K/mTOR inhibitörü olan NVP-BEZ235'in, PI3KCA mutasyonundan dolayı lapatinib ve trastuzumaba dirençli olan HER2⁺ meme kanseri hücrelerine karşı anti-proliferatif etki gösterdiği ve insan kanseri modellemeleri yapılan ksenogreftlerde tümör büyümesi üzerinde supresif etki yaptığı gösterilmektedir [114, 116, 117].

PI-103 (*pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pyrimidine*), etkili olarak ve ciddi bir yan etki göstermeksizin PI3K-mTOR inhibisyonunu sağlayan dual PI3K/mTOR inhibitörlerinden bir diğeridir. Yapılan çalışmalar düşük konsantrasyonlarda kullanılan PI-103'ün glioma hücrelerinin hücre döngüsünde G₁ fazında yakalayıp büyümelerini inhibe ettiğini göstermektedir. Devam eden faz çalışmaları PI-103'ün invazyon, anjiyogenez, metastaz üzerine etkileri, p27 artışını sağlaması ve siklin D1 ekspresyonunu azaltması ile direkt olarak anti-proliferatif aktivitesini göstermektedir [118]. Farmakokinetik çalışmalar, PI-103'ün metabolize formu olan glukuronitin plazma tarafından hızlıca temizlendiğini göstermektedir [18].

Hayakawa ve arkadaşlarının 2006-2007 yılları arasında PI-103 ile serviks, akciğer, meme kanseri ve melanoma olmak üzere 4 farklı hücre hattında yaptıkları ilk çalışmalar, PI-103'ün farklı kanser tiplerinde anti-tümöral etkisini göstermektedir [119]. İnsan lösemi hücre hatlarında yapılan çalışmalarda PI-103'ün, hücreyi G₁ fazında yakalayıp hücrenin büyümesini ve çoğalmasını baskıladığı gösterilmektedir. AML (Akut Miyeloid Lösemi) hastalarından izole edilen blast hücrelerinde ise, apoptozu tetikleyerek AML progenitör klonojenitesini inhibe ettiği gösterilmektedir. Ayrıca, PI-103'ün radyoterapi ve kemoterapi aracılı apoptoz etkinliğini arttırdığı (kuvvetlendirdiği) bilinmektedir [120, 121].

2.9 Amaç

Bu tez çalışmasında, PTEN tümör baskılayıcı geni mutasyona uğramamış olan ve HER2 amplifikasyonu olan SKBR-3 hücrelerinde, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı inhibitörleri olan PI-103, AKTi ve Rapamisin ajanlarının HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi ve PI-103 dual inhibitörünün aktive reseptör tirozin kinaz (p-HER2 ve p-HER3) ekspresyonuna etkisinin zamana bağılı olarak incelenmesi amaçlanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

3.1 Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerin, kitlerin ve tamponların adları ve üretildikleri firmaların adları aşağıda sıralanmıştır.

ÜRÜN ADI	ÜRETİCİ ADI ve ÜRETİLDİĞİ ÜLKE
p-Her3/ErbB3 Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
p-Her2/ErbB2 Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
β -actin Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology- ABD
Polyclonal Goat Anti-rabbit immunoglobulins/HRP	Biologend- ABD
PI-103 (pidofuroprimidin)	Cayman Chemical - ABD
AKT-i	Calbiochem- Almanya
Rapamisin	Calbiochem- Almanya
Akrilamid (1.29 akrilamid-bisakrilamid)	Applichem-Almanya
Tris	Applichem-Almanya

Amonyum persülfat (APS)	Riedel-de Haen-Almanya
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Amresco-ABD
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco-ABD
FBS (Fötal Dana Serumu)	Lonza-İsviçre
L-glutamin	Biochrom-Almanya
Penisilin/Streptomisin	Biochrom-Almanya
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich-Almanya
Tween 20	Applichem-Almanya
<i>Super Signal West-femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Thermo Scientific-ABD
Bromfenol mavisi	Sigma-ABD
β -merkaptoetanol	Sigma-ABD
Gliserol	Gerbu-Almanya
NP-40	Sigma-ABD
Tris-HCl	İnvitrogen-ABD
Sodyum Klorür	Carlo Erba-İtalya
Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	Sigma-ABD
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma Aldrich-Almanya

Bütil alkol (Bütanol)	Sigma Aldrich-Almanya
Glisin	Sigma-ABD
Sodyum Florür	Merck-Almanya
Proteaz İnhibitör Kokteyli (PIC)	Roche Diagnostic-Almanya
Yağsız Süt Tozu	Pınar-Türkiye
Dimetil sülfoksit (DMSO)	WAK-Chemie Medical-Almanya
Tripan Mavisi	Sigma-ABD
<i>Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit</i>	Thermo Scientific-ABD
Bovine Serum Albumin Standart Seti	Thermo Scientific-ABD
Metanol	Merck-Almanya
Protein Transfer Cihazı (i-BLOT)	Life Technologies- ABD
<i>Full Range Rainbow Molecular Weight Marker</i>	GE Healthcare-ABD
Sodyum pirofosfat	Sigma-ABD
<i>Calyculin</i>	Cell Signaling Technology-ABD
Tripsin %0.05 (1X)	Lonza-İsviçre
Etilen glikol tetra asetik asit (EGTA)	Ambresco-ABD
İzopropanol	Sigma-ABD
Etidyum Bromür	Sigma-ABD

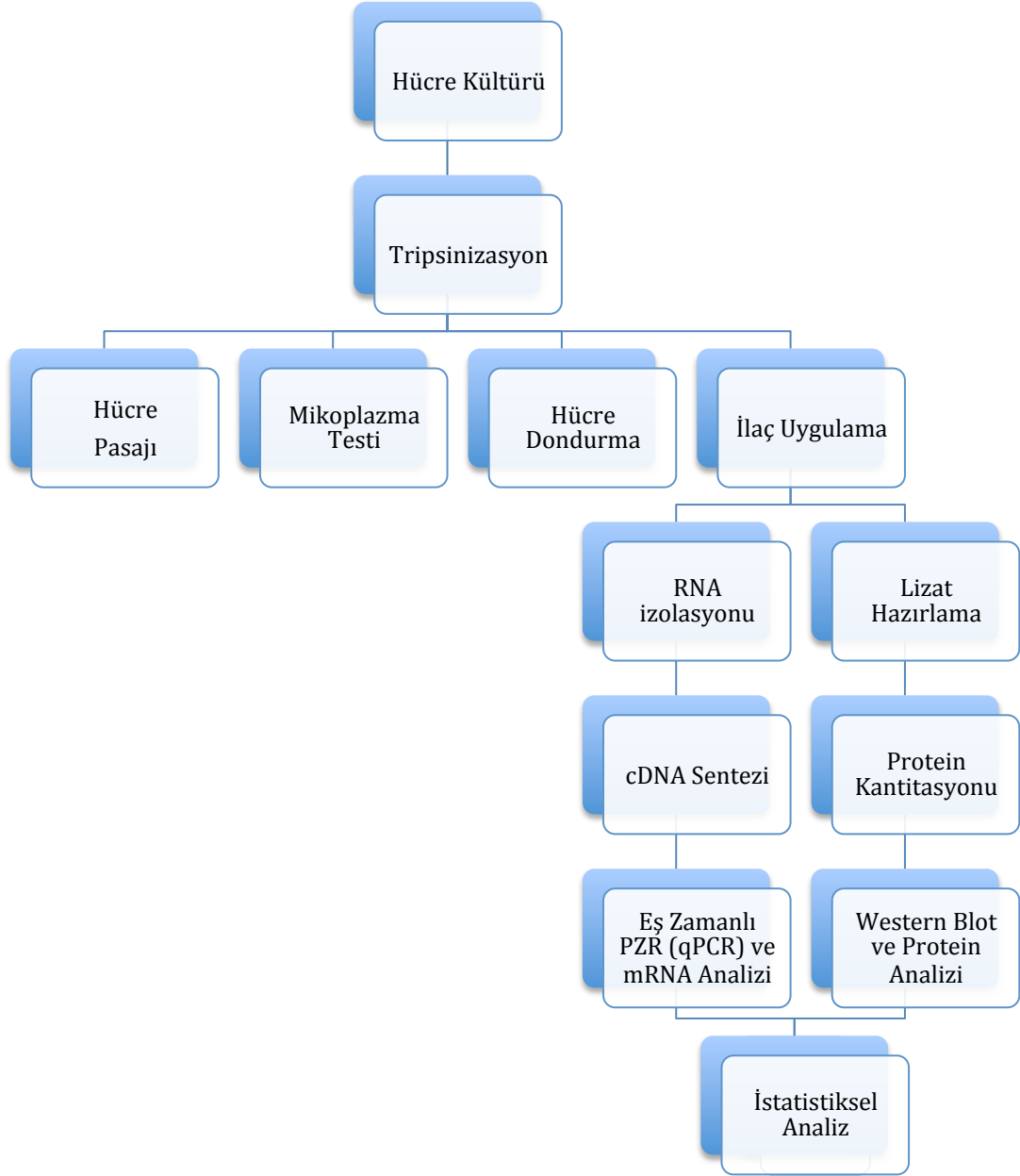
RNA izolasyon Kiti	Qiagen- Almanya
Konvansiyonel PZR kiti	Fermentas- Litvanya
RNA konsantrasyon kiti	Zymo Research- ABD
PZR Primer (HER-2)	İontek- Türkiye
PZR Primer (HER-3)	İontek- Türkiye
PZR Primer (β -actin)	İontek- Türkiye
Agaroz	Amresco- ABD
Eş Zamanlı PZR kiti (SYBR Green)	Qiagen- Almanya
cDNA Sentez kiti	Fermentas- Litvanya
TBE (Tris- Borik asit- EDTA)	Dr. Zeydanlı- Türkiye
EZ-PCR Mikoplazma Kiti	Biological Industries- İsrail
<i>DNA-Free RNA Kit</i>	Zymo Research- ABD

3.2 Aletler ve Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan aletlerin ve cihazların adları ve üretildikleri firmaların adları aşağıda sıralanmıştır.

ÜRÜN ADI	ÜRETİCİ ADI ve ÜRETİLDİĞİ ÜLKE
Kodak Gel Logic 1500 Görüntüleme Sistemi	Carestream Healty Inc.-ABD
Faz/Kontrast Mikroskop	Olympus-İngiltere
Etüv	Heraeus-Almanya
Otomatik Çalkalayıcı	Heidolph-Almanya
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Eppendorf-Almanya
<i>iBlot™ Dry Blotting</i>	Invitrogen- ABD
Spektrofotometre	Spectramax-ABD
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo Electron-ABD
Santrifüj	Heraeus-Almanya
-196 Sıvı Azot Tankı	Taylor Wharton- ABD
Buz makinası	Scotsman AF200-İngiltere
Elektroforez Güç Kaynağı	Thermo Scientific
Elektroforez Güç Kaynağı	Amersham
Jel Yürütme Tankı	Thermo Scientific
Jel Yürütme Tankı	Amersham

Hassas Terazı	Denver Instrument-ABD
Vorteks	Clofton Cyclıne-İngiltere
Distile Su Cihazı	GFL-Almanya
Çalkalayıcı	GFL-Almanya
Isıtma Bloğu	Techne Dri Bloc-İngiltere
Manyetik Karıştırıcı	Ika RH Basic-Almanya
Çeker Ocak	Ünitest-Türkiye
Dikey Akımlı Hava Kabini	Thermo-Electron-ABD
Su Banyosu	GFL-Almanya
+4 °C Soğuk Oda	Alarko Carrier-Türkiye
+4 °C Buzdolabı	Bosch-Almanya
-20 °C Derin Dondurucu	Bosch-Almanya
Thoma Lamı	Fuchs Roshenthal-ABD
Thoma Lamı	Neubauer-ABD



Şekil 3.1. Deney planı

3.3 Hücre Kültürü

İnsan meme kanseri hücre dizisi olan SKBR-3, ATCC (*American Type Culture Collection*) tarafından temin edildi. Hücreler ATCC tarafından belirtilen kültür şartları ve metoduna uygun olarak çoğaltıldı. SKBR-3 hücre dizileri, 25 ve 75 cm² flasklar içinde, %10 FBS (*Fetal Bovine Serum*), 2 mmol/L L-glutamin, 100 IU penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) tam besiyeri ortamında 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde çoğaltıldı. Flask içerisinde çoğalan hücrelerin doluluk oranları %90 ile %100 arasına ulaştıklarında hücreler flasklardan kaldırıldı. Hücrelerin ilk pasajı aşamasında, krayovial tüp başına 1 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde konuldu ve daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere sıvı azot tankında muhafaza edildi. 3. ile 11. pasajlar arasındaki hücreler kullanılarak deneyler yürütüldü. Uygun pasaj sayısına ve deneylerde kullanılacak miktara ulaşan hücreler kaldırıldıktan sonra tripan mavisi ile boyandı ve Thoma Lamı kullanılarak sayıldı. Deneylerde hücrelerin ilaç ile inkübasyonları öncesinde %90'ın üzerinde canlılığın olmasına dikkat edildi.

3.4 Tripsinizasyon

Tripsinizasyon yöntemi ile aderan meme kanseri hücre hattı olan SKBR-3 hücrelerinin flasktan ayrılması sağlandı. Bu işlem için ilk olarak flasklarda bulunan besiyerleri hücrelere zarar verilmeden serolojik pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. T-25 cm² flask için 2 ml, T-75 cm² flask için 5 ml PBS (*Phosphate Buffered Saline*) eklendi. Flask PBS ile yıkandı ve daha sonra serolojik pipet ile çekilerek uzaklaştırıldı. Bu sayede aderan hücreler yıkanarak besiyeri artıkları ve tripsinin enzimatik reaksiyonunu indirgeyen FBS ortamdan uzaklaştırıldı. T-25 cm² flask için 500 µl tripsin/EDTA, T-75 cm² flask için 1,5 ml tripsin/EDTA flask içine koyuldu. Tripsin/EDTA'nın flask içerisindeki aderan hücrelerin hepsine homojen olarak yayılması için flask hafifçe çalkalandı. 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 3-5 dakika arasında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmadığı faz/kontrast (*inverted*) mikroskopta kontrol edildi. Flask

tabanından ayrılmayan hücrelerin yoğunluğuna göre etüv içerisinde birkaç dakika tekrardan inkübe edilerek veya flask hafifçe çalkalanarak hücrelerin flask tabanından ayrılmaları sağlandı. Tripsin/EDTA'nın etkinliğini durdurmak için 2-5 ml arasında tam besiyeri eklendi. Besiyerinin etkin bir şekilde tüm hücrelere ulaşabilmesi için serolojik pipet ile pipetaj yapıldı. Flask içerisinde süspansiyon halde bulunan hücreler 50 ml'lik falkon tüp içine alınıp +4 °C'de 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda hücre artıklarının bulunduğu süpernatant falkondan uzaklaştırıldı. Falkonun alt kısmında oluşan hücre pelleti üzerine 6-10 ml arasında tam besiyeri eklendi. Pipetaj işlemi yapılarak süspansiyon haline getirildi.

Pipetaj işlemi sayesinde hücrelerin sayım işlemi öncesi birbirlerinden ayrılması ve lam üzerine tek düşmeleri sağlandı. Süspansiyon içerisinde 10 µl alındı ve 10 µl tripan mavisi ile karıştırıldı. Süspansiyon içerisinde bulunan hücre miktarı 1:1 oranında seyreltilmiş oldu. Tripan mavisi ile karıştırılan süspansiyon Thoma lamının iki ucuna 10'ar µl yayıldı ve mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Thoma lamı üzerindeki her iki uç için ayrı 5 alan seçildi ve bu alanlarda sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması alındı. Ölü hücrelerin parçalanmaya başlayan hücre zarı içerisinde kolayca geçebilen tripan mavisi sayesinde mavi olarak görülen hücreler ekarte edildi. Kullanılan Thoma lamının ölçüleri 0.1 mm x 0.1 mm olup lam ile lamel arasındaki uzaklık 0.1 mm'dir. Bu nedenle hücrelerin sayıldığı her alan 0.001 mm³'e (0.0001 ml'ye) karşılık geldiğinden sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması 10.000 ile çarpıldı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi ile 1:1 oranında seyreltiği için elde edilen değer 2 ile çarpılarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı.

3.5 Hücre Pasajı

Hücre sayım işleminden sonra uygun pasaj sayısına ulaşmamış veya deney için ihtiyaç duyulan hücre miktarına ulaşamamış durumlarda, SKBR-3 hücre dizisi pasajlandı. Süspansiyon içerisinde bulunan hücre miktarı göz önünde bulundurularak T-25 cm² flasklar için yaklaşık 500.000 hücre T-75 cm² flasklar için 1-1,25 milyon hücre aktarılacak şekilde pasaj yapılacak flask sayısı belirlendi. Pasaj yapılacak flasklara eşit sayıda hücre süspansiyonları aktarıldı. T-25 cm² flasklar son hacmi 5 ml, T-75 cm² flasklar son hacmi 15 ml olacak şekilde tam besiyeri ile tamamlandı. Flasklar 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edildi. Flasklar günlük olarak mikroskop altında incelendi. pH'sı düşmüş ve rengi değişmiş olan, flask içerisinde ölü hücre miktarı artmış olan besiyerleri değiştirildi.

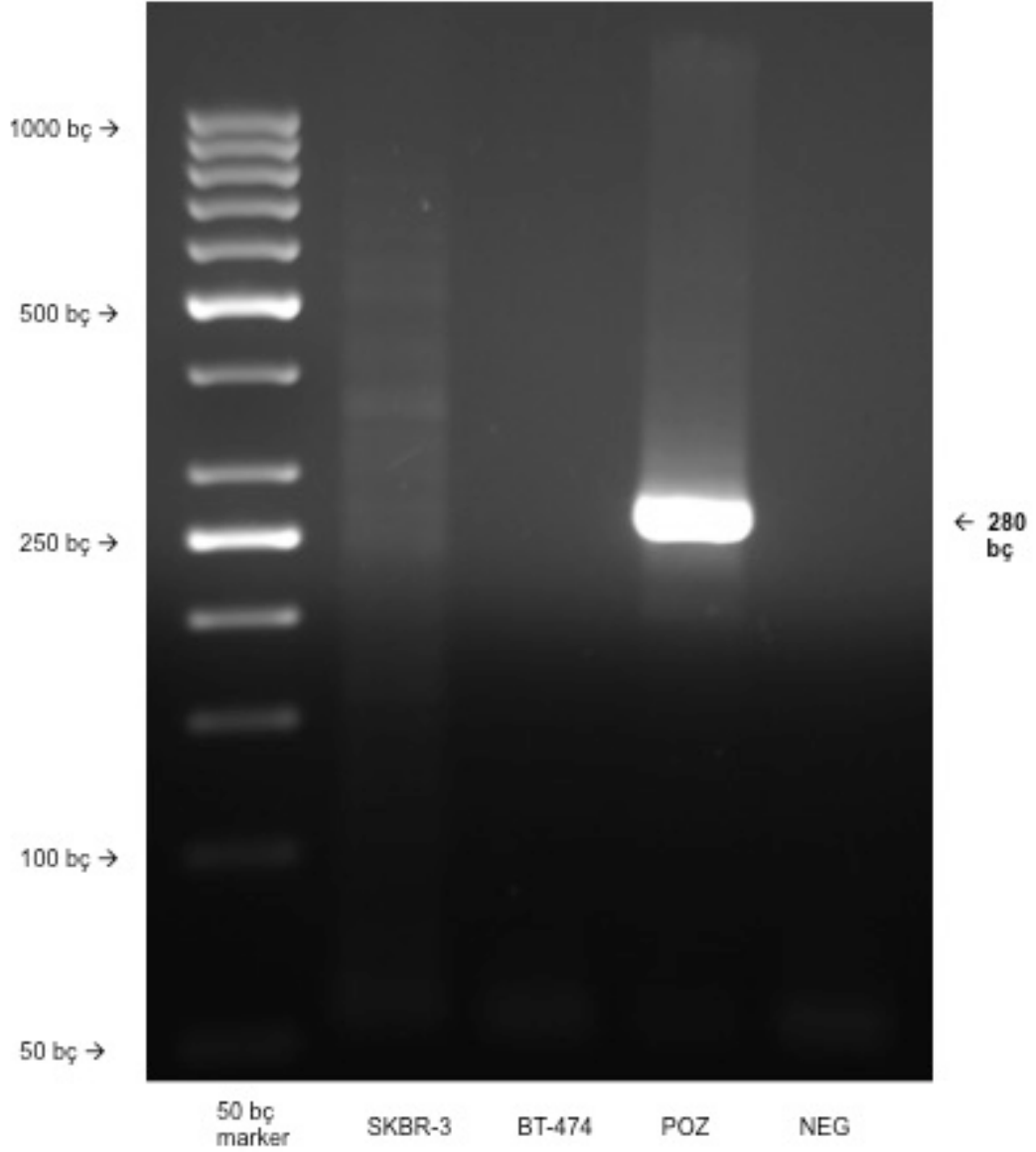
3.6 Hücre Dondurma

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

3.7 Mikoplazma Testi

Hücreler çoğaldıkça hücre içi bakterilerin (mikoplazma) kontaminasyonu söz konusu olabilmektedir. Hücrelerin kontamine olup olmadıklarını test etmek için, flask içerisindeki yoğunluğu %90-100 düzeylerine ulaşmış SKBR-3 hücre dizisi besiyerinden 1 ml örnek alınarak, 1,5 ml'lik deney tüpü içerisine konuldu. Aldığımız örnek +4 °C'de 2000 rpm'de 90 saniye santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası oluşan süpernatant ayrı bir tüpe alındı ve pellet atıldı. Alınan süpernatant 14000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Bu işlemden sonra süpernatant pipet ile çekilerek atıldı. Tüpün alt kısmında oluşan pelet 25 µl mikoplazma tampon solüsyonu içerisinde süspanse hale getirildi. Süspansiyon 95 °C'ye getirilmiş kuru blok üzerinde 3 dakika inkübe edildi. Bu aşamadan sonra Polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) geçildi. Polimeraz zincir reaksiyonu *EZ-PCR* Mikoplazma kitinde önerilen miktarlarda örnek tüp, pozitif kontrol tüpü ve negatif kontrol tüpü olarak hazırlandı. Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda tüplerin içerisindeki ürünler %2'lik agaroz jelle yüklendi. Yüklenen ürünler agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.2). Mikoplazma DNA fragmenti 280 bp'de bant vermektedir. Şekil 3.2'de görüldüğü üzere pozitif kontrol kolonunda bant vardır. Bu deneyimizin düzgün çalıştığını göstermektedir. Negatif kontrol kolonunda bant görülmemektedir. Bu durum kullandığımız PZR ajanlarının kontamine olmadığını göstermektedir. Örnek kolonunda bant görülmemesi ise SKBR-3 hücrelerinde herhangi bir mikoplazma kontaminasyonu olmadığını göstermektedir.



Şekil 3.2. Mikoplazma testi

3.8 İlaç Uygulama

Tripzinizasyon işleminden sonra mRNA analizi için 6 kuyulu plakların her bir kuyusuna 1×10^6 hücre eklenecek şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. 6 kuyulu plakların her birine 1×10^6 hücre eklendi. Hücrelerin kuyu zeminlerine yapışması için 37°C 'de %5 CO_2 'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Bu sayede hücreler kuyu zeminine yapıştı. Hücrelerle muamele edilecek PI3K ve mTOR dual inhibitörü olan PI-103, AKT inhibitörü olan AKTi ve mTOR inhibitörü olan Rapamisin, dikey havalandırılmalı kabin içerisinde steril

koşullar altında hazırlandı. Kristalize kuru toz halinde bulunan ajanlar, DMSO içerisinde vortekslenerek final konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde çözüldü. İlaç stoğu 500 µl hacimlerde bölünerek -20 °C'de saklandı. Kuyu içerisinde bulunan besiyerini çekmeden önce, 10 mM konsantrasyonda DMSO içerisinde çözülmüş halde bulunan ilaç alikotları seri dilüsyon ile seyreltildi. 24 saat sonra kuyu içerisinde bulunan tam besiyerleri çekildi. Kuyulara tam besiyeri ile birlikte farklı dozlarda ilaç eklendi. SKBR-3 hücreleri 1 µM AKT inhibitörü olan AKTi ile, 50 nM mTOR inhibitörü olan Rapamisin ile, 1 µM PI3K/mTOR dual inhibitörü olan PI-103 ile 8 ve 24 saatler arası inkübe edildi. İlaç eklenmemiş kuyular, kontrol kuyuları olarak kullanıldı.

Tripzinizasyon işleminden sonra protein analizi için kuyu başına 2×10^6 hücre eklenecek şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. 6 kuyulu plakların her birine 2×10^6 hücre eklendi. Hücrelerin kuyu zeminlerine yapışması için 37 °C'de %5 CO₂'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Bu sayede hücreler kuyu zeminine yapıştı. 24 saat sonra kuyu içerisinde bulunan tam besiyerleri çekildi ve serumsuz besiyeri eklendi. 37 °C'de %5 CO₂'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Bu sayede hücrelerin aynı fazda (G0 fazı) kalmaları sağlanmış oldu. Serum starvasyon işlemi sonrası serumsuz besiyeri kuyulardan uzaklaştırıldı. Her kuyuya 4 µM PI-103 içeren besiyerinden 500 ml eklendi ve üzerine 1,5 ml tam besiyeri eklendi. Bu sayede ilaç final konsantrasyonu 1 µM olması sağlandı. SKBR-3 hücreleri PI-103 ile 1-3-6-12-24 saat inkübe edildi. Kontrol kuyularına PI-103 yerine ilaçsız besiyerinden 2 ml eklendi ve 0 saat ilaç inkübasyonu olarak kabul edildi.

3.9 RNA İzolasyonu

6 Kuyulu plaklarda farklı PI3K yolağı inhibitörleri ile farklı zaman aralıklarında inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinin, *RNeasy Mini Kit 50* protokolüne uygun olarak RNA izolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların miktarları, 260/230 (inorganik kontaminant) ve 260/280 (organik solvent) değerleri Nano-drop cihazında 1,5 µl örnek kullanılarak ölçüldü. Elde edilen RNA'ların saf olup olmadıkları (DNA kontaminasyonu varlığı) β-aktin

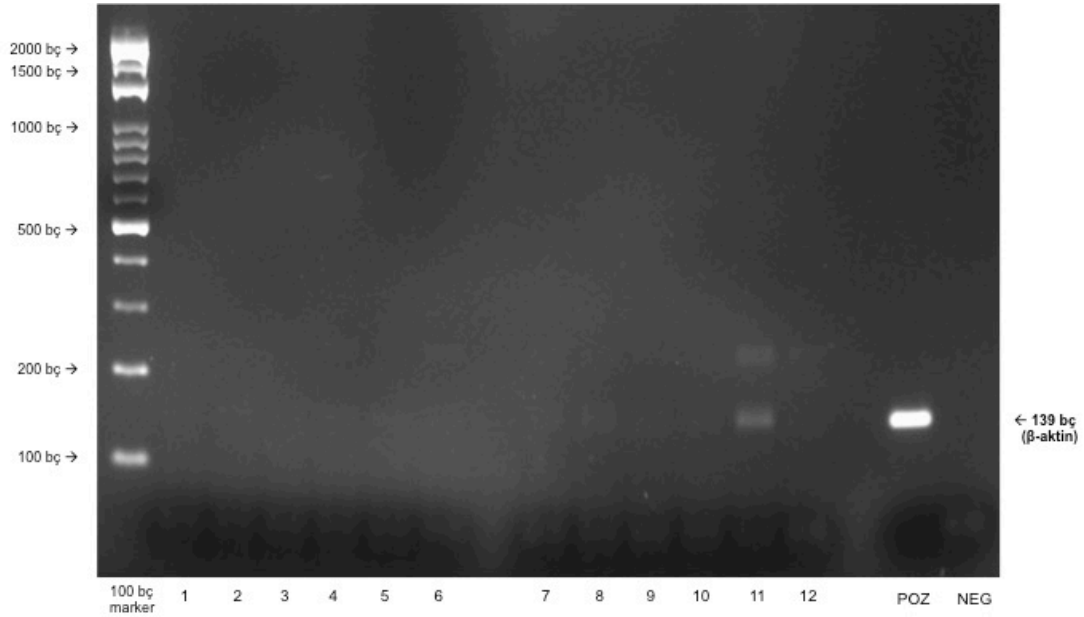
(139 bp) ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (*RT-PCR*) yöntemi ile kontrol edildi. PZR sonucu elde edilen örnekler agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. Saf olarak elde edilen RNA örneklerinin cDNA sentezi yapıldı. Şekil 3.3'teki jel görüntüsünde deneyin düzgün bir şekilde çalıştığı anlaşılan pozitif kontrol β -actin bandı görülmektedir. Negatif kontrol bandının ve örneklerin yüklendiği kuyularda bant görülmemesi örneklerde ve konvansiyonel PZR kiti solüsyonlarında herhangi bir kontaminasyon olmadığını göstermektedir.



Şekil 3.3. AKTi ile inkübe edilmiş örneklerin RNA eldesi (Saf RNA)
 (1-2: Kontrol örnekleri, 3-6: AKTi ile 8 saat inkübe edilmiş örnekler,
 7-8: Kontrol örnekleri, 9-12: AKTi ile 24 saat inkübe edilmiş örnekler,
 POZ: Pozitif kontrol, NEG: Negatif kontrol)

DNA kontaminasyonu olan, saf RNA elde edilemeyen örnekler (Şekil 3.4) *DNA-Free RNA Kit* RNA izolasyon kiti ile tekrardan izole edildi. Yapılan işlem sonucu Nano-drop ile RNA ölçümü yapıldı. Nano-drop ölçümü sonucu RNA miktarı 90 ng/ μ l altında olan örnekler cDNA (*complementer DNA*) sentezi yapılabilmesi için RNA konsantrasyon kiti ile daha konsantre hale getirildi. RNA izolasyonu tekrarlanan ve/veya RNA miktarı konsantre hale

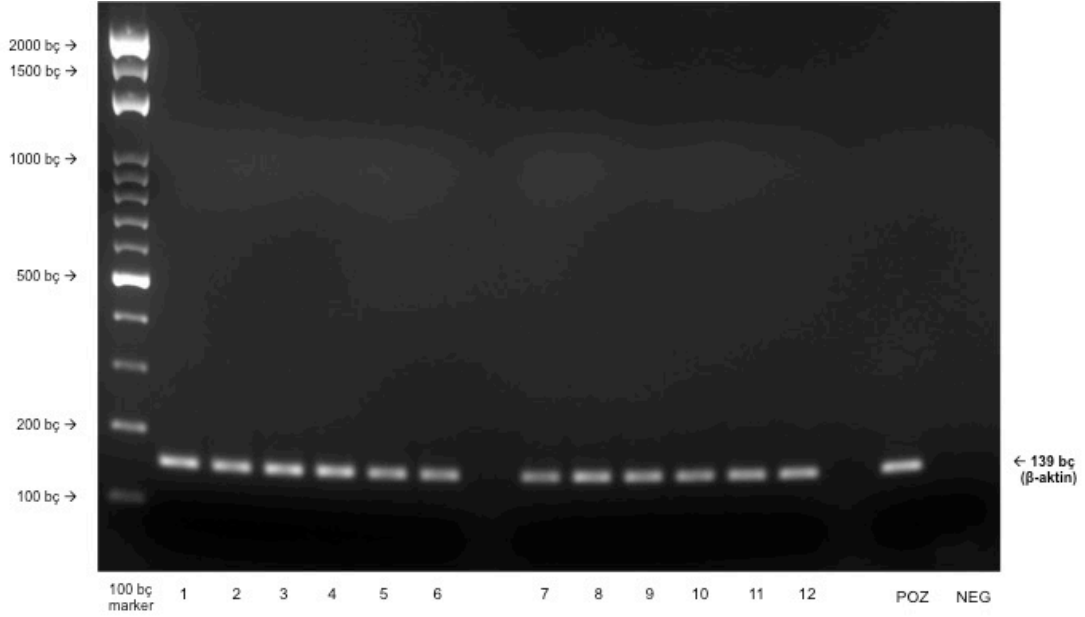
getirilen örnekler ile tekrardan β -aktin ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yapılarak olası kontaminasyon varlığı kontrolü yapıldı.



Şekil 3.4. AKTi ile inkübe edilmiş örneklerin RNA eldesi (Kontamine RNA) (1-2: Kontrol örnekleri, 3-6: AKTi ile 8 saat inkübe edilmiş örnekler, 7-8: Kontrol örnekleri, 9-12: AKTi ile 24 saat inkübe edilmiş örnekler, POZ: Pozitif kontrol, NEG: Negatif kontrol)

3.10 cDNA Sentezi

Eş zamanlı PZR (*qPCR*) öncesi elde etmiş olduğumuz saf RNA'lardan cDNA sentezlenmesi gerekmektedir. Eş zamanlı PZR öncesi cDNA örneklerinin 1000 ng/ μ l olması gerekmektedir. Bu sebepten, Nano-drop ile yapılan RNA miktarları 1000'e bölündü. Elde edilen değer ile cDNA sentezi için kullanılacak RNA (μ l) miktarını belirlenmiş oldu. cDNA sentez kiti protokülüne uygun olarak kullanılacak master mix hazırlandı (OligodT = 1 μ l, 5x Reaction Buffer = 4 μ l, Ribolock Inhibitor = 1 μ l, 10mM dNTP = 2 μ l, M-MuLV (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) = 1 μ l). Yapılan ters transkriptaz PZR sonucu 1000 ng/ μ l cDNA örnekleri elde edildi. Elde edilen cDNA örnekleri β -aktin (139 bp) ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile kontrol edildi. PZR sonucu elde edilen örnekler agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. AKT ile inkübe edilmiş örneklerin cDNA eldesi
 (1-2: Kontrol örnekleri, 3-6: AKTi ile 8 saat inkübe edilmiş örnekler,
 7-8: Kontrol örnekleri, 9-12: AKTi ile 24 saat inkübe edilmiş örnekler,
 POZ: Pozitif kontrol, NEG: Negatif kontrol)

3.11 Sybr Green ile Eş Zamanlı PZR (qPCR) ve Analizi

Elde edilen cDNA örnekleri ile *Sybr Green* protokolüne uygun olarak hazırlandı (dH₂O = 4 µl, Forward Primer (5 µM) = 2 µl, Reverse Primer (5 µM) = 2 µl, Sybr Green Mix = 10 µl, cDNA = 2 µl). Uygulanan her bir ilaç ve farklı zaman aralığı için 2 hedef gen primeri (HER2 ve HER3) ve 1 referans gen primeri (β-aktin) kullanıldı (Tablo 3.1). Eş zamanlı PZR için kullanılan bileşenler hazırlandıktan sonra reaksiyon önceden optimize edilen reaksiyon koşullarına göre ayarlandı (Tablo 3.2)

Tablo 3.1. Konvansiyonel PZR ve eş zamanlı PZR'lerde kullanılan primer dizileri listesi

	FORWARD (5'-3')	REVERSE (5'-3')
HER-2	5'-GACCTGGTGGATGCTGAGGA-3'	5'-TGGTAGATGAGCTGCGGTGC-3'
HER-3	5'-CCCTGCCATGAGAACTGCAC-3'	5'-TCACTGTCAAAGCCATTGTCAGAT-3'
β -actin	5'-GCACTCTTCCAGCCTTCCTT-3'	5'-AATGCCAGGGTACATGGTGG-3'

Tablo 3.2. Optimize eş zamanlı PZR koşulu

İlk Denatürasyon	95 °C	10 dakika	
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	} 45 döngü
Bağlanma	59 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	30 saniye	
Soğutma	72 °C	10 dakika	

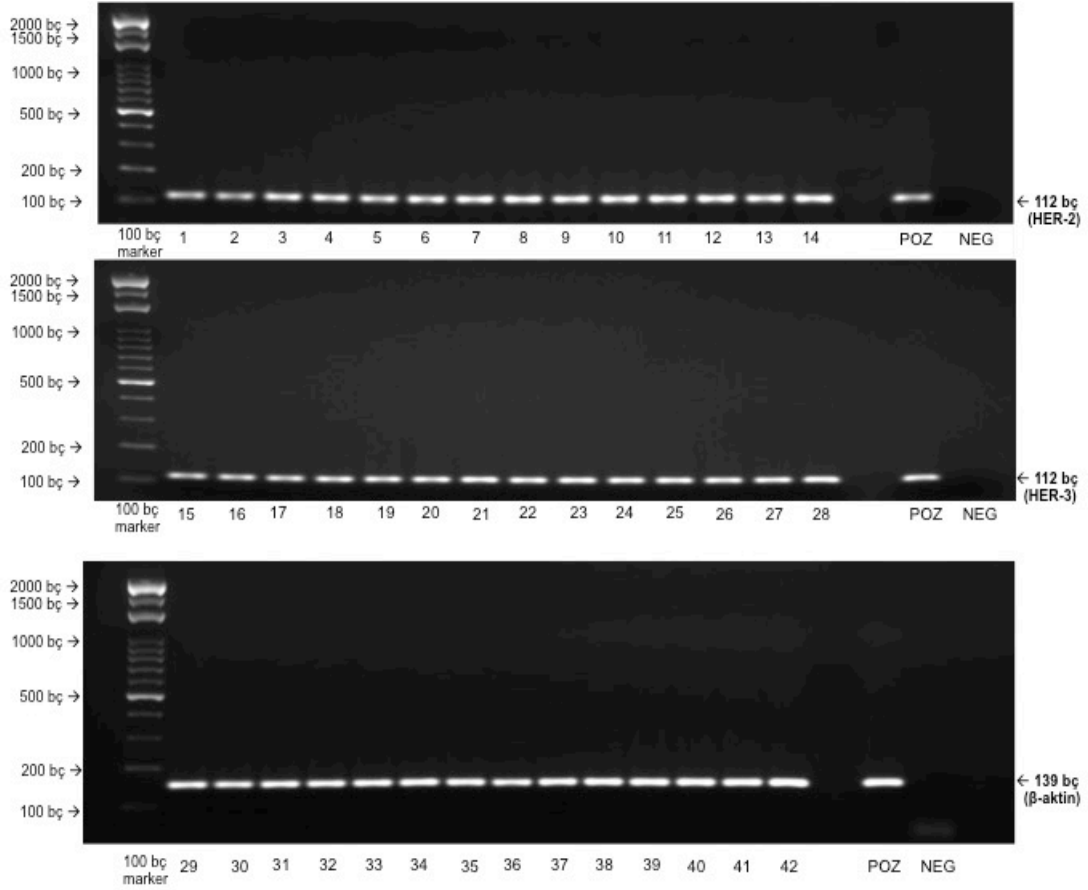
Sybr Green floresan maddesi, cDNA örneklerine interkale olarak ışımaya vermektedir. PZR'ın denatürasyon-bağlanma-uzama aşamalarıyla birlikte örnek DNA'lar amplifiye olmakta ve bu sayede örneklerin amplifikasyonları eş zamanlı olarak görülmektedir. Eş Zamanlı PZR sonucu *Rotor-Gene 1.7.94* programı ile veriler elde edildi. Tüm DNA örnekleri baz alınarak, eksponansiyal faza geçiş bölgeleri belirlendi ve threshold değeri 0,03 olarak alındı. Deney verimliliği %98-%100 olarak belirlendi. İlaç ile inkübe edilmemiş tüm kontrol örnekleri 3 duplike olarak ve ilaç ile inkübe edilmiş örnekler en az 3 duplike olarak, en fazla 4 duplike olarak çalışıldı. Referans gen olarak β -aktin kullanıldı. Tüm ilaç örneklerinde ve belirlenen saat aralıklarında hedef gen olarak belirlenen HER-2 ve HER-3 ifadeleri analiz edildi. Threshold değerine göre belirlenen Ct (*Cycle Threshold*) değerleri analiz edildi. Eş

Zamanlı PZR yöntemi ile elde edilen veriler doğrultusunda kullanılan PI-103, Rapamisin ve AKTi ajanları ile hedef genlerin mRNA ekspresyonlarına etkisi karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma referans genin (β -aktin) ekspresyonu ile hedef genlerin (HER-2 ve HER-3) normalize edilmesi ile belirlendi. Livak modeli ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) kullanılarak Eş Zamanlı PZR datası hesaplandı (Şekil 3.6) [122]. Verilerin değerlendirilmesi için istatistiksel analizi yapıldı. Eş Zamanlı PZR sonucu elde edilen örnekler agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü (Şekil 3.7).

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T,Target} - C_{,Actin})_{Time x} - (C_{T,Target} - C_{,Actin})_{Time 0}$$

Şekil 3.6. Livak modeline göre $\Delta\Delta C_t$ formülü

(Kenneth J. Livak, Thomas D. Schmittgen 2001 (Ref. 122)'den alınmıştır.)



Şekil 3.7. Eş zamanlı PZR sonucu mRNA eldesi

(1-6: Kontrol örnekleri, 7-14: AKTi ile 8 saat inkübe edilmiş örnekler (HER2), 15-20: Kontrol örnekleri, 21-28: AKTi ile 8 saat inkübe edilmiş örnekler (HER3), 29-34: Kontrol örnekleri, 35-42: AKTi ile 8 saat inkübe edilmiş örnekler (β -aktin), POZ: Pozitif kontrol, NEG: Negatif kontrol)

3.12 Lizat Hazırlama

Western blot deneyinde kullanılacak olan proteinlerin elde edilebilmesi için lizis tamponu ile hücrelerin lizis edilmesi ve lizat hazırlanması gerekmektedir. Bunun için öncelikli olarak EBC tamponu hazırlandı (Tablo 3.3). EBC tamponu +4 °C odada 12 aya kadar muhafaza edilebilmektedir. Hücrelerden lizat elde edileceği zaman EBC tamponu kullanılarak, hücrelerin lizis olmasını sağlayacak olan lizis tampon hazırlandı (Tablo 3.4).

Tablo 3.3. EBC tamponu bileşenlerinin konsantrasyonları ve kullanılan bileşenlerin hacimleri

Kullanılan Bileşenlerin Final Konsantrasyonları	Kullanılan Bileşenlerin Örnek Hacimleri
% 0,5 NP-40	250 µl
120 mM NaCl	12 ml
50 mM TrisHCl pH = 7,4	5 ml
2 mM EDTA	200 µl
2 mM EGTA	1 ml
Sodyum Pirofosfat	500 µl

Tablo 3.4. Lizis tamponu bileşenlerinin konsantrasyonları ve kullanılan bileşenlerin hacimleri

Kullanılan Bileşenlerin Final Konsantrasyonları	Kullanılan Bileşenlerin Örnek Hacimleri
EBC Tamponu	1289 µl
1X PIC (Proteaz İnhibitör Kokteyli)	150 µl
50 mM Calyculin	1,5 µl
20 mM NaF	60 µl

NP-40 bileşeni sitoplazmik zarı parçalayan bir deterjandır. PIC proteaz inhibitörü olarak kullanılmakta ve proteinlerin degradasyonunu engellemektedir. TrisHCl, hazırlanan tamponun pH'sının stabil kalmasını sağlamaktadır. EGTA (etilen glikol tetrasetik asit) ve EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) Ca^{++} ve Fe^{+++} iyonlarının solüsyonda kalmasını sağlayarak reaksiyona girmesini engeller. Sodyum Pirofosfat, Calyculin ve NaF protein fosfataz inhibitörü olarak kullanılır ve bu sayede fosfo proteinlerin degradasyonu önlenmiş olur. Lizat hazırlama işlemine başlamadan önce lizis edilecek kuyu sayısının 2 katı kadar 1,5 ml'lik deney tüpü $-20^{\circ}C$ dolapta soğutulmalıdır. Lizat hazırlama aşamasında kullanılacak pipet uçları ve PBS soğuk odada bekletilmiş olmalıdır.

6 plaklı kuyular içerisinde belirlenen saatlerde (0-1-3-6-12-24 saat) PI-103 ajanı ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinin inkübasyon süreleri bittikten sonra lizat hazırlanacak hücre plağı etüvden alınarak $+4^{\circ}C$ odada buz üstünde 5 dakika bekletildi. Bu aşamadan itibaren tüm işlemler sıcaklık faktöründen dolayı protein degradasyonunu önlemek amacıyla $+4^{\circ}C$ odada yapıldı. Plağın 5 dakika süresince buz üstünde bekletilmesinden sonra kuyularda bulunan PI-103 ajanı ve besiyeri uzaklaştırıldı. Kuyuların besiyeri ve ajandan temizlenmesi amacıyla 3 defa soğuk PBS ile kuyular yıkandı. Kuyu ve yıkama başına 400 μ l PBS kullanıldı. Devamında her bir kuyuya 400 μ l taze olarak hazırlanmış lizis tampon eklendi. 6 kuyulu plak $+4^{\circ}C$ soğuk odada bulunan çalkalayıcıda 100 rpm hızda 5 dakika çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra herbir kuyu kazıyıcı (*scraper*) yardımı ile veya pipet ucunun arka kısmı ile kazındı. Kazıma işleminden sonra 6 kuyulu plak tekrardan 100 rpm hızda 10 dakika çalkalandı. Çalkalama işleminden sonra herbir kuyuya tekrardan birer dakika kazıma işlemi yapıldı. Kazıma işleminden sonra son defa 100 rpm hızda 5 dakika çalkalandı ve son defa kazıma işlemi yapıldı. Toplamda 3 defa 20 dakika çalkama işlemi ve 3 defa kuyu başına birer dakika kazıma işlemi yapılmış oldu. Yapılan bu işlem ile hücrelerin lizis olması sağlandı. Son kazıma işleminden sonra $-20^{\circ}C$ dolapta soğutulan 1,5 ml'lik deney tüpleri alındı ve lizis edilen örnekler tüplere konuldu. 1,5 ml'lik deney tüplerine konulan örnekler $+4^{\circ}C$ 'ye soğutulmuş santrifüjde 13000 rpm

hızda 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem ile çözültide bulunan atık maddelerin tüpün dibine çökmesi sağlandı. +4 °C soğuk odada dikkatli bir şekilde, pellet kaldırılmadan, supernatant mikropipet ile çekilerek önceden -20 °C'de soğutulmuş olan 1,5 ml'lik deney tüplerine aktarıldı. Bu işlemden sonra protein kantitasyonu aşamasına geçildi veya protein lizatları daha sonra kantite edilmek üzere -86 °C buzdolabına kaldırıldı.

3.13 Protein Kantitasyonu

Western blot deneyinde kullanılacak olan protein lizatlarının, protein miktarlarının tayini amacıyla *Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit* ile protein kantitasyonu yapıldı. Düz tabanlı 96 kuyulu plakta bulunan kuyulara protein miktar tayini yapılacak protein lizat örneklerinden 10'ar µl eklendi. Ayrıca kantitasyonu yapılacak örneklerin protein miktarlarının belirlenebilmesi amacıyla, içeriğindeki protein miktarı oranları bilinen BSA (*Bovine Serum Albumin*) protein standartları 96 kuyulu plağın boş olan kuyularına eklendi. 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml ve 0,125 mg/ml olmak üzere toplamda 7 farklı BSA protein standartından 10'ar µl kuyulara eklendi. Son olarak lizat hazırlama aşamasında hücreleri lizis etmek için kullanılan lizis bufferın yapacağı olası ısımanın, proteinlerin yoğunlukları ile oluşan farklı renk yoğunluklarından çıkarılabilmesi amacıyla bir kuyuya 10 µl lizis tamponu eklendi. Blank olarak kullanılacak bu kuyunun renk yoğunluğunun protein kuyularındaki renk yoğunluklarından çıkarıldığı zaman elde edilen renk yoğunluğu salt olarak proteinlerin oluşturmuş olduğu yoğunluk olarak elde edildi. Her bir protein standardı, protein lizatı ve blank olarak kullanılacak lizis tamponu üzerine 290 µl kit içerisinde bulunan *Coomassie Blue* solüsyonu eklendi. *Coomassie Blue* kahverengi bir solüsyon olmakla birlikte protein miktarı fazla ve/veya pH'sı düşük olan durumlarda mavi renge dönüşmektedir. *Coomassie Blue* eklenen kuyulara yavaş bir şekilde pipetaj yapılarak protein lizatının ve boya içeren solüsyonun homojen şekilde karışması sağlandı. Kontrolsüz olarak yapılacak pipetaj işlemi kuyularda baloncuk oluşumuna yol açabilir. Bu sebepten ötürü, kantitasyon verimliliği düşebilir. Ayrıca, *Coomassie Blue* ekleme aşamasının mümkün

olduğunca hızlı bir şekilde manipüle edilmesi, ışığa duyarlı olan solüsyondan en yüksek verimi almak açısından önem arz etmektedir. Tüm kuyulara aynı işlem uygulandıktan sonra 96 kuyulu plak karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra kantite edilecek plak, plak okuyucu spektrofotometre cihazına yerleştirildi. 595 nm dalga boyunda kuyuların renk yoğunlukları kantite edildi. Kantitasyon ile elde edilen değerler 1:30 oranında *Coomassie Blue* ile seyreltilmiş olduğundan dolayı 30 ile çarpıldı. Kantitasyonda kullanılan protein standartlar mg/ml cinsinden olduğu için elde edilen bu değer, 1 ml lizat içerisinde bulunan proteinin mg cinsinden değerini vermektedir. Bu sebepten dolayı örneklerden elde edilen değerler 1 µl lizat içerisinde bulunan protein miktarını µg cinsinden karşılığını vermektedir. Western blot deneylerinde her bir örnekten 50 µg/µl protein kullanılacağı için elde edilen değerleri doğru orantı yaparak 50 µg'ı kantitasyon sonucu hesapladığımız µg değerlerine bölerek kaç µl protein lizati kullanılacağı hesaplandı. Western blot deneyine başlamadan önce tüm protein lizatlarına SDS-jel yükleme tamponu 1:1 oranında ekleneceğinden dolayı son elde ettiğimiz değeri iki ile çarparak protein lizat örneklerinden kullanılacak net µl değeri hesaplanmış oldu.

3.14 Western Blot ve Protein Analizi

Protein kantitasyonu aşamasından sonra 1,5 ml'lik deney tüplerinde bulunan veya kullanılacak lizat miktarı oranında (1:1) SDS-jel yükleme tamponu tüplere eklenerek karıştırıldı. SDS içerisinde bulunan β-merkaptetanolden dolayı bu işlem çeker ocak içerisinde yapıldı. Tüp içerisine eklenen ve pipetaj yapılarak homojen şekilde karışması sağlanan SDS tamponu, proteinlerin denatürasyonu için önceden ısı 95 °C'ye getirilmiş olan kuru ısıtma bloğu içerisinde 5 dakika bekletildi. Bu sayede proteinler denatüre olmuş oldu. Proteinlerin denatürasyonu kullanılacak olan antikoların proteinleri tutunabilmesi açısından önemlidir. Aksi takdirde antikoların proteinlere tutunması imkansızlaşır. Tampon içerisinde bulunan β-merkaptetanol proteinlerin disülfid bağlarının indirgenmesini sağlar. Tampon içerisinde bulunan ve tamponun adını aldığı SDS maddesi denatüre

edilen proteinlerin eksi (-) yük ile yüklenmesini sağlar. Tampon içerisinde bulunan diğer maddelerden biri olan gliserol proteinlerin jel kuyuları içerisine çökmesini sağlamakta ve bir diğer madde olan bromfenol mavisi ise jelde örneklerin görülmelerini sağlamaktadır (Tablo 3.5)

Tablo 3.5. SDS-jel yükleme tamponu bileşenleri ve kullanılan bileşenlerin hacimleri

Kullanılan Bileşenlerin Final Konsantrasyonları	Kullanılan Bileşenlerin Örnek Hacimleri
dH ₂ O	1,4 ml
Bromfenol mavisi	4 mg
1M Tris HCl pH= 6,8	1,6 ml
%10 SDS	4 ml
%10 Gliserol	2 ml
β-merkaptoetanol	1 ml

3.14.1 Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Western blot deneyleri için jel yürütme tankı olarak *Owl P8DS* (Thermo Scientific) sistemi kullanıldı. Yürütme ve yükleme jelleri çözeltileri her deney için iki jel kullanımına yetecek ve 2 hedef protein analizinin yapılabileceği miktarda, hacimleri optimize edilmiş oranlarda kullanıldı (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Jel hazırlamak için kullanılan çözelti miktarları

%10 Yürütme Jeli (2 Jel için)	%4 Yükleme Jeli (2 Jel için)
dH ₂ O → 6,03 ml	dH ₂ O → 9 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid → 5 ml	%30 Akrilamid/Bisakrilamid → 1,98 ml
1,5 M Tris pH=8,8 → 3,75 ml	0,5 M Tris pH=6,8 → 3,78 ml
%10 SDS → 150 µl	%10 SDS → 150 µl
%10 APS → 75 µl	%10 APS → 75 µl
TEMED → 7,5 µl	TEMED → 15 µl

Jel solüsyonunu hazırlarken amonyum persülfat (APS) ve tetrametiletildiamin (TEMED) en son eklenecek madde olmalıdır. APS solüsyonda bulunan akrilamidin polimerizasyonunu sağlayan ko-aktivatör madde, TEMED ise katalizör maddedir. En iyi performansı elde edebilmek için APS diğer çözeltilerden farklı olarak taze hazırlandı. APS, 0,1 mg/µl olacak şekilde dH₂O ile (50 mg APS + 500 µl dH₂O) çözüldü.

Jel solüsyonunu polimerizasyonu için kullanılacak olan cam sıkıştırma aparatlarının temiz olmasına dikkat edildi. Cam yüzeyi jel solüsyonu dökülmeden önce dH₂O ve etanol ile temizlenerek kullanıma hazır hale getirildi. Cam sıkıştırma aparatı arasına ilk olarak yürütme jeli solüsyonu eklendi. Camın $\frac{3}{4}$ 'lük kısmına kadar yürütme jeli eklendi. Akrilamidin hava ile teması jelin polimerizasyonunu engellediği için jelin üst kısmına jelin hava ile temasını kesecek ve jeli yüklerken oluşan hava kabarcıklarının varlığını engelleyecek ayrıca jelin düz bir yüzey alanı oluşturmasını sağlayacak miktarda bütanol eklendi. Jelin donması için 30-60 dakika beklenildi. Yürütme jelinin donması ile birlikte cam arasındaki bütanol dH₂O ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Cam arasının ıslak kalmaması için peçete yardımı ile

cam arasında kalan su çekildi. Bu işlemden sonra hazırlanan yükleme jeli $\frac{1}{4}$ oranında yürütme jeli üzerine eklendi. Jel eklenmesinin hemen ardından kuyuların oluşmasını sağlayacak tarak aparatı konuldu. Yükleme jelinin donması içinde 30-60 dakika beklendi ve bu süre sonunda taraklar cam arasından dikkatlice çıkarıldı. Bu sayede yükleme jelinin donması ile yükleme yapılacak kuyular oluşturulmuş oldu. Cam arasında bulunan ve kullanıma hazır olan jel yürütme tankı içerisine konuldu. Yürütme tankı içerisine yerleştirilen cam sıkıştırma aparatı içerisinde bulunan jellerin arasına ve dış bölgede bulunan tank içerisine 1X yürütme tamponu eklendi (Tablo 3.7). Yürütme tamponunun kuyuların içini doldurması sağlandı. Bu aşamadan sonra lizat örnekleri ve marker kuyulara yüklendi. Örnekler ve marker yüklendikten sonra tankın kapağı kapatıldı ve tank güç kaynağına bağlandı. 100-110 voltta 1,5-2 saat yürütmesi sağlandı.

Tablo 3.7. Yürütme tamponu bileşenleri ve kullanılan bileşenlerin hacimleri

Yürütme Tamponu (10X)	
Tris → 15 g	} Son hacim 1000 ml olacak şekilde dH ₂ O eklendi.
Glisin → 72 g	
SDS → 5 g	

3.14.2 *iBlot™ Dry Blotting* Sistemi ile Transfer ve Blotlama

Örneklerin yürütme işlemi bittikten sonra güç kaynağı kapatıldı. 1X yükleme tamponu tankın içerisinden uzaklaştırıldı. İçerisinde SDS jelin bulunduğu cam aparatlar içi dH₂O ile doldurulmuş bir kabın içerisine konuldu. Dikkatli bir şekilde, jele zarar vermeden cam aparatlar birbirlerinden ayrıldı ve jel su içerisine bırakıldı. Bu aşamadan sonra transfer işlemini gerçekleştireceğimiz *iBlot™ Dry Blotting* transfer sistemi materyalleri hazırlandı. Cihazın kapağı açıldı ve stack içerisinde bulunan materyaller şu

sıra ile cihaza yerleştirildi: Anot Stack (İçerisinde en alt katmanda pozitif yüklü anot stack ve onun üzerinde jelde yürümüş olan proteinlerin transfer olacağı PVDF membran bulunmaktadır) → Jel → Filtre Kağıdı (Jelin üstüne filtre kağıdı yarı ıslak bir şekilde koyuldu) → Katot Stack (Negatif yüklü katot stack sayesinde proteinlerin PVDF membrana doğru transferi sağlanmaktadır) → Sünger (Son olarak sünger cihazın kapak kısmına yerleştirildi ve cihaz kapatıldı)

Materyallerin yerleştirilmesinden sonra cihaz çalıştırıldı. Transfer işleminden sonra analizini sağlayacağımız p-HER2 (185 kDa) ve p-HER3 (185 kDa) proteinlerinin büyüklükleri 150 kDa'dan büyük olduğu için 20 volt akım olarak ayarlanmış P3 programı seçildi. Akımın geçeceği süre ilk denemelerde 7 dakika olarak ayarlandı. Ancak görüntüleme basamağında membranda herhangi bir bant tespit edilemedi. Bu sebepten dolayı transfer süresi 13 dakika olarak optimize edildi. Cihaz çalıştırıldı ve proteinlerin jelden membrana transfer işlemi sağlandı. Transfer işlemi sürerken %5'lik yağsız süt tozu PBS-T (%0,1 PBS-Tween 20) içerisinde çözüldü. P3 programında (20 volt) 13 dakika süren transfer sonrası cihazın kapağı açıldı jelin üstünde bulunan materyaller atıldı. Devamında jelin boyutları baz alınarak PVDF membranın jel dışında kalan bölgeleri membranın kuruma riskinden ötürü hızlı bir şekilde kesildi. Kesilen membran bir kap içerisinde önceden hazırlanmış olan yağsız süt tozu solüsyonuna konuldu. Membran, yağsız süt tozu solüsyonu içerisinde 1-1,5 saat süresince, oda sıcaklığında ve 100 rpm hıza ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde blokasyonu gerçekleştirdi. Süt tozunda bulunan kazein proteinlerin epitoplarına tutunarak blokasyon aşamasından sonra uygulanacak antikor inkübasyonunun spesifitesini arttırmayı sağlamaktadır. Bu sayede görüntüleme esnasında membran, arka planda daha temiz bir görüntü elde etmemizi sağlamaktadır. Blokasyon işlemi bittikten sonra 1X PBS-T ile membran aynı kap içerisinde 3 defa 10'ar dakika 100 rpm hızda çalkalayıcıda yıkandı. Bu sayede süt tozu kalıntıları membran yüzeyinden temizlenmiş oldu.

Süt tozu ile blokasyon ve ardından yapılan PBS-T ile yıkama aşamasından sonra membranı primer antikor ile muamele aşamasına geçildi. Bu aşamada, denatüre olmuş proteinleri tek bir determinantını tanıyan, yüksek afinite ve özgüllükte tanıyan monoklonal antikolar kullanıldı. *p-HER2 proteini için p-Her2/ErbB2 Rabbit Anti-human primer antikor* ve *p-HER3 proteini için p-Her3/ErbB3 Rabbit Anti-human primer antikor* kullanıldı. Her iki monoklonal antikorda PBS-T içerisinde 1:1000 oranında dilüe edildi (10 µl primer antikor + 10 ml PBS-T). Kullanılacak antikorun PBS-T içerisinde homojen karışması için solüsyon 3-5 saniye vortekslendi. PBS-T ile dilüe edilen monoklonal antikor membranın bulunduğu kaba eklendi ve +4 °C odada, 100 rpm hızda çalışan çalkalayıcı üzerinde ajite edilerek bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin en az 18 saati geçmiş olmasına dikkat edildi. Bir gece primer antikor membran ile inkübasyonu sonrası antikor membrandan uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında 3 defa 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Bu işlemden sonra primer antikorun görüntülenebilmesi için HRP (*Horseradish Peroksidaz*) konjuge primer antikorun üretildiği organizmaya karşı üretilmiş sekonder antikor ile inkübasyon aşamasına geçildi. Sekonder antikor olarak *Polyclonal Goat Anti-rabbit immunoglobulins/HRP* kullanıldı. Sekonder antikor 1:10000 oranında PBS-T ile dilüe edilerek membran ile 1,5 saat oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi (1 µl sekonder antikor + 10 ml PBS-T). İnkübasyon süresi bittikten sonra sekonder antikor membrandan uzaklaştırıldı ve son olarak PBS-T ile 3 defa 10'ar dakika oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Yapılan yıkama işlemleri sayesinde membran üstündeki olası non-spesifik bağlanmaların temizlenmesi sağlandı. Son yapılan yıkamadan sonra kemoluminesans görüntüleme aşamasına geçildi.

3.14.3 Kemoluminesans Görüntüleme

Sekonder antikor ile inkübasyon ve ardından yapılan PBS-T ile yıkama sonrası membran üzerinde görüntülemek istenilen hedef proteinlerin görüntülenmesi aşamasına geçildi. ECL içerisinde bulunan luminesans madde olan luminol, sekonder antikora konjuge HRP'de bulunan peroksidaz enziminin substratıdır. Bu sayede luminol, peroksidaz enzimi ile reaksiyona girerek peroksidazı okside eder ve 3-aminofthalat açığa çıkar. Açığa çıkan ürün foton saçarak (425 nm) düşük enerji seviyesine iner ve ışımaya oluşur. Meydana gelen bu reaksiyon sonucu inkübe edilen antikorun bağlandığı proteinler bant vererek görünür hale gelir. ECL kiti olarak *Super Signal West-femto Maximum Sensitivity Substrate* kullanıldı ve reaksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Kit protokülüne uygun olarak hazırlanan solüsyon membranın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde eklendi ve 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası solüsyon uzaklaştırıldı ve membran üzerinde bulunan protein bantları *Kodak Gel Logic 1500* görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

3.14.4 β -aktin ile Reblot

Görüntüleme aşamasından sonra elde edilen protein bantlarının normalizasyonu ve deney sonucunun kontrolünü sağlamak amacıyla β -aktin proteinlerinin homojenitesine bakıldı. Bunun için hedef protein bant görüntülerini elde ettiğimiz membranı β -aktin primer antikoruna ile reblot işlemi yapıldı. Görüntüleme işlemi bittikten sonra membran 15 dakika PBS-T içerisinde, oda sıcaklığında, 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Yıkama işleminde sonra blokasyon aşaması olan %5'lik yağsız süt tozu solüsyonu ile 1,5 saat inkübasyon aşamasına geçildi. Devamında 3 defa, 10'ar dakika, oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde PBS-T ile yıkama aşamasına geçildi. Yıkama aşamasından sonra *β -actin Rabbit Anti-human primer antikoruna* 1:2500 oranında PBS-T ile dilüe edilerek primer antikor ile inkübasyon aşamasına geçildi (6 μ l primer antikor + 15 ml PBS-T). İlk reblot deneylerinde β -aktin primer antikoruna ile 1 saat inkübe edildi. Elde

edilen zayıf β -aktin protein bantları sebebiyle inkübasyon süresi 2 saat olarak optimize edildi. Oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde 2 saatlik β -aktin primer antikoru ile inkübasyon aşamasından sonra 3 defa, 10'ar dakika, oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde PBS-T ile yıkama aşamasına geçildi. Yıkama aşamasından sonra HRP konjuge sekonder antikor ile inkübasyon aşamasına geçildi. Oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde 1,5 saatlik HRP konjuge sekonder antikor ile inkübasyon aşamasından sonra 3 defa, 10'ar dakika, oda sıcaklığında 100 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde PBS-T ile yıkama aşamasına geçildi. Membran son defa PBS-T ile yıkandıktan sonra kemolüminesans görüntüleme aşamasına geçildi. Görüntüleme sonucunda elde edilen β -aktin bantları ve daha önce elde edilen p-HER2 ve p-HER3 bantlarının dansitometrik analizi aşamasına geçildi

3.14.5 Dansitometrik Analiz

ImageJ adlı görüntü analiz programı kullanılarak, kemolüminesans görüntüleme ile elde edilen bantların dansitometrik yoğunlukları tespit edildi. Elde edilen 3 bağımsız grubun hedef protein bantları ile kontrol proteini olarak kullanılan β -aktin protein bant yoğunlukları ile normalize edildi.

3.15 İstatistiksel Analiz

Eş zamanlı PZR sonucu elde edilen mRNA analizi verileri ve western blot sonucu elde edilen protein analizi verileri *bağımsız gruplar student t* testi ile istatistiksel analizi yapıldı. Yapılan testin sonucunda $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler *IBM® SPSS® Statistics Version 20* programı kullanılarak yapıldı.

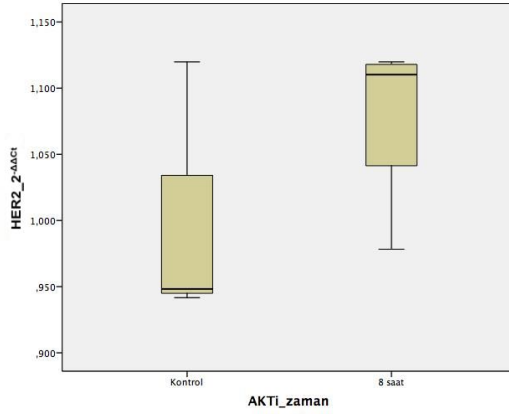
4. BULGULAR

4.1 SKBR-3 Hücre Dizisinde AKTi ile PI3K Yolağının Farmakolojik İnhibisyonunun HER2 ve HER3 Ekspresyonlarına Etkisi

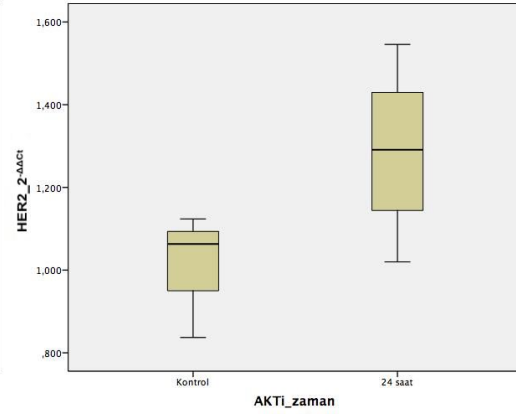
SKBR-3 hücreleri 8 ve 24 saat süre ile 1 µM AKTi ile inkübe edilerek HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonları kontrol hücreleri ile eş zamanlı PZR yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Kontrol olarak β-aktin kullanıldı. Her koşul için 4 bağımsız deney yapıldı. Hücrelerin HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarında ilaca bağlı olarak görülen değişimler *bağımsız gruplar student's t* testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

4.1.1 SKBR-3 Hücre Dizinde AKTi'nin Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER2 Ekspresyonuna Etkisi

SKBR-3 hücrelerinde kullanılan AKTi'nin zamana bağlı olarak HER2 mRNA ekspresyonlarına etkisi eş zamanlı PZR yöntemi ile incelendi. Zamana bağlı olarak elde edilen Ct değerlerinin kontrol grubu Ct değerleri ile arasındaki fark hesaplanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine ulaşıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile yapılan istatistiksel analiz sonucu, kontrol hücreleri ile 8 saat AKTi ile muamele edilmiş hücreler arasında ve kontrol hücreleri ile 24 saat AKTi ile muamele edilmiş hücreler arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.1 ve 4.2).



Şekil 4.1. SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat AKTi ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi (□ = %25-%75, I = Min-Mak)

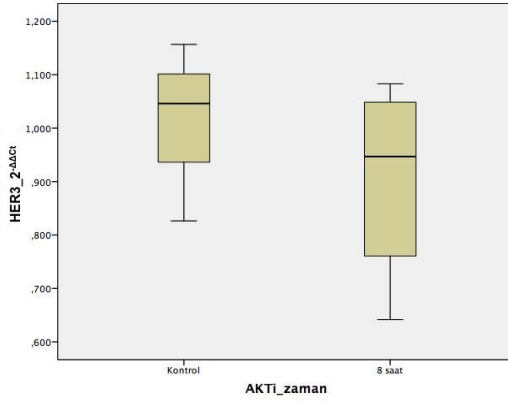


Şekil 4.2. SKBR-3 hücre dizisinde 24 saat AKTi ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi (□ = %25-%75, I = Min-Mak)

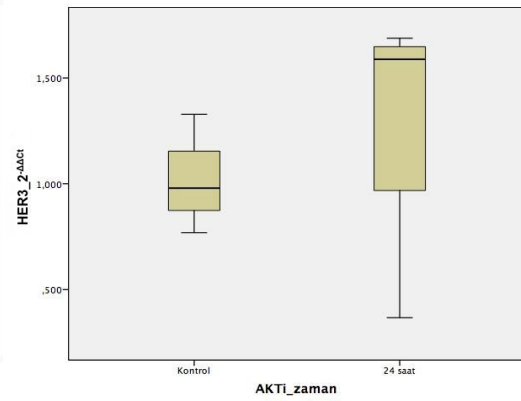
4.1.2 SKBR-3 Hücre Dizinde AKTi'nin Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER3 Ekspresyonuna Etkisi

SKBR-3 hücrelerinde kullanılan AKTi'nin zamana bağlı olarak HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi eş zamanlı PZR yöntemi ile incelendi. Zamana bağlı olarak elde edilen Ct değerlerinin kontrol grubu Ct değerleri ile arasındaki fark hesaplanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine ulaşıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile yapılan istatistiksel analiz sonucu, kontrol hücreleri ile 8 saat AKTi ile muamele edilmiş hücreler arasında ve kontrol hücreleri ile 24 saat AKTi ile muamele edilmiş hücreler arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0,05$) (Şekil 4.3 ve 4.4).

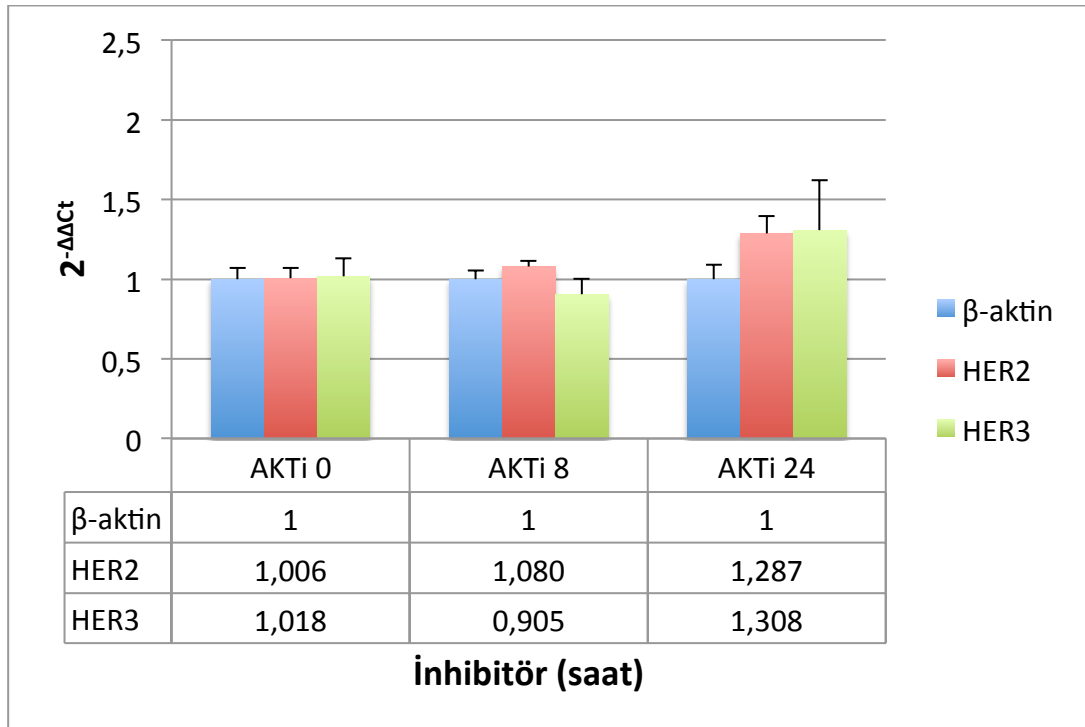
SKBR-3 hücrelerinin 8 ve 24 saatlik AKTi ile inkübasyonunun, HER2 ve HER3 mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.3. SKBR-3 hücre dizisinde
8 saat AKTi ile inkübasyonun
HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi
(\square = %25-%75, \perp = Min-Mak)



Şekil 4.4. SKBR-3 hücre dizisinde
24 saat AKTi ile inkübasyonun
HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi
(\square = %25-%75, \perp = Min-Mak)



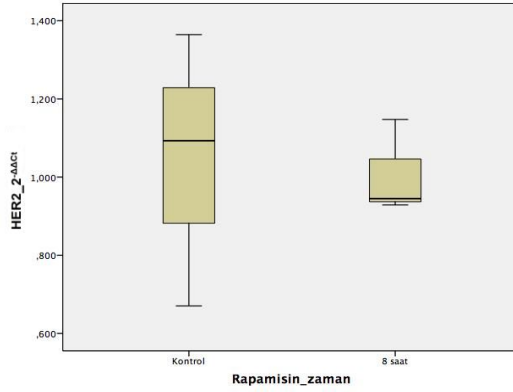
Şekil 4.5. SKBR-3 hücre dizisinde AKTi'nin zamana bağlı olarak
HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi (+SH)

4.2 SKBR-3 Hücre Dizisinde Rapamisin ile PI3K Yolağının Farmakolojik İnhibisyonunun HER2 ve HER3 Ekspresyonlarına Etkisi

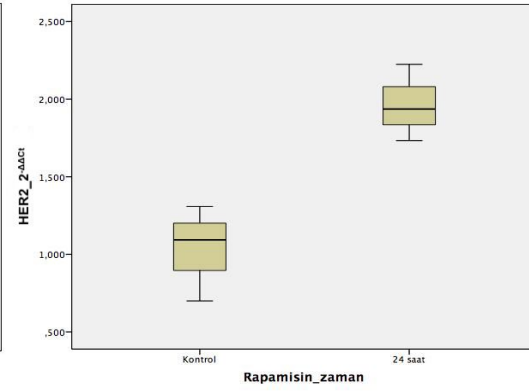
SKBR-3 hücreleri 8 ve 24 saat süre ile 50 nM Rapamisin ile inkübe edilerek HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonları kontrol hücreleri ile eş zamanlı PZR yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Kontrol olarak β -aktin kullanıldı. Her koşul için 3 bağımsız deney yapıldı. Hücrelerin HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarında ilaca bağlı olarak görülen değişimler *bağımsız gruplar student's t* testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

4.2.1 SKBR-3 Hücre Dizinde Rapamisin'in (mTOR inhibitörü) Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER2 Ekspresyonuna Etkisi

SKBR-3 hücrelerinde kullanılan Rapamisin'in zamana bağlı olarak HER2 mRNA ekspresyonlarına etkisi eş zamanlı PZR yöntemi ile incelendi. Zamana bağlı olarak elde edilen Ct değerlerinin kontrol grubu Ct değerleri ile arasındaki fark hesaplanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine ulaşıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile yapılan istatistiksel analiz sonucu, kontrol hücreleri ile 8 saat Rapamisin ile muamele edilmiş hücreler arasında anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$), kontrol hücreleri ile 24 saat Rapamisin ile muamele edilmiş hücreler arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.6 ve 4.7).



Şekil 4.6. SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat Rapamisin ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi (\square = %25-%75, \perp = Min-Mak)

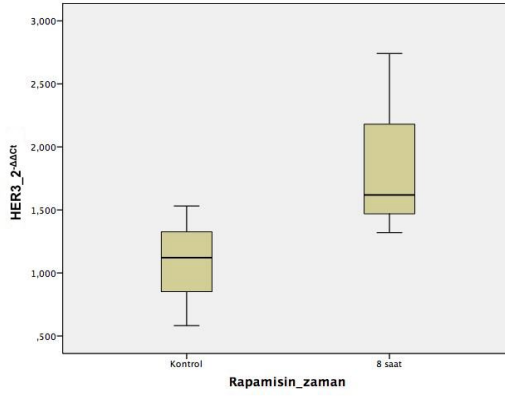


Şekil 4.7. SKBR-3 hücre dizisinde 24 saat Rapamisin ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi (\square = %25-%75, \perp = Min-Mak)

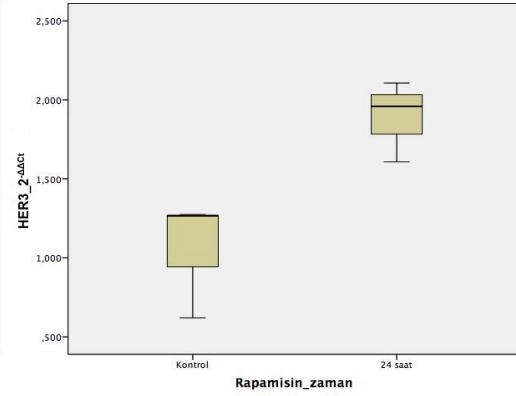
4.2.2 SKBR-3 Hücre Dizinde Dizinde Rapamisin'in Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER3 Ekspresyonuna Etkisi

SKBR-3 hücrelerinde kullanılan Rapamisin'in zamana bağlı olarak HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi eş zamanlı PZR yöntemi ile incelendi. Zamana bağlı olarak elde edilen Ct değerlerinin kontrol grubu Ct değerleri ile arasındaki fark hesaplanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine ulaşıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile yapılan istatistiksel analiz sonucu, kontrol hücreleri ile 8 saat Rapamisin ile muamele edilmiş hücreler arasında anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$), kontrol hücreleri ile 24 saat Rapamisin ile muamele edilmiş hücreler arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.8 ve 4.9).

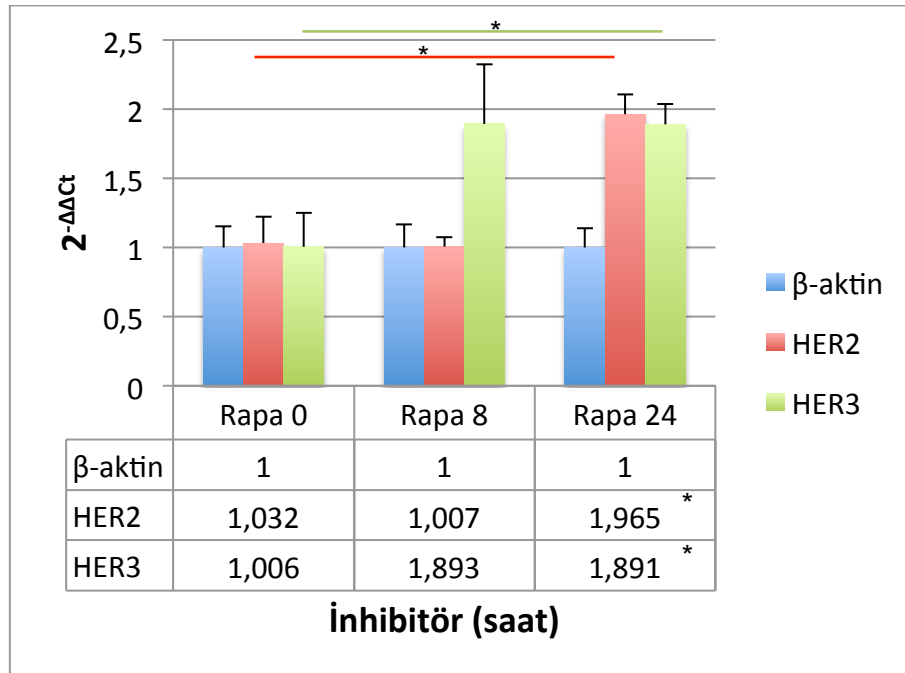
SKBR-3 hücrelerinin 8 saat Rapamisin ile inkübasyonu sonucu, HER2 ve HER3 mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmezken, 24 saatlik inkübasyon sonucu HER2 ve HER3 mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görüldüğü belirlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.8. SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat Rapamisin ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi (□ = %25-%75, I = Min-Mak)



Şekil 4.9. SKBR-3 hücre dizisinde 24 saat Rapamisin ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi (□ = %25-%75, I = Min-Mak)



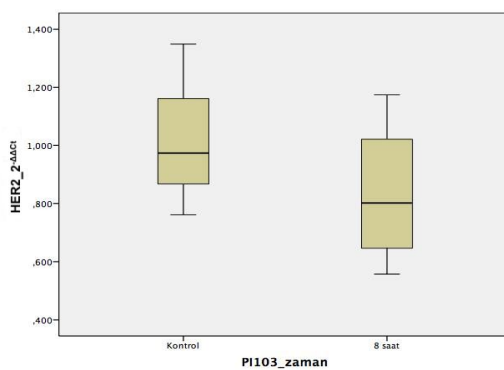
Şekil 4.10. SKBR-3 hücre dizisinde Rapamisin'in zamana bağlı olarak HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi (+SH) (*= $p < 0,05$)

4.3 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI-103 ile PI3K Yolağının Farmakolojik İnhibisyonunun HER2 ve HER3 Ekspresyonlarına Etkisi

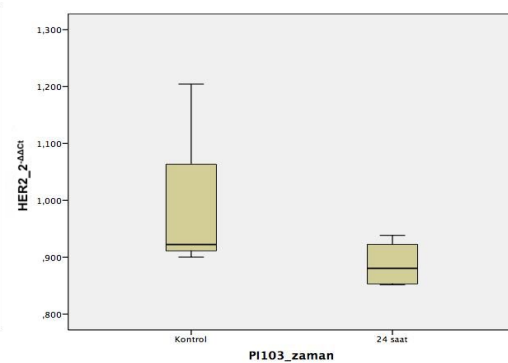
SKBR-3 hücreleri 8 ve 24 süre ile 1 μ M PI-103 ile inkübe edilerek HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonları kontrol hücreleri ile eş zamanlı PZR yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Kontrol olarak β -aktin kullanıldı. Her koşul için 4 bağımsız deney yapıldı. Hücrelerin HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarında ilaca bağlı olarak görülen değişimleri *bağımsız gruplar student's t* testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

4.3.1 SKBR-3 Hücre Dizinde PI-103'ün Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER2 Ekspresyonuna Etkisi

SKBR-3 hücrelerinde kullanılan PI-103'ün zamana bağlı olarak HER2 mRNA ekspresyonlarına etkisi eş zamanlı PZR yöntemi ile incelendi. Zamana bağlı olarak elde edilen Ct değerlerinin kontrol grubu Ct değerleri ile arasındaki fark hesaplanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine ulaşıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile yapılan istatistiksel analiz sonucu, kontrol hücreleri ve 8 saat PI-103 ile muamele edilmiş hücreler arasında ve kontrol hücreleri ve 24 saat PI-103 ile muamele edilmiş hücreler arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.11. SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat PI-103 ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi (□ = %25-%75, I = Min-Mak)

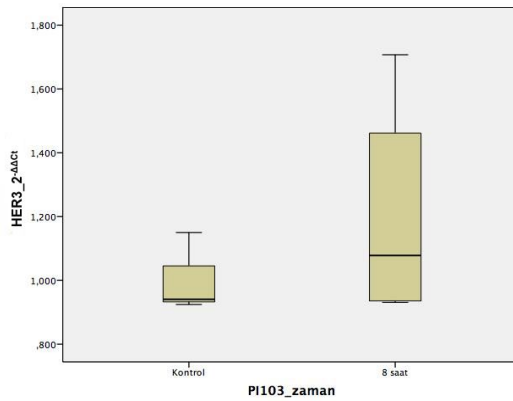


Şekil 4.12. SKBR-3 hücre dizisinde 24 saat PI-103 ile inkübasyonun HER2 mRNA ekspresyonuna etkisi (□ = %25-%75, I = Min-Mak)

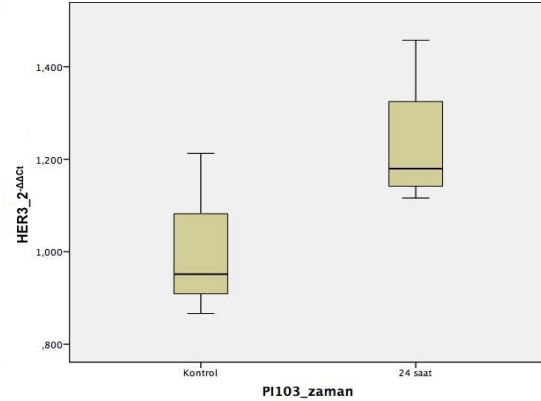
4.3.2 SKBR-3 Hücre Dizinde Dizinde PI-103'ün Zamana Bağlı Olarak İnkübasyonunun HER3 Ekspresyonuna Etkisi

SKBR-3 hücrelerinde kullanılan PI-103'ün zamana bağlı olarak HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi eş zamanlı PZR yöntemi ile incelendi. Zamana bağlı olarak elde edilen Ct değerlerinin kontrol grubu Ct değerleri ile arasındaki fark hesaplanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine ulaşıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile yapılan istatistiksel analiz sonucu, kontrol hücreleri ve 8 saat PI-103 ile muamele edilmiş hücreler ve kontrol hücreleri ve 24 saat PI-103 ile muamele edilmiş hücreler arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.13 ve 4.14).

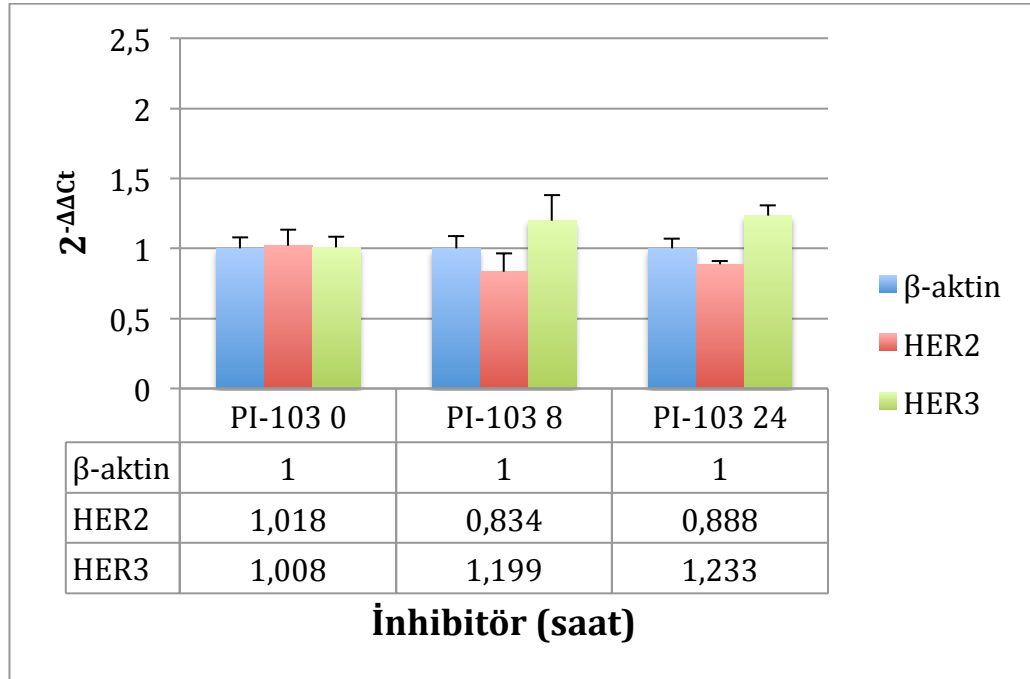
SKBR-3 hücrelerinin 8 ve 24 saatlik PI-103 ile inkübasyonu sonucu, HER2 ve HER3 mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.13. SKBR-3 hücre dizisinde 8 saat PI-103 ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi (□ = %25-%75, I = Min-Mak)



Şekil 4.14. SKBR-3 hücre dizisinde 24 saat PI-103 ile inkübasyonun HER3 mRNA ekspresyonuna etkisi (□ = %25-%75, I = Min-Mak)



Şekil 4.15. SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarına etkisi (+SH)

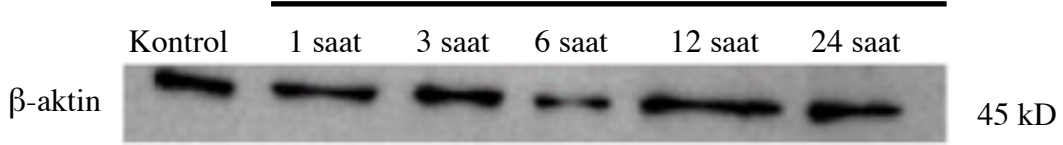
4.4 Western Blot Deneyi Optimizasyonu

Western blot deneylerinde, p-HER2 ve p-HER3 protein ekspresyonları analizlerine başlamadan önce görüntüleme ve kantitasyon aşamasında, elde edilen protein bantlarının normalizasyonu ve deney kontrolünü sağlamak amacıyla β-aktin proteinlerin ekspresyonu değerlendirildi. Bunun için hedef protein bant görüntülerini elde ettiğimiz membranı β-aktin primer antikoru ile reblot işlemi yapıldı. β-aktin bantlarının homojen olmaması sebebiyle protein kantitasyonu ve poliakrilamid jel elektroforezi aşamalarında optimizasyon çalışmaları yürütüldü.

4.4.1 Protein Kantitasyonunun Optimizasyonu

İlk yapılan Western blot çalışmalarının dansitometrik analizleri sonucunda, kontrol proteini olarak kullanılan β-aktin bantlarının eşit olarak yüklenmediği gözlemlendi (Şekil 4.16).

PI-103 ($1\mu\text{M}$)



Şekil 4.16. β -aktin ekspresyonu

Bu aşamada, protein kantitasyon yönteminde minör değişiklikler uygulandı (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Protein kantitasyonu yöntemi

İlk uygulama	Modifiye uygulama
Hazır stok protein standart	Taze protein standartı
+4 °C odada manipülasyon	Oda sıcaklığında manipülasyon
Spektrofotometre çalkayacısı	Pipetaj
Ampul BSA Standart (Thermo)	Hazır BSA Standart (Bio-rad)

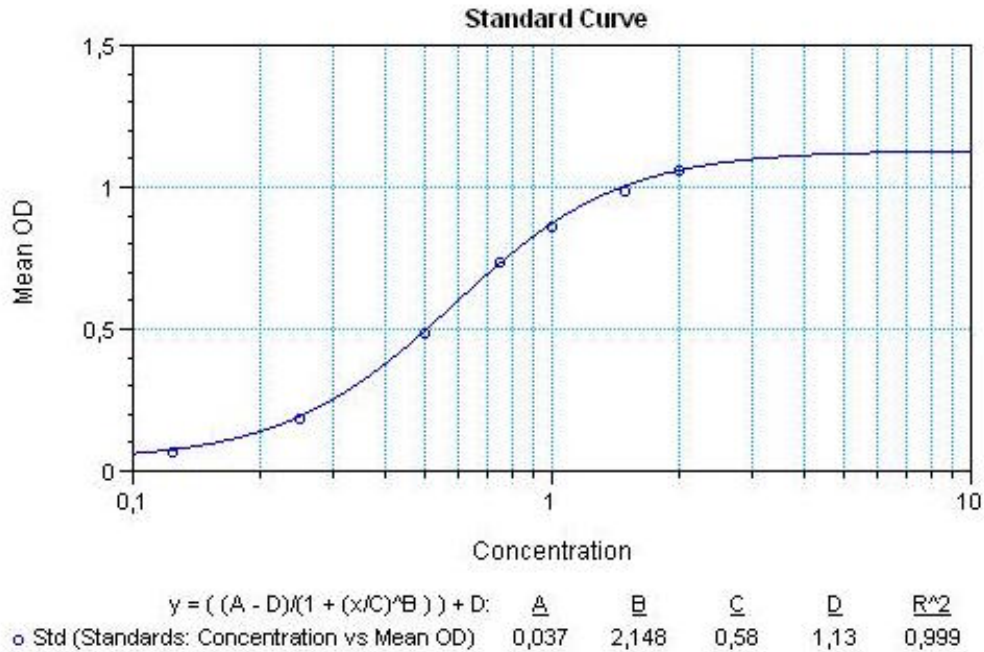
Protein kantitasyonu aşamasında kullanılan tek ampullük 2 mg/ml'lik BSA standardının seri dilüsyonu ile hazırlanan alt değer standartlar, sonraki deneylerde kullanılması için 5 kullanımlık olarak hazırlandı. Ancak, ilerleyen protein kantitasyonlarında deney verimliliği hazır standartların kullanımından olumsuz olarak etkilendi. Bu deneyimden sonra, protein standartlarının seri dilüsyonları deney öncesi hazırlanıp kullanıldı.

Oda sıcaklığında yapılan protein kantitasyonlarının verimlilikleri, ilk zamanlarda +4 °C odada protein degradasyonunu engelleyebilmek amacıyla yapılan çalışmalara oranla daha uyumlu sonuçlar verdi. Bu deneyimden

sonra, *Coomassie Blue* protein kantitasyonu manipülasyonları oda sıcaklığında yapıldı.

96 kuyulu plağın spektrofotometrenin plağına yerleştirdikten sonra, plak içerisindeki örneklerin daha etkili bir şekilde çalkalanması için cihazın kendi özelliği olan çalkalayıcısıyla karışması sağlanıyordu. Ancak yapılan çalışmada kuyulara eklenebilecek maksimum hacmine yakın düzeyde solüsyon eklendiğinden dolayı çalkalayıcı ile yapılan işlem sonucu örneklerin birbiri ile karışma riski olduğu göz önünde bulunduruldu. Bu deneyimden sonra, örneklerin karışması için sadece pipetaj işlemi yapıldı.

Son olarak, protein lizatlarının spektrofotometrik analizi aşamasında kullanılan tek ampüllük 2 mg/ml'lik BSA standartının seri dilüsyonu ile yapılan ölçümlerde stabilitenin sağlanamamasından ötürü kullanıma hazır protein standartları kullanıldı. Tüm bu optimizasyon işlemlerinden sonra deney verimliliği (R^2 değeri) %99 olarak belirlendi ve deney verimliliğinin stabilizasyonu sağlanmış oldu (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Protein kantitasyonu standart eğrisi

4.4.2 Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Protokolünün Optimizasyonu

Western blot deneyleri için jel yürütme tankı olarak *Owl P8DS* (Thermo Scientific) sistemi kullanıldı. Sistemin jel yürütme tankı tek seferde 2 jel yürütmek için uygun olmasına rağmen, 2 jelin aynı anda polimerizasyonu için uygun değildi. Kullanılacak örneklerde iki hedef proteinin analizi yapılacağı için deney zamanının ve iş gücünün verimli olarak kullanılabilmesi amacıyla jel yürütme tankı sistemi 2 jelin tek seferde polimerizasyonunu sağlamak amacıyla optimize edildi. Yürütme ve yükleme jelleri çözeltileri her deney için iki jel kullanımına yetecek hacimde kullanıldı (Tablo 4.2). İlerleyen *western blot* deneylerinde hazırlanan jelden yeterli verim alınamaması sebebiyle jel hazırlamada kullanılan çözeltilerin oranları *Bio-rad* sistemi jel çözelti oranlarına uygun olarak modifiye edildi (Tablo 4.3).

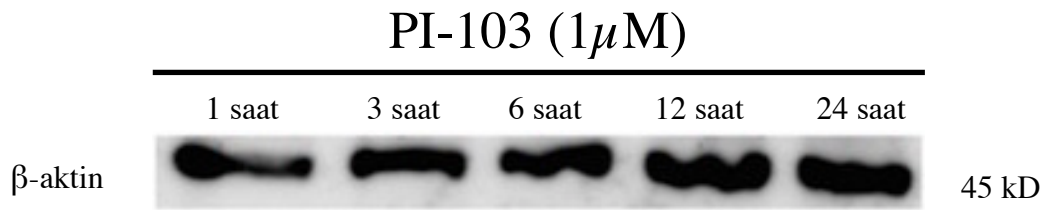
Tablo 4.2. Daha önce hazırlanan protokole göre jel hazırlamak için kullanılan çözelti miktarları

%10 Yürütme Jeli (2 Jel için)	%5 Yükleme Jeli (2 Jel için)
dH ₂ O → 5,9 ml	dH ₂ O → 4,2 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid → 5 ml	%30 Akrilamid/Bisakrilamid → 1 ml
1,5 M Tris pH=8,8 → 3,8 ml	0,5 M Tris pH=6,8 → 760 µl
%10 SDS → 150 µl	%10 SDS → 60 µl
%10 APS → 150 µl	%10 APS → 60 µl
TEMED → 6 µl	TEMED → 6 µl

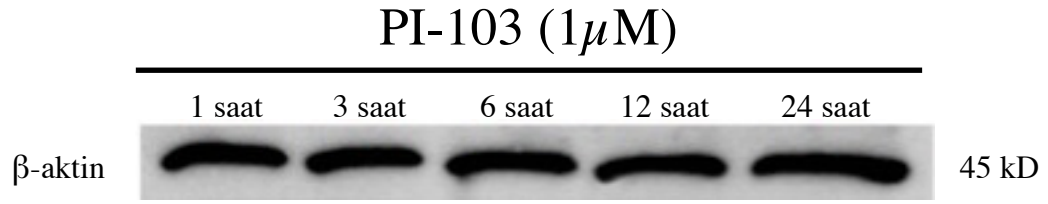
Tablo 4.3. Yeni protokole göre jel hazırlamak için kullanılan çözelti miktarları

%10 Yürütme Jeli (2 Jel için)	%4 Yükleme Jeli (2 Jel için)
dH ₂ O → 6,03 ml	dH ₂ O → 9 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid → 5 ml	%30 Akrilamid/Bisakrilamid → 1,98 ml
1,5 M Tris pH=8,8 → 3,75 ml	0,5 M Tris pH=6,8 → 3,78 ml
%10 SDS → 150 µl	%10 SDS → 150 µl
%10 APS → 75 µl	%10 APS → 75 µl
TEMED → 7,5 µl	TEMED → 15 µl

Eski protokole göre hazırlanan jelde yürütülen ve transfer sonrası görüntülenen membranlarda bantların protein bantlarının kalitesi yetersiz bulundu (Şekil 4.18). Modifiye edilen protokole göre hazırlanan jellerde protein bantları başarı ile görüntülendi (Şekil 4.19). Bu aşamadan sonra tüm deneyler optimize protokol uygulanarak yapıldı.



Şekil 4.18. Daha önce uygulanan *Western blot* protokolü ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü

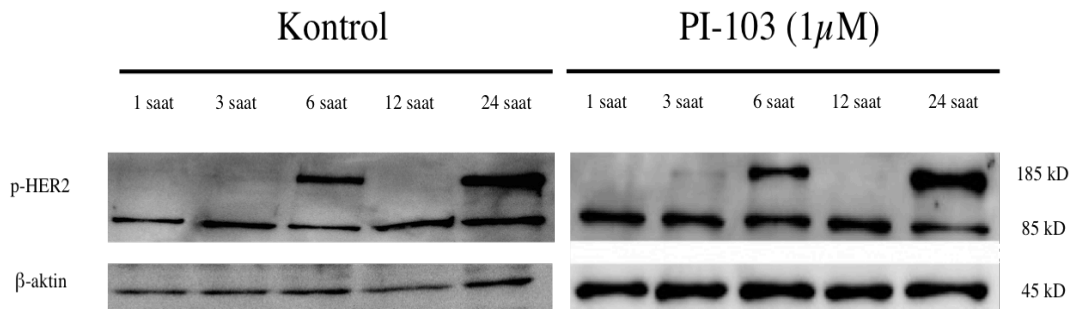


Şekil 4.19. Modifiye protokol ile hazırlanan jelde protein bantlarının görüntüsü

4.5 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI3K Yolağının PI-103 Dual İnhibitörü ile Farmakolojik İnhibisyonunun Zamana Bağlı Olarak p-HER2 Ekspresyonuna Etkisi

SKBR-3 hücreleri 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süre ile 1 μ M PI-103 ile inkübe edilerek p-HER2 ekspresyonları kontrol hücreleri ile *Western blot* yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Yükleme kontrol olarak kullanılan β -aktin, protein bantları ile normalize edildi. Her koşul için 3 bağımsız deney yapıldı. Hücrelerin p-HER2 ekspresyon düzeylerinde görülen değişimleri *bağımsız gruplar student's t* testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi (Şekil 4.20) (Tablo 4.4).

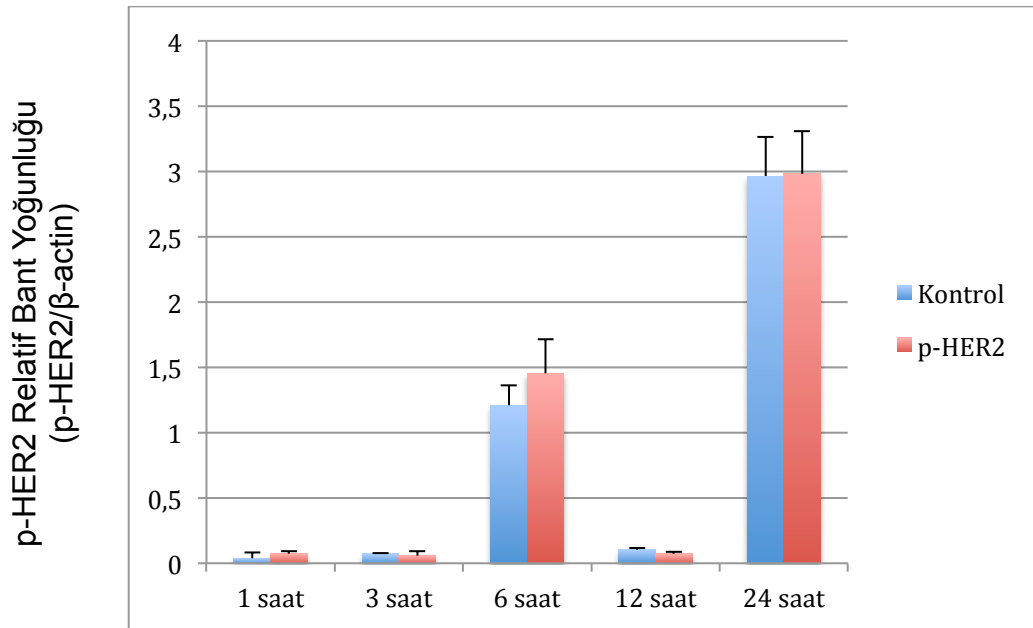
Analiz sonucu, kontrol hücreleri ile zamana bağlı olarak PI-103 ile inkübe edilmiş hücreler arasında p-HER2 ekspresyonları düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediği belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER2 ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.4. SKBR-3 hücre dizinde p-HER2 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (p-HER2 (185 kDa)/ β -aktin) (n=3)

İnkübasyon süresi	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SH	
	Kontrol	PI-103 ile inkübasyon
1 saat	0,03967 \pm 0,0204	0,074 \pm 0,042
3 saat	0,0715 \pm 0,0321	0,058 \pm 0,008
6 saat	1,21 \pm 0,26	1,454 \pm 0,154
12 saat	0,1036 \pm 0,0175	0,071 \pm 0,011
24 saat	2,965 \pm 0,189	2,983 \pm 0,3



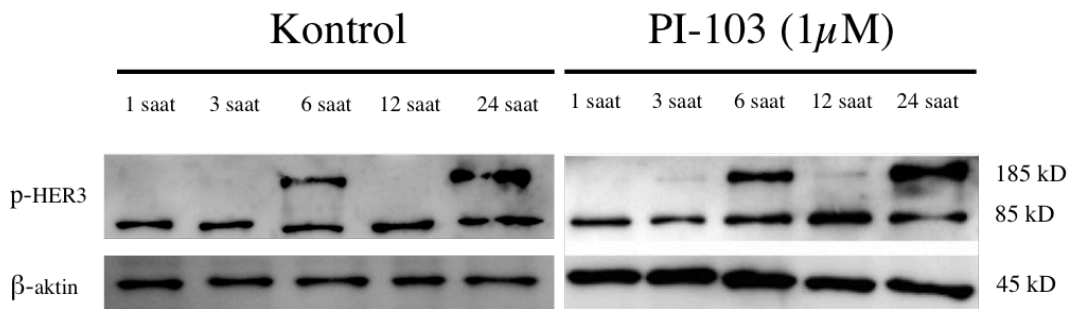
Şekil 4.21. SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER2 relatif bant yoğunluğuna etkisi (p-HER2 (185 kDa)/ β -aktin) (+SH)

4.6 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI3K Yolağının PI-103 Dual İnhibitörü ile Farmakolojik İnhibisyonunun Zamana Bağlı Olarak p-HER3 Ekspresyonuna Etkisi

SKBR-3 hücreleri 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süre ile PI-103 ile inkübe edilerek p-HER3 ekspresyonları kontrol hücreleri ile *Western blot* yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı. Yükleme kontrol olarak kullanılan β -aktin, protein bantları ile normalize edildi. Her koşul için 3 bağımsız deney yapıldı. Hücrelerin p-HER3 ekspresyon düzeylerinde görülen değişimleri *bağımsız gruplar student's t* testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi (Şekil 4.22) (Tablo 4.5).

Analiz sonucu, kontrol hücreleri ile zamana bağlı olarak PI-103 ile inkübe edilmiş hücreler arasında p-HER3 ekspresyonları düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediği belirlendi ($p>0,05$) (Şekil 4.23).

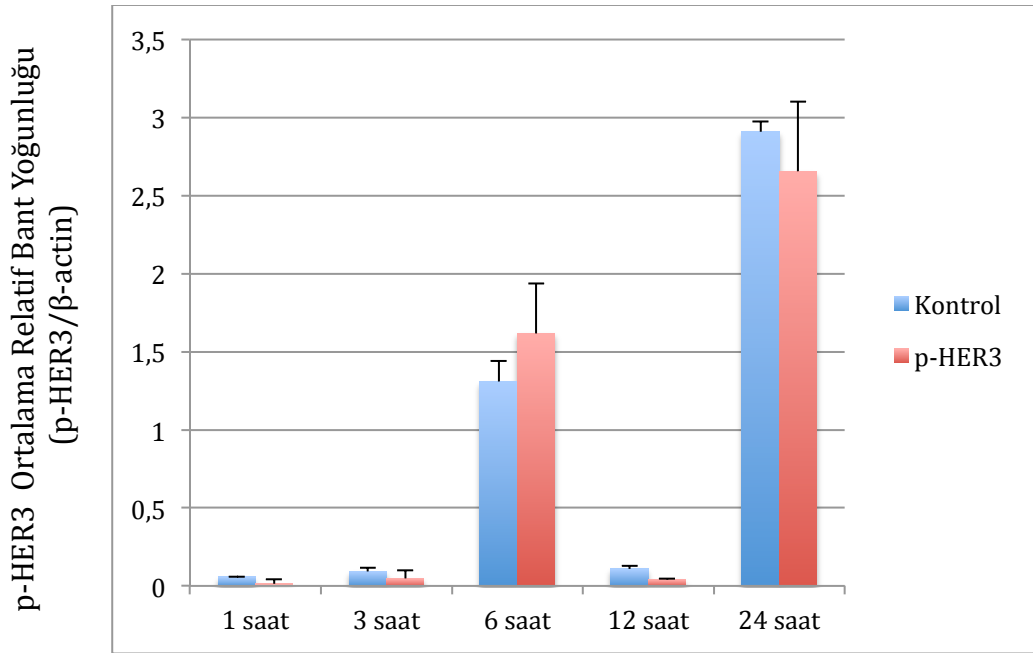
SKBR-3 hücrelerinin 6 ve 24 saatlik ilaç bağımlı ve bağımsız inkübasyonlar sonucu, p-HER2 ve p-HER3 protein ekspresyonlarının çift bant paterni (185 kDa ve 95 kDa) göstermesi dikkat çekti (Şekil 4.24).



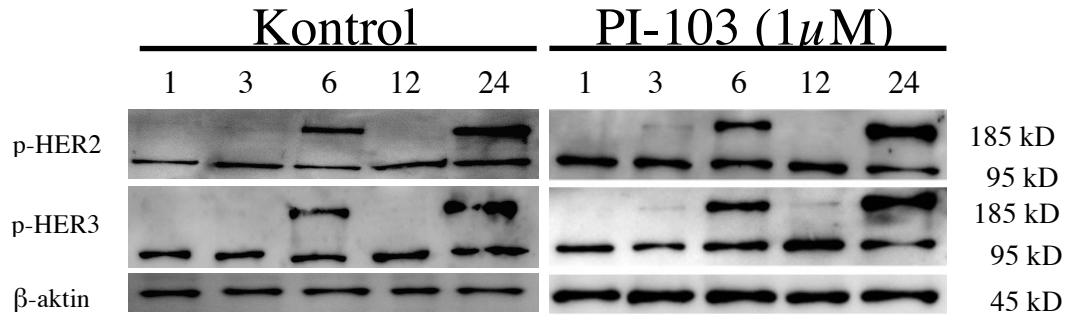
Şekil 4.22. SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER3 ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.5. SKBR-3 hücre dizinde p-HER3 ekspresyonuna ait relatif bant yoğunluğu (p-HER3 (185 kDa)/ β -aktin) (n=3)

İnkübasyon süresi	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SH	
	Kontrol	PI-103 ile inkübasyon
1 saat	0,0577 \pm 0,029	0,0125 \pm 0,003
3 saat	0,093 \pm 0,053	0,0484 \pm 0,0247
6 saat	1,31 \pm 0,32	1,617 \pm 0,131
12 saat	0,109 \pm 0,005	0,0427 \pm 0,021
24 saat	2,91 \pm 0,445	2,657 \pm 0,067



Şekil 4.23. SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER3 relatif bant yoğunluğuna etkisi (p-HER3 (185 kDa)/ β -aktin) (+SH)



Şekil 4.24. SKBR-3 hücre dizinde PI-103 dual inhibitörünün zamana bağlı olarak inkübasyonunun p-HER2 ve p-HER3 ekspresyonuna etkisi

5. TARTIŞMA

Meme kanserinde, en güçlü onkojenik sinyal iletimi mekanizmalarından biri PI3K/Akt/mTOR yolağının kontrolsüz aktivasyonudur. Bu kontrolsüz aktivasyon, ErbB ailesi reseptörlerinin ekspresyonunda artış (EGFR, HER2, HER3), PI3K'ı kodlayan PIK3CA geninde mutasyon, Akt ekspresyonu/aktivitesinde artış ve/veya PTEN'in inaktivasyonu ile oluşabilir [97]. Buna bağlı olarak, kanser hücreleri kontrolsüz olarak çoğalmakta ve sağkalım oranları artmaktadır [8, 123]. Meme kanseri hastalarının yaklaşık olarak %25'inde HER2 'nin aşırı ekspresyonu ile karşılaşmaktadır [49].

ErbB ailesi üyelerinin aktivasyonları ile birlikte hücrenin migrasyon, proliferasyon ve sağkalım süreçlerinde rol oynayan PI3K/Akt/mTOR, MAPK/ERK ve JAK/STAT sinyal yolaklarının stimülasyonu gerçekleşmektedir. Sinyal aktivitesi diğer dimerlere oranla daha yüksek olan HER2/HER3 heterodimer formunun HER3 sitoplazmik domaini kuvvetli olarak PI3K/Akt/mTOR yolağını aktive ederken, HER2'nin sitoplazmik domaini diğer heterodimer formları oluştuğunda MAPK/ERK yolağını da aktive etmektedir. PI3K ve ERK yolaklarının konstütif aktivasyonları kanser hücrelerinin apoptozdan kaçışına da yol açmaktadır [46, 54, 124]. Konvansiyonel tedavi yöntemleri arasında kemoterapiyle birlikte HER2 reseptörünü hedefleyen ajanlar da kullanılmaktadır. Bu ajanlara, trastuzumab ve pertuzumab antikoru ile tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib örnek verilebilir. Ancak, anti-HER2 monoklonal antikor ve/veya tirozin kinaz inhibitör uygulandığında, kanser hücrelerinin ajanın etkisini telafi eden mekanizmalar geliştirmesi önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır [54, 114, 125].

Çalışmamızda, HER2 ekspresyonu artmış olan SKBR3 meme kanseri hücreleri *in vitro* model olarak seçildi. SKBR3 hücre dizisi, özellikleri itibariyle PI3K/Akt sinyaline bağımlı hücre dizileri arasındadır [7]. Bu hücrelerin, PIK3CA ve PTEN mutasyonu taşıyamamaları da dikkate alınarak, HER2/HER3 heterodimeri aracılı PI3K/Akt/mTOR yolağının PI-103 ile dual olarak inhibisyonu hedeflendi ve olası sinyal yolağı re-aktivasyonu

fosfoprotein (fosfo-RTK) düzeylerine bakılarak araştırıldı. HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarında ilaç aracılı indüksiyon olup olmadığı ise, PI-103'ün etkisi AKTi ve Rapamisin ile karşılaştırılarak incelendi.

Çalışmamızda, ilk aşamada, farklı inhibitörlerin SKBR3 hücrelerinde transkripsiyonel düzeyde HER2 ve HER3 indüksiyonuna etkileri zamana bağlı olarak incelendi. Bu amaçla, PI-103 dual inhibitörü, AKTi ve Rapamisin ajanları karşılaştırıldı. AKTi ve Rapamisin dozu literatürden yararlanılarak seçildi [14]. PI-103 dozunun literatür ile uyumlu olduğu daha önce laboratuvarımızda gösterildi [126].

Çalışmamızda, 50 nM Rapamisin ile muamele edilen hücrelerde 24 saat süreli inkübasyon sonrasında HER3 ve HER2 mRNA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı saptandı. SKBR3 hücrelerinde 25 nM Rapamisin dozu ile 48 saat inkübasyonun anlamlı düzeyde transkript artışı yaratmaması [127], saptadığımız etkinin doza bağlı olduğuna işaret etmektedir. Diğer taraftan, HER2⁺ özellikteki BT474 hücrelerinde 50 nM Rapamisin ile 48 saat süreli inkübasyonun HER2 ve HER3 ekspresyonunu etkilememesi ise, Rapamisin etkisinin hücre tipine özgül olduğunu da göstermektedir [14]. SKBR3 hücrelerinde Rapamisin ile HER3 translasyonunun indüklendiği ve bu etkinin eIF4E (ökaryotik inisiyasyon faktörü 4E) proteininin kompensatuvar olarak aktivasyonuna bağlı olduğu bilinmektedir. SKBR3 hücrelerinde düşük dozda (25 nM) rapamisin ile 72 saat kararlılık gösteren mTOR sinyali inhibisyonu (fosfo-S6 oluşumunun tam inhibisyonu) olmasına karşın, translasyonun tetiklenmesi dikkat çekicidir [127]. Çalışmamızda saptadığımız, doza bağlı olarak RTK'ların transkripsiyonel aktivasyonu ise, sinyal yolağının Rapamisin ile mTOR seviyesinde inhibisyonunun HER2⁺ kanser hücrelerinde telafi edilebilen bir süreç olduğunu destekleyici niteliktedir. SKBR3 hücrelerinde, Rapamisin ile hem HER2 ve HER3 transkripsiyonunda hem de translasyonunda artış olması, PI3K/Akt/mTOR yolağının inhibisyonu için tercih edilmemesi gerektiği yönündeki kanaati güçlendirmektedir. Zira, HER2⁺ meme kanseri hücrelerinde optimal antitümöral etki için HER3'ün kalıcı ve tam inhibisyonunu sağlamak gerekmektedir [128]. SKBR3 hücrelerinde, HER2

tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinib'in HER3 promotor aktivitesini dört misli arttırdığı bilinmektedir. Buna göre, lapatinib aracılı HER3 transkript düzeyinin artışından kısmen transkripsiyonun aktivasyonu sorumludur. Bu artıştan, SKBR3 hücrelerinde miR106b miktarının azalması ve HER3 transkript stabilitesinin artması da sorumlu tutulmaktadır [127]. Çalışmamızda, Rapamisin aracılı HER2 ve HER3 ekspresyonu artışına ilişkin olarak mekanizmaya yönelik inceleme bulunmamaktadır.

PI-103 dual inhibitörü, SKBR3 hücrelerinde hem PI3K hem de mTOR seviyesinde, tersinir inhibisyon yapmaktadır. Laboratuvarımızda, daha önce, bu tersinir inhibisyon süresinin altı saat olduğu gösterildi [21]. Bununla uyumlu olarak, aynı dozda (1 μ M) ajanın 8 ve 24 saat süre ile inkübasyonunun HER2 ve HER3 transkripsiyonunun indüksiyonuna yol açmadığı gösterildi. Buna göre, iki inhibitörün karşılaştırılması ile varılan nokta, Rapamisin ile elde edilen kararlı sinyal inhibisyonunun bedelinin transkripsiyonel aktivasyon olması, ancak dual etkili PI-103 'ün de böyle bir etki yapmamakla beraber, kararlı bir sinyal inhibisyonu oluşturamamasıdır.

Çalışmamızda, AKTi ajanı ile yine HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmedi. Bu bulgumuz, BT474 hücrelerinde gözlenen etki ile benzer nitelikte idi [14]. SKBR3 hücrelerinde FOXO3a transfeksiyonu ile yapılan deneyler, HER3'ün transkripsiyonel aktivasyonunun tetiklenmesinin bu transkripsiyon faktörü ile ilişkisini doğrulamaktadır [128]. Dolayısıyla, bizim deneylerimizde, Akt inhibisyonunun öngörülen RTK ekspresyonu artışını ortaya koyamaması, bazal FOXO3a düzeyinin yeterli düzeyde promotor aktivasyonu sağlayamaması yönünde yorumlanabilir.

HER2, HER3'ü fosforile eden temel kinazdır. Fosforile olan HER3'ün PI3K'in p85 altbirimi ile etkileşimi ise HER2+ kanser hücreleri için esansiyeldir. HER2⁺ hücreler, Lapatinib ile inkübe edilmeleri halinde HER3 protein düzeyi tetiklenmektedir. Daha sonra da, rezidüel HER2 kinaz aktivitesi ile HER3 fosforilasyonu sağlanmaktadır. Bu tablo, sonuç olarak PI3K yolağı inhibisyonunun gücünü sınırlamaktadır [128, 129]. Dolayısıyla,

HER2, PI3K, Akt ve mTOR gibi yolağın önemli proteinlerini tek ajan ile inhibe etmek, hücre içinde kompanzasyon mekanizmalarını uyarabilmektedir [130]. Bu nedenle, çalışmamızın ikinci aşamasında, sinyal yolağının dual etkili PI-103 ile hedeflenmesinin, RTK ekspresyonu ve aktivasyonunda kompensatuvar etki yapıp yapmadığı araştırıldı.

Anabilim Dalımızda daha önce yapılan çalışmada, SKBR-3 hücrelerinde, PI-103'ün zamana bağlı etkisi incelendi. Bu çalışmada, PI-103'ün yolak aktivasyonunu kısa süreli olarak inhibe ettiği gösterildi. Bu deneylerde, total HER2 ve total HER3 protein ekspresyonlarında anlamlı bir fark izlenmedi [21].

Çalışmamızda, SKBR-3 hücrelerinde PI-103'ün sağladığı inhibisyon ve yeniden aktivasyonun, p-HER2 ve p-HER3 (aktive RTK) ekspresyonları üzerine etkisi incelendi. Deneylerde, 1 µM PI-103 dozu ve ilaç ile inkübasyon süreleri değiştirilmeden uygulandı.

SKBR-3 hücrelerinin 1-3-6-12-24 saat 1 µM PI-103 ile inkübasyonu sonucu, ilaç ile inkübe edilmeyen kontrol hücreleri ile p-HER2 ve p-HER3 ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmediği tespit edildi (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23). Bulgularımız, SKBR-3 hücrelerinde, PI3K/Akt/mTOR yolağının, kısa süreli ve tersinir inhibisyonu ile uyumlu bulundu. Rapamisin'in mTORC1'in inhibisyonuna bağlı olarak S6K1 tarafından sağlanan negatif geribildirim mekanizmasını inhibe ettiği ve buna bağlı olarak da RTK aktivasyonunun tetiklendiği bilinmektedir [14]. Chandarlapaty ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, kullanılan monoterapötik ajanların onkogenler tarafından hiperaktivasyonu sağlanan sinyal yolağı negatif geribildirim mekanizmasını inhibe etmesi sebebiyle yolak re-aktivasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir [14]. Akt molekülünün AKTi tarafından inhibisyonu ile FOXO aracılı RTK ekspresyonunun indüklenmesi söz konusudur. mTOR'un hedeflenmesi ile ortadan kalkan negatif geri bildirim mekanizmasının Akt re-aktivasyonu ile sinyal iletiminin kompanzasyonunu sağladığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [6, 14]. Çalışmamızda ise, PI-103 ile oluşan 6

saatlik inhibisyonun HER2 ve HER3'ün translasyonunun tetiklenmesine yol açacak güce ulaşmadığına kanaat edildi. Bu etki, rezidüel HER2-HER3 etkileşimine yol açmayacağı için avantaj olarak görülebilir. Ancak, dual inhibisyon sonrası, yolak aktivitesinin de kısa sürede geri kazanıldığı akılda tutulmalıdır.

Sinyal yolağının dual etkili PI3K/mTOR inhibitörleri ile hedeflenmesi sonrası yolağın inaktive olması hücrelerin RTK aktivasyonuna yol açmaması yönüyle dikkate değer bulunmaktadır [112, 131]. Zira, sinyal yolağının re-aktivasyonu antitümöral etkiyi önemli ölçüde sınırlamaktadır [14]. Kolorektal kanser modelinde yapılan bir çalışmada, dual PI3K/mTOR inhibitörü ile selektif PI3K inhibitörünün kombine edilerek daha kuvvetli bir etki elde edilmesi savunulmaktadır [132]. PI-103'ün metabolize formu olan glukoronidin hızlı bir şekilde mikrozomlar tarafından uzaklaştırıldığı fare modelleriyle yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [133]. PI-103'ün bir saatlik inhibisyonundan sonra Akt'nin, re-aktive olduğunu bildiren sonuçlar da bulunmaktadır [134]. Bu durum, PI-103'ün yarı ömrünün kısa olması ve hızlı bir şekilde metabolize olup hücreden temizlenmesinden kaynaklı olabilir. PI-103 ile ilgili prelinik çalışmalar, yapısal, farmakodinamik ve farmakokinetik modifikasyon modelleri üzerinde odaklanmaktadır.

R. Weinstein'in 2002 yılında ortaya koyduğu, kanser hücresinin 'onkogen bağımlılığı' kavramı, kanser hücresinin malignant fenotipini ve sağkalımını idame ettirmesi için bir veya birden fazla onkogeni sürekli olarak aktif tutmasını gerektigine dayanmaktadır [135]. ErbB'ye yönelik hedefli terapilerin ilerleyen aşamalarında kanser hücreleri, kullanılan ajanlara karşı direnç geliştirmektedir. HER2 amplifikasyonu olan kanserlerde, HER2'nin trunkasyona uğramış p95HER2 fragmenti, HER2 ile glikolize olmuş ve birlikte eksprese olan spesifik mucin izoformu veya HER2'nin 16. ekzon bölgesinde delesyona uğramış varyantı olan Δ -HER2 ekspresyonuna rastlanılmaktadır. Buna göre, HER2⁺ meme kanserinde kullanılan trastuzumab, pertuzumab ve T-DM1 gibi ajanlara karşı kanser hücresinin direnç göstermesi mümkün olmaktadır [49]. HER2'nin hücre dışı domaini ADAM10 metalloproteaz enzimi tarafından proteolitik kesime uğradıktan sonra hücre membranından ayrılır.

Trastuzumab HER2'nin hücre dışı domaini ile etkileşebilen monoklonal antikordur; dolayısıyla, bu hücreler hücre membranına asosiyel olan p95HER2 karboksi-terminal fragmenti sinyal yolağı aktivasyonunu sürdürebilmektedir [108, 136]. Δ -HER2 varyant ekspresyonunda ise, 16. ekzon bölgesindeki delesyondan ötürü sistein rezidülerinde oluşan dengesizlik HER2'nin homodimer yapı oluşturmasını sağlamakta ve bu durum homodimer aktivasyonunun ligand bağımsız olarak gerçekleşmesini sağlamaktadır [54, 59, 137]. Ayrıca, 'bypass mekanizması' aracılığı ile, tirozin kinaz inhibitörleri ile baskılanan primer reseptör kinaz aracılı sinyal yolağı aktivasyonunun, farklı bir sekonder reseptör kinaz aktivasyonu ile kompanse edilmesi de dirençli cevap oluşumunu tetikleyebilir [138]. Dolayısıyla, kanser hücresi farklı regülasyon mekanizmalarını aktive ederek malign fenotipini korumakta ve sağkalımını sürdürmektedir.

Çalışmamızda, PI-103 ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinin p-HER2 ve p-HER3 protein bantları 90-100 kDa ve 185 kDa olmak üzere çift bant olarak tespit edildi (Şekil 4.22). 185 kDa ağırlığında olan bantların p-HER2 ve p-HER3 ekspresyonlarını göstermektedir. 90-100 kDa ağırlığında olan p-HER2 bantlarının ise HER2'nin p95 karboksi-terminal hücre içi fragmenti olabileceği düşünülmektedir. Bu verilerimiz literatürdeki çalışmalar ile uyumludur [108, 139]. Literatürde, p-HER3'ün 90-100 kDa ağırlığında olan herhangi bir izoformu bildirilmemekle beraber bazı çalışmalarda çift bant görünümü dikkat çekmektedir [105].

Çalışmamızda, PI-103 ile inkübe edilmeyen SKBR-3 hücrelerinde 6. ve 24. saatlerde p-HER2 ve p-HER3 protein ekspresyonları (185 kDa) izlendi. Bu ekspresyonların spontan aktivasyon olduğuna kanaat edildi. PI-103 ile inkübe edilen hücrelerde bu ekspresyon paterni değişmedi. Bu sonuçlara göre, p-HER3 protein ekspresyon paterninin p-HER2 paterni ile uyumlu olması HER-2 kinaz aktivitesini doğrular niteliktedir. Ancak, kontrol hücrelerinde 6 ila 24 saat arasında fosfo-RTK ekspresyonunun kaybolmasının hangi mekanizma ile ortaya çıktığını henüz bilmemekle beraber, bu ekspresyon paterninin ilaçtan (PI-103) bağımsız olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, çalışmamızda SKBR-3 meme kanseri hücre dizilerinde PI-103'ün fosfo-reseptör tirozin kinaz ekspresyonları ve total reseptör tirozin kinaz mRNA ekspresyonları üzerindeki zamana bağlı etkisi ilk kez incelendi;

1. PI3K/mTOR dual inhibitörü olan PI-103'ün, HER2⁺ meme kanseri hücre dizisi olan SKBR-3 hücreleri üzerinde zamana bağlı olarak p-HER2 ve p-HER3 protein ekspresyonlarında inhibitör etkisinin olmadığı saptandı.
2. PI3K/mTOR dual inhibitörü olan PI-103'ün ve Akt inhibitörü olan AKTi'nin, HER2⁺ meme kanseri hücre dizisi olan SKBR-3 hücreleri üzerinde zamana bağlı olarak HER-2 ve HER-3 mRNA ekspresyonlarında artışa yol açtığı fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.
3. mTOR inhibitörü olan Rapamisin'in, HER2⁺ meme kanseri hücre dizisi olan SKBR-3 hücreleri üzerinde zamana bağlı olarak HER-2 ve HER-3 mRNA ekspresyonlarında artışa yol açtığı ve 24 saatlik ilaç inkübasyonu sonucunda oluşan artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi.

Tüm bu bilgiler ışığında, hücrede oluşan direnç mekanizmalarını anlamak ve uygulanacak tedavilerin daha efektif sonuçlar vermesi adına güncel olarak farklı stratejiler denenmektedir. Bunların başında tirozin kinaz inhibitörleriyle birlikte yolak inhibitörlerinin ikili veya üçlü kombinasyonlarının tümör regresyonuna ve ortalama sağkalıma olan etkilerinin incelenmesi gelmektedir [125, 140]. Kombine tedavilerin dışında farklı hedeflere yönelik stratejilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Örnek olarak, intrinsik kinaz aktivitesi açısından defekti olan HER3 yakın tarihe kadar potent bir hedef olarak görülmemesi ancak zamanla bazı direnç mekanizmalarının HER3 üzerinden geliştiğinin anlaşılması sonucu HER3'ün yeni çalışmaların odaklanacağı yeni hedef olarak görülmektedir [60, 141, 142]. Bunların dışında ileriye dönük olarak, tüm genom sekans analizleri sayesinde kişiye özgü bireysel tedavilerin geliştirilmesi, kanser heterojenitesini baz alarak geliştirilen sıvı biyopsi ile tanımlanan lokal kanser hücreleri karakterlerine özgü tedavilerin geliştirilmesi, immünoterapilerin geliştirilmesi ve kanser kök

hücresi olgusuna yönelik geliştirilecek tedaviler ile kanser patogenezinin karşı umut vaat eden çalışmaların geliştirilmesi hedeflenmektedir [124, 143-145].

Bu tez çalışmasında, SKBR-3 insan meme kanseri hücre dizisinde, PI-103 ile zamana bağlı olarak PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı inhibisyonunun, p-HER2 ve p-HER3 protein ekspresyonlarına etki etmediği ilk kez gösterildi. Ayrıca, PI-103'ün HER2 ve HER3 mRNA ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı olarak değiştirmedeği saptandı.

Sonuç olarak, HER2⁺ meme kanserinde, PI-103 ile sinyal inhibisyonunun tersinir olması, dual inhibitör etkili bu ajanın ancak monoklonal antikörler ile birlikte kullanımı halinde potent ve kararlı etki oluşturacağına işareti etmektedir. PI-103'ün, RTK ekspresyonunu ve aktivitesini tetiklememesi ise, Akt inhibitörü ve Rapamisin ile kıyaslandığında, meme kanserinde hedeflenmiş tedaviler açısından stratejik önem taşıyabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. SKBR-3 meme kanseri hücre dizisinde p-HER2 ve p-HER3 ekspresyonu analizleri için *Western blot* yöntemi optimize edildi.
2. PI-103'ün zamana bağlı etkisini incelemek için, farklı süreler ile (0-1-3-6-12-24 saat) ilaç uygulaması yapıldı.
3. Tüm koşullarda p-HER2 ve p-HER3 proteinlerinin düzeyleri *Western blot* yöntemi ile incelendi.
 - SKBR-3 meme kanseri hücrelerinde p-HER2 ve p-HER3 aktive sinyal proteinlerinin PI3K/mTOR dual inhibitörü olan PI-103'e bağlı olarak ekspresyon değişikliği göstermediği saptandı.
 - Laboratuvarımızda daha önce, SKBR-3 meme kanseri hücrelerinde total HER2 ve total HER3 proteinlerinin PI-103'e bağlı olarak ekspresyon değişikliği göstermediği saptandı.
4. Eş zamanlı PZR tekniği kullanılarak (0-8-24) saat süre ile PI-103, AKTi ve Rapamisin ile inkübasyon yapıldı. Bu ajanların HER2 ve HER3 mRNA düzeylerine etkisi karşılaştırıldı.
 - PI-103'ün ve AKTi'nin, SKBR-3 hücreleri üzerinde zamana bağlı olarak HER-2 ve HER-3 mRNA ekspresyonlarında artışa yol açtığı fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı.
 - Rapamisin'in, SKBR-3 hücreleri üzerinde zamana bağlı olarak HER-2 ve HER-3 mRNA ekspresyonlarında artışa yol açtığı ve 24 saatlik ilaç inkübasyonu sonucunda oluşan artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi.
5. Yapılmış olan çalışmalara ek olarak, PI3K/mTOR dual inhibitörü olan PI-103'ün, FOXO ekspresyonuna ve mTORC aracılı negatif geri bildirim mekanizması ile tetiklenen IRS-1 ekspresyonuna etkisi kontrol edilebilir.
6. PI-103 inkübasyonu sonrası ADAM metalloproteaz grubu ekspresyonlar incelenerek RTK'ların trunk e izoformları, mucin glikolize formu ve RTK varyantlarının incelenmesi ile post-trankripsiyonel, lokalize ve post-translasyonel direnç mekanizmaları araştırılabilir.

7. PI3K/mTOR dual inhibitörü olan PI-103'ün apoptotik basamakta rol oynayan BAD ve Bcl-2 ekspresyonları incelenmesi ile ilacın apoptoz üzerindeki etkisi incelenebilir.
8. PI3K/Akt/mTOR yolağının tam inhibisyonunu sağlamak amacıyla dual inhibitörler, tirozin kinaz inhibitörleri kombine edilebilir.
9. Ksenograft fare modelleri üzerinde, PI3K/mTOR dual inhibitörü olan PI-103'ün etkisi ile birlikte tümör mikroçevresinin sinyal mekanizmasına ne yönde etki ettiği araştırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Ghayad SE, Cohen PA: Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 2010, 5(1):29-57.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman DD, Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014.
3. Mohd Shariq MS, Crown J, Hennessey BT: Overcoming resistance and restoring sensitivity to HER2-targeted therapies in breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2012, 23(12):3007-3016.
4. Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM: Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *The oncologist* 2011, 16(4):404-414.
5. Lemmon MA, Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010, 141(7):1117-1134.
6. Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, Poulikakos PI, Scaltriti M, Moskatel E, Baselga J, Guichard S, Rosen N: mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer discovery* 2011, 1(3):248-259.
7. She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR, DeFeo-Jones D, Huber HE, Rosen N: Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PloS one* 2008, 3(8):e3065.
8. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA: The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010, 28(6):1075-1083.

9. Torbett NE, Luna-Moran A, Knight ZA, Houk A, Moasser M, Weiss W, Shokat KM, Stokoe D: A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. *The Biochemical journal* 2008, 415(1):97-110.
10. Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews Cancer* 2002, 2(7):489-501.
11. Hynes NE, Gullick W: Therapeutic targeting of signal transduction pathways and proteins in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2006, 11(1):1-2.
12. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, Dancey JE, Piccart-Gebhart MJ: Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer treatment reviews* 2013, 39(8):935-946.
13. Burris HA, 3rd: Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2013, 71(4):829-842.
14. Chandralapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder PK, Baselga J, Rosen N: AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer cell* 2011, 19(1):58-71.
15. Holbro T, Hynes NE: ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2004, 44:195-217.
16. Baselga J, Swain SM: Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature reviews Cancer* 2009, 9(7):463-475.
17. Guertin DA, Sabatini DM: Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell* 2007, 12(1):9-22.

18. Kong D, Yamori T: Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer science* 2008, 99(9):1734-1740.
19. Yi YW, Kang HJ, Kim HJ, Hwang JS, Wang A, Bae I: Inhibition of constitutively activated phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway enhances antitumor activity of chemotherapeutic agents in breast cancer susceptibility gene 1-defective breast cancer cells. *Molecular carcinogenesis* 2012.
20. Fan QW, Knight ZA, Goldenberg DD, Yu W, Mostov KE, Stokoe D, Shokat KM, Weiss WA: A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer cell* 2006, 9(5):341-349.
21. Tunalı G: **Meme kanseri hücre dizilerinde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı inhibisyonunun reseptör tirozin kinazların ekspresyonuna etkisi.** Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2012.
22. Rakha EA, Ellis IO: Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology* 2009, 41(1):40-47.
23. Cancer Genome Atlas N: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012, 490(7418):61-70.
24. Rupninder Sandhu M, Joel S. Parker, MS, Wendell D. Jones, PhD, Chad A. Livasy, MD, William B. Coleman, PhD: Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *LABMEDICINE* 2010, 41(6):364-372.
25. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C: A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *The EMBO journal* 2013, 32(5):617-628.
26. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100(1):57-70.
27. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5):646-674.

28. Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM: The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer metastasis reviews* 2010, 29(4):751-759.
29. Chen S, Parmigiani G: Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007, 25(11):1329-1333.
30. Dixon K, Kopras E: Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in cancer biology* 2004, 14(6):441-448.
31. Wilson EO: *Membranes, Transport and Signaling*; 2014.
32. Blume-Jensen P, Hunter T: Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001, 411(6835):355-365.
33. Robinson DR, Wu YM, Lin SF: The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000, 19(49):5548-5557.
34. Hunter T: The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 1998, 353(1368):583-605.
35. Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000, 103(2):211-225.
36. Hubbard SR: Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progress in biophysics and molecular biology* 1999, 71(3-4):343-358.
37. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter: *Molecular Biology of The Cell*, 5th edn; 2007.
38. Hubbard SR, Mohammadi M, Schlessinger J: Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(20):11987-11990.
39. Hubbard SR, Miller WT: Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current opinion in cell biology* 2007, 19(2):117-123.

40. Jiang G, Hunter T: Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Current biology : CB* 1999, 9(15):R568-571.
41. Choura M, Rebai A: Receptor tyrosine kinases: from biology to pathology. *Journal of receptor and signal transduction research* 2011, 31(6):387-394.
42. Li E, Hristova K: Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies. *Biochemistry* 2006, 45(20):6241-6251.
43. Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E, Menard S: Role of HER receptors family in development and differentiation. *Journal of cellular physiology* 2004, 200(3):343-350.
44. Wells A: EGF receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1999, 31(6):637-643.
45. Cohen S, Levi-Montalcini R: Purification and properties of a nerve growth-promoting factor isolated from mouse sarcoma 180. *Cancer research* 1957, 17(1):15-20.
46. Yarden Y, Pines G: The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature reviews Cancer* 2012, 12(8):553-563.
47. Savage CR, Jr., Inagami T, Cohen S: The primary structure of epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry* 1972, 247(23):7612-7621.
48. Cohen S, Carpenter G: Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975, 72(4):1317-1321.
49. Arteaga CL, Engelman JA: ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer cell* 2014, 25(3):282-303.

50. Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001, 2(2):127-137.
51. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd: Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, 91(17):8132-8136.
52. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO journal* 2000, 19(13):3159-3167.
53. Eccles SA: The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *The International journal of developmental biology* 2011, 55(7-9):685-696.
54. Hynes NE, MacDonald G: ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current opinion in cell biology* 2009, 21(2):177-184.
55. Hynes NE, Lane HA: ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews Cancer* 2005, 5(5):341-354.
56. Bassiri M, Privalsky ML: Mutagenesis of the avian erythroblastosis virus erbB coding region: an intact extracellular domain is not required for oncogenic transformation. *Journal of virology* 1986, 59(2):525-530.
57. Bacus SS, Ruby SG, Weinberg DS, Chin D, Ortiz R, Bacus JW: HER-2/neu oncogene expression and proliferation in breast cancers. *The American journal of pathology* 1990, 137(1):103-111.
58. Ross JS, Fletcher JA: The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *The oncologist* 1998, 3(4):237-252.
59. Hynes NE, Dey JH: PI3K inhibition overcomes trastuzumab resistance: blockade of ErbB2/ErbB3 is not always enough. *Cancer cell* 2009, 15(5):353-355.

60. Gala K, Chandarlapaty S: Molecular pathways: HER3 targeted therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014, 20(6):1410-1416.
61. Amin DN, Campbell MR, Moasser MM: The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. *Seminars in cell & developmental biology* 2010, 21(9):944-950.
62. Roskoski R, Jr.: The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2014, 79:34-74.
63. Jaiswal BS, Kljavin NM, Stawiski EW, Chan E, Parikh C, Durinck S, Chaudhuri S, Pujara K, Guillory J, Edgar KA *et al*: Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer cell* 2013, 23(5):603-617.
64. Sun Y, Thapa N, Hedman AC, Anderson RA: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: targeted production and signaling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2013, 35(6):513-522.
65. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M: PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews* 2004, 30(2):193-204.
66. Wymann MP, Marone R: Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Current opinion in cell biology* 2005, 17(2):141-149.
67. Gaidarov I, Smith ME, Domin J, Keen JH: The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Molecular cell* 2001, 7(2):443-449.
68. Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M: Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends in pharmacological sciences* 2003, 24(7):366-376.

69. Wymann MP, Pirola L: Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochimica et biophysica acta* 1998, 1436(1-2):127-150.
70. Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD: Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 1993, 260(5104):88-91.
71. Osaki M, Oshimura M, Ito H: PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2004, 9(6):667-676.
72. Yu J, Wjasow C, Backer JM: Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(46):30199-30203.
73. Scaltriti M, Baselga J: The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006, 12(18):5268-5272.
74. Staal SP: Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, 84(14):5034-5037.
75. Vanhaesebroeck B, Alessi DR: The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical journal* 2000, 346 Pt 3:561-576.
76. Manning BD, Cantley LC: AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007, 129(7):1261-1274.
77. Song G, Ouyang G, Bao S: The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine* 2005, 9(1):59-71.

78. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005, 307(5712):1098-1101.
79. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME: Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997, 91(2):231-241.
80. Romashkova JA, Makarov SS: NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999, 401(6748):86-90.
81. Mayo LD, Donner DB: A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98(20):11598-11603.
82. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC: HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature cell biology* 2001, 3(11):973-982.
83. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ: Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & development* 1998, 12(22):3499-3511.
84. Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR: Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *The Biochemical journal* 1999, 344 Pt 2:427-431.
85. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T *et al*: Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature genetics* 1997, 15(4):356-362.
86. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R *et al*: PTEN, a putative protein

tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997, 275(5308):1943-1947.

87. Miled N, Yan Y, Hon WC, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Backer JM, Williams RL: Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* 2007, 317(5835):239-242.
88. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JH, Kallemeijn WW, Schutte M: Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Molecular cancer research : MCR* 2007, 5(2):195-201.
89. Chalhoub N, Baker SJ: PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology* 2009, 4:127-150.
90. Fruman DA, Snapper SB, Yballe CM, Davidson L, Yu JY, Alt FW, Cantley LC: Impaired B cell development and proliferation in absence of phosphoinositide 3-kinase p85alpha. *Science* 1999, 283(5400):393-397.
91. Carnero A: The PKB/AKT pathway in cancer. *Current pharmaceutical design* 2010, 16(1):34-44.
92. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ *et al*: High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004, 304(5670):554.
93. Okkenhaug K, Bilancio A, Farjot G, Priddle H, Sancho S, Peskett E, Pearce W, Meek SE, Salpekar A, Waterfield MD *et al*: Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* 2002, 297(5583):1031-1034.
94. Clayton E, Bardi G, Bell SE, Chantry D, Downes CP, Gray A, Humphries LA, Rawlings D, Reynolds H, Vigorito E *et al*: A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *The Journal of experimental medicine* 2002, 196(6):753-763.

95. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmstrom PO, Mansukhani M, Enoksson J *et al*: PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer research* 2005, 65(7):2554-2559.
96. Hresko RC, Mueckler M: mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280(49):40406-40416.
97. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C *et al*: The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer biology & therapy* 2004, 3(8):772-775.
98. Prigent SA, Gullick WJ: Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *The EMBO journal* 1994, 13(12):2831-2841.
99. Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD, Muller WJ: Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *The EMBO journal* 1999, 18(8):2149-2164.
100. Engelman JA: Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature reviews Cancer* 2009, 9(8):550-562.
101. Gerber DE: Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American family physician* 2008, 77(3):311-319.
102. Carter P: Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature reviews Cancer* 2001, 1(2):118-129.
103. Imai K, Takaoka A: Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature reviews Cancer* 2006, 6(9):714-727.
104. David L. Nelson MMC: *Lehninger Principles of Biochemistry*, Sixth Edition edn: Susan Winslow; 2013.

105. Sergina NV, Moasser MM: The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends in molecular medicine* 2007, 13(12):527-534.
106. Mendelsohn J, Baselga J: Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Seminars in oncology* 2006, 33(4):369-385.
107. Nahta R, O'Regan RM: Evolving strategies for overcoming resistance to HER2-directed therapy: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Clinical breast cancer* 2010, 10 Suppl 3:S72-78.
108. Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL: p95HER2 and breast cancer. *Cancer research* 2011, 71(5):1515-1519.
109. Han-Chung Wu D-KC, and Chia-Ting Huang: Targeted Therapy for Cancer. *Journal of Cancer Molecules* 2006, 2(2):57-66.
110. Menendez JA, Lupu R: Transphosphorylation of kinase-dead HER3 and breast cancer progression: a new standpoint or an old concept revisited? *Breast cancer research : BCR* 2007, 9(5):111.
111. Brachmann S, Fritsch C, Maira SM, Garcia-Echeverria C: PI3K and mTOR inhibitors: a new generation of targeted anticancer agents. *Current opinion in cell biology* 2009, 21(2):194-198.
112. Martini M, Ciruolo E, Gulluni F, Hirsch E: Targeting PI3K in Cancer: Any Good News? *Frontiers in oncology* 2013, 3:108.
113. Garcia-Echeverria C, Sellers WR: Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 2008, 27(41):5511-5526.
114. Azab SS: Targeting the mTOR Signaling Pathways in Breast Cancer: More Than the Rapalogs. *Journal of biochemical and pharmacological research* 2013, 1(2):75-83.
115. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF: The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Current cancer drug targets* 2008, 8(3):187-198.

116. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL *et al*: mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research* 2006, 66(3):1500-1508.
117. Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, Beijersbergen RL, Valero V, Seoane J, Bernards R *et al*: Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer research* 2008, 68(22):9221-9230.
118. Workman P, Clarke PA, Raynaud FI, van Montfort RL: Drugging the PI3 kinome: from chemical tools to drugs in the clinic. *Cancer research* 2010, 70(6):2146-2157.
119. Hayakawa M, Kawaguchi K, Kaizawa H, Koizumi T, Ohishi T, Yamano M, Okada M, Ohta M, Tsukamoto S, Raynaud FI *et al*: Synthesis and biological evaluation of sulfonylhydrazone-substituted imidazo[1,2-a]pyridines as novel PI3 kinase p110alpha inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2007, 15(17):5837-5844.
120. Park S, Chapuis N, Bardet V, Tamburini J, Gallay N, Willems L, Knight ZA, Shokat KM, Azar N, Viguié F *et al*: PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia* 2008, 22(9):1698-1706.
121. Zhou HY, Huang SL: Current development of the second generation of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Chinese journal of cancer* 2012, 31(1):8-18.
122. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 2001, 25(4):402-408.
123. Bydoun M, Marcato P, Dellaire G: *Chapter 13 - Breast Cancer Genomics. In: Cancer Genomics.* edn. Edited by Arceci GDNBJ. Boston: Academic Press; 2014: 213-232.

124. Fruman DA, Rommel C: PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery* 2014, 13(2):140-156.
125. Fabi A, Mottolese M, Segatto O: Therapeutic targeting of ERBB2 in breast cancer: understanding resistance in the laboratory and combating it in the clinic. *Journal of molecular medicine* 2014, 92(7):681-695.
126. Çimen E: **Meme Kanseri Hücre Dizilerinde HIF-1 α Ekspresyonlarının İncelenmesi.** Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2011.
127. Amin DN, Sergina N, Lim L, Goga A, Moasser MM: HER3 signalling is regulated through a multitude of redundant mechanisms in HER2-driven tumour cells. *The Biochemical journal* 2012, 447(3):417-425.
128. Garrett JT, Olivares MG, Rinehart C, Granja-Ingram ND, Sanchez V, Chakrabarty A, Dave B, Cook RS, Pao W, McKinely E *et al*: Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, 108(12):5021-5026.
129. Chakrabarty A, Sanchez V, Kuba MG, Rinehart C, Arteaga CL: Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109(8):2718-2723.
130. Polivka J, Jr., Janku F: Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & therapeutics* 2014, 142(2):164-175.
131. Sabbah DA, Brattain MG, Zhong H: Dual inhibitors of PI3K/mTOR or mTOR-selective inhibitors: which way shall we go? *Current medicinal chemistry* 2011, 18(36):5528-5544.

132. Roper J, Richardson MP, Wang WV, Richard LG, Chen W, Coffee EM, Sinnamon MJ, Lee L, Chen PC, Bronson RT *et al*: The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 induces tumor regression in a genetically engineered mouse model of PIK3CA wild-type colorectal cancer. *PloS one* 2011, 6(9):e25132.
133. Raynaud FI, Eccles S, Clarke PA, Hayes A, Nutley B, Alix S, Henley A, Di-Stefano F, Ahmad Z, Guillard S *et al*: Pharmacologic characterization of a potent inhibitor of class I phosphatidylinositide 3-kinases. *Cancer research* 2007, 67(12):5840-5850.
134. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S: Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011, 17(8):2260-2269.
135. Weinstein IB: Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 2002, 297(5578):63-64.
136. Lipton A, Goodman L, Leitzel K, Cook J, Sperinde J, Haddad M, Kostler WJ, Huang W, Weidler JM, Ali S *et al*: HER3, p95HER2, and HER2 protein expression levels define multiple subtypes of HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2013, 141(1):43-53.
137. Alajati A, Sausgruber N, Aceto N, Duss S, Sarret S, Voshol H, Bonenfant D, Bentires-Alj M: Mammary tumor formation and metastasis evoked by a HER2 splice variant. *Cancer research* 2013, 73(17):5320-5327.
138. Niederst MJ, Engelman JA: Bypass mechanisms of resistance to receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer. *Science signaling* 2013, 6(294):re6.

139. Parra-Palau JL, Pedersen K, Peg V, Scaltriti M, Angelini PD, Escorihuela M, Mancilla S, Sanchez Pla A, Ramon YCS, Baselga J *et al*: A major role of p95/611-CTF, a carboxy-terminal fragment of HER2, in the down-modulation of the estrogen receptor in HER2-positive breast cancers. *Cancer research* 2010, 70(21):8537-8546.
140. O'Brien NA, McDonald K, Tong L, von Euw E, Kalous O, Conklin D, Hurvitz SA, di Tomaso E, Schnell C, Linnartz R *et al*: Targeting PI3K/mTOR overcomes resistance to HER2-targeted therapy independent of feedback activation of AKT. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014, 20(13):3507-3520.
141. Garrett JT, Sutton CR, Kuba MG, Cook RS, Arteaga CL: Dual blockade of HER2 in HER2-overexpressing tumor cells does not completely eliminate HER3 function. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013, 19(3):610-619.
142. Xia W, Petricoin EF, 3rd, Zhao S, Liu L, Osada T, Cheng Q, Wulfkuhle JD, Gwin WR, Yang X, Gallagher RI *et al*: An heregulin-EGFR-HER3 autocrine signaling axis can mediate acquired lapatinib resistance in HER2+ breast cancer models. *Breast cancer research : BCR* 2013, 15(5):R85.
143. Kalia M: Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism: clinical and experimental* 2014.
144. Korkaya H, Wicha MS: HER2 and breast cancer stem cells: more than meets the eye. *Cancer research* 2013, 73(12):3489-3493.
145. Diaz LA, Jr., Bardelli A: Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014, 32(6):579-586.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Raporu



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 - Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

20. Ekim 2013

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.07.00

Sayı: 16969557 -975

Doç.Dr.A.Lale DOĞAN
Kanser Enstitüsü
Genel Onkoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Doç.Dr.DOĞAN,

Kurulumuzun 09.10.2013 tarihli toplantısında değerlendirilen GO 13/490 kayıt numaralı ve "*Meme Kanseri Hücrelerinde PI-103 İnhibitörünün Aktive Reseptör Tirozin Kinaz Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi*" başlıklı proje önerisinin ticari olarak satılan hücre hatlarında yapılacağı ve dolayısı ile çalışmanın gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek. nitelikte olmadığı görülmüştür Klinik Araştırmalar Yönetmeliği gereği bu tip çalışmalar Etik Kurulların kapsamı dışında kalmaktadır.

Bu yazı Etik Kurul kararı yerine geçmek üzere hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Nurten AKARSU
Başkan

