

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METASTATİK MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
mTOR ÜZERİNDE ETKİLİ BAZI MEKANİZMALARIN
ARAŞTIRILMASI

Bio. Merve UĞUR

Biyokimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2014

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METASTATİK MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
mTOR ÜZERİNDE ETKİLİ BAZI MEKANİZMALARIN
ARAŞTIRILMASI

Bio. Merve UĞUR

Biyokimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

ANKARA

2014

Anabilim Dalı :Biyokimya
 Program :Biyokimya
 Tez Başlığı :Metastatik Meme Kanseri Hücrelerinde Mtor Üzerinde Etkili
 Bazı Mekanizmaların Araştırılması
 Öğrenci Adı-Soyadı :Merve UĞUR
 Savunma Sınavı Tarihi :22.04.2014

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

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN
 (Gazi Üniversitesi)

Tez danışmanı: Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN
 (Hacettepe Üniversitesi)

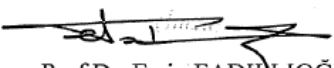
Üye: Doç. Dr. Günnur DİKMEN
 (Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Doç. Dr. Ayşe ERCAN
 (Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Doç.Dr. Gülnihal KULAKSIZ ERKMEN
 (Hacettepe Üniversitesi)

ONAY

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


 Prof.Dr. Ersin FADILLOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan, eğitimim süresince ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve anlayış gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN'e sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Akademik kariyerimin başlamasına yardımcı olan ve beni yönlendiren Prof. Dr. Bahar GÖKLER'e, lisans eğitimim boyunca bilgilerini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine, Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine içtenlikle teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında beni destekleyen Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim dalı öğrencilerine teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her anında maddi ve manevi yanımda olan, bana güvenen, tüm zorluklar karşısında dik durmayı öğreten ve gerekli gücü veren, umutsuzluğa düştüğüm zamanlarda beni yüreklendiren ve destek veren en önemlisi sonsuz anlayış, sabır ve sevgilerini esirgemeyen aileme şükranlarımı sunuyorum.

Son olarak her dönemde yanımda olan, mutluluğum kadar sıkıntılarımı da paylaşan, dostluklarını hiçbir şeye değişmeyeceğim, en renkli anılarımın sebebi, yıllar içinde kardeşten öte olduğum sevgili dostlarım Batuhan COŞKUN, Elif MUNGAN, Ayşe AYDOĞAN, Burcu BAL, Aslı AKIN, Baldan KAVAKLI, Umut YAYLAOĞLU, Yeşim ARI, Ayşegül ÇELEN, Çiğdem ASATEKİN'e teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Uğur, M. Metastatik meme kanseri hücrelerinde mTOR üzerinde etkili bazı mekanizmaların araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2014. Meme kanseri patogenezinde reseptörler ve sinyal yollarının önemli rol oynadığı bilinmektedir. Hücre proliferasyonunda merkezi rol oynayan ve diğer sinyal yolları ile etkileşim içerisinde olan mTOR, metastatik üçlü negatif insan meme kanseri olan MDA-MB- 231 hücre hattında hedef olarak seçilmiştir. Kanser hücrelerinde malin fenotipin ortaya çıkmasında iyon kanalları ve reseptörlerin aşırı eksprese olarak katkıda bulunduğu saptanmıştır. Bunlara arasında voltaj kapılı sodyum kanalının neonatal alternatif kırılma ürünü nNav1.5 ve Noç-4 moleküllerinin mTOR üzerindeki etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla nNav1.5 inhibitörü olarak fenitoin, Noç-4 inhibitörü olarak da γ -sekretaz inhibitörü kullanılmıştır. Bunların mTOR üzerindeki etkileri mTOR'un özgül substratları olan S6K ve 4E-BP1'in fosforillenmiş aktif formlarının ekspresyonları zamana bağlı olarak "Western Blot" yöntemi ile saptanmıştır. Fenitoin mTOR'un özgül substratlarının p-70s6k p-4E-BP1 ekspresyonlarını 24 saat sonunda %21 ve %23 oranında azaltmıştır. γ -sekretaz ise bu substratların ekspresyonlarını 72 saat sonunda %66 ve %25 oranında azaltmıştır. Hücre proliferasyonu üzerine nNav1.5 inhibisyonu etkili olmazken, Noç-4 inhibisyonu hücre canlılığında 48 saat sonunda %50 oranında azalmaya neden olmuştur. Sonuç olarak, nNav1.5 ve Noç-4 moleküllerinin mTOR üzerinde etkin oldukları belirlenmiştir. Hücre proliferasyonunda merkezi bir rol olan bu molekülün sistem olarak ele alınması, nNav1.5 ve Noç ile birlikte hedef alınarak tedavide etkin stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metastatik meme kanseri, mTOR, nNav1.5, Noç-4, proliferasyon, p-p70S6K (Thr 389), p-4E-BP1 (Thr 37/46)

ABSTRACT

Ugur, M. Analysis of the effect some mechanisms which targets mTOR in triple negative breast cancer cells. Hacettepe University Institute of Health Science, Master Thesis in Biochemistry, Ankara, 2014. Signal transduction pathways play crucial roles in breast cancer pathogenesis. mTOR, which plays a central role in cell proliferation and interacts with several cell components, is selected as a target in MDA-MB- 231 metastatic, triple negative human breast cancer cell line. The Notch signalling pathway is activated in MDA-MB-231 cell as compared to non metastatic MCF 7 cells. Ion channels are also known to be involved in the emergence of malignant phenotype in cancer cells. For example, the neonatal splice variant of voltage gated sodium channels is activated and contribute to metastatic behaviour of in MDA-MB 231 cells. Thus, we aimed at analysing the effects of Notch-4 receptor and nnav 1.5 sodium channel on mTOR. For this purpose, Phenytoin and gamma secretase inhibitor is used for inhibiting nnav 1.5 sodium channel and Notc-4 respectively. Their effects on mTOR was analysed by detecting the time dendent expression of phosphorylated, active forms of its specific substrates, S6K ve 4E-BP1 by “Western Blot” . Phenytoin, decreased the expression of p-70s6k p-4E-BP1,21% and 23% in 24 hours respectively. While, gamma secretase inhibitor caused a decrease by 66% and 25% in 72 hours. The inhibition of nnav 1.5 activity did not effect cell proliferation significantly. However, inhibition of Notch 4 receptor signalling resulted in 50 % reduction in cell viability in 48 hours. It is concluded that, nNav1.5 and Noç-4 are effective on mTOR activity. Thus, it may be important to consider this central molecule as a system and the co-inhibition of nNav1.5, Notch-4 and probably other cell components may contribute the development of efficient treatment strategies .

Key Words: Metastatic breast cancer, mTOR, nNav1.5, Notch-4, proliferation, p-p70S6K (Thr 389), p-4E-BP1 (Thr 37/46)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Meme Kanseri	3
2.2 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı	4
2.2.1 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı İnhibitörleri	10
2.2.2 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı ve Meme Kanseri	10
2.3 Noç Sinyal Yolağı	11
2.3.1 Noç Sinyal Yolağı ve Meme Kanseri	15
2.4 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları	16

2.4.1 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları ve Meme Kanseri	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
3.1 Kimyasal Malzemeler	20
3.2 Kullanılan Cihazlar	20
3.3 Yöntemler	21
3.3.1 Hücrelerin Çözülmesi ve Ekimi	22
3.3.2 Tripsinizasyon	22
3.3.3 Hücrelerin Dondurulması	22
3.3.4 MTT Yöntemi ile Sitotoksosite Çalışmaları	23
3.3.5 Hücre Lizatlarının Hazırlanışı	24
3.3.6 Örneklerdeki Protein Miktarının Belirlenmesi	25
3.3.7 Protein Analizleri	26
3.3.7.1 Poliakrilamid Jel Elektrofözezi	26
3.3.7.2 Transfer ve Blotlama	27
3.3.8 Kemiluminesans Görüntüleme	28
3.3.9 Dansitometrik Analiz	29
3.3.10 İstatiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1 MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanan İnhibitörlerin Sitotoksik Etkileri	30

4.2 MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanan İnhibitörlerin mTOR Üzerindeki Etkisi	33
4.2.1 LY-294,002'nin p-p70S6K(Thr389) ve p-4E-BP1(Thr37/46) Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	33
4.2.2 Rapamisin'in p-p70S6K (Thr389), p-4E-BP1 (Thr37/46), Noç-4, MMP-9 ve TIMP1 Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	36
4.2.3 γ -Sekretaz İnhibitörünün p-p70S6K (Thr389) ve p-4E-BP1 (Thr37/46) Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	41
4.2.4 Fenitoin'in p-p70S6K(Thr389) ve p-4E-BP1(Thr37/46) Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	44
4.2.5 MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanan İnhibitör Kombinasyonlarının mTOR Üzerindeki Etkisi	47
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	58

SİMGELELER ve KISALTMALAR

4E-BP1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein
γ -sekretaz	Presenilin ½, Nikastrin, Pen-2 ve Aph-1
ACS	American Cancer Society
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
Bad	Bcl-2 associated death promoter
BCA	Bisinkonik asit
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma extra large
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BSA	Bovine serum albumin
CADASIL	Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
CSL	CBF1, Su(H), LAG-1
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
eLF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
DAP1	Death Associated Protein 1

Deptor	Dep domain containing mTOR interacting protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSL	Delta ve JAG/Serrate
EDTA	Etilendiamin tetrasetik asit
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Etilen glikol tetraasetik asit
FBS	Fetal bovine serum
FKBP12	FK506-Binding Protein 12
FOXO	Forkhead Box Protein O
Fringe	β 1,3-N-asetilglukozamin transferaz
GLUT1	Glucose Trasporter 1
GLUT4	Glucose Trasporter 4
GPCR	G proteini kenetli reseptörler
GSK3 β	Glikojen sentaz kinaz 3 β
GTP	Guanozin trifosfat
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HER1	Human Epidermal Growth Factor Receptor 1

HER 2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
Hes	Hairy/enhancer-of-split
Hey	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif
HIF-1	Hypoxia İnducible Factor-1
HRT	Hairy-related Transcription Factor
LNR	LIN-12, Notch related region
Maf-1	RNA polimeraz III represörü
MAML	Mastermind Like
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
Mdm 2	Mouse double minute 2 homologue
MMP	Matriks Metalloproteinaz
mLSTS8	Mammalian lethal with sec 13 protein 8
mSIN1	Mammalian stress-activated protein kinase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1
mTORC2	Mammalian Target of Rapamycin Complex 2
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NaCl	Sodyum klorür
NaF	Sodyum florür

Na_2MoO_4	Sodyum molibdat
NaOH	Sodyum hidroksit
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	Sodyum pirofosfat
Na_3VO_4	Sodyum ortovanadat
NICD	Notch Intracellular Domain
NF- κ B	Nuklear Faktör- κ B
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NLS	Nuklear Lokalizasyon Sinyali
PBS	Phosphate buffered saline
PCAF	P300/CBP Associated Factor
PDK1	Fosfotidilinozitol Bağımlı Kinaz 1
PEST	Proline, Glutamat, Serin, Treonin
PH	Pleckstrin Homology
PI	Fosfotidilinozitol
PI3K	Fosfotidilinozitol 3 kinaz
PI(3)P	Fosfotidilinositol 3-fosfat
PI(4)P	Fosfotidilinozitol 4-fosfat
PIP ₂	Fosfotidilinozitol 4,5 bifosfat
PIP ₃	Fosfotidilinozitol 3,4,5 trifosfat

PKC α	Protein Kinaz C α
PMSF	Fenilmetilsülfonil florid
POFUT	O-fukozil transferaz
PRAS40	Proline Rich Akt Substrate 40 kDa
PTEN	Phospatase and Tensin Homologue
RAM	RBP-J Associated Molecule
Ras	Rat sarcoma
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
RBP-J	Recombination Signal Binding Protein-J
Rheb	Ras homologue enriched in brain
Rictor	Rapamycin insensitive companion of mTOR
RTK	Reseptör tirozin kinazlar
S6K	Ribozomal protein S6 Kinaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SGK1	Serum and Glucocorticoid induced kinase
SH ₂	Src homology 2
SHIP	SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase
SREBP1/2	Sterol Regulatory Element Binding Protein 1/2
TAD	Transcriptional Activation Domain

TACE	TNF- α Converting Enzyme
TEMED	Tetrametiletilen diamin
TIF-1A	Transcription Initiation Factor-1A
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TRAIL	TNF- α related apoptosis inducing ligand
TSC1	Tuberus Sclerosis Complex 1
TSC2	Tuberus Sclerosis Complex 2
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor
VGSC	Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları
vps34	Homologue of the yeast vacuolar protein sorting defective 34
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kapa
μ	Mikro

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1 PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı. Meric-Bernstam ve Gonzalez-Angulo 2009 (61)'dan alınmıştır.	4
Şekil 2.2 PI3K ailesi proteinlerinin yapısı. Liu, Cheng ve diğerleri 2009 (23)'dan alınmıştır.	6
Şekil 2.3 Akt izoformları. Bellacosa, Kumar ve diğerleri 2005 (28)'den alınmıştır.	6
Şekil 2.4 Akt'nin etkileri. Bellacosa, Kumar ve diğerleri 2005 (28)'den alınmıştır.	7
Şekil 2.5 mTOR'un etki mekanizmaları. Guertin ve Sabatini 2007 (35)'den alınmıştır.	9
Şekil 2.6 Noç reseptörleri ve ligandlarının yapısal özellikleri. Wang 2011 (96)'den alınmıştır.	13
Şekil 2.7 Noç Sinyal yolağı. Miele 2006 (3)'dan alınmıştır.	14
Şekil 2.8 Noç sinyal yolağının kanseri ile ilişkisi. Roy, Pear ve diğerleri 2007 (103)'den alınmıştır	15
Şekil 2.9 Voltaj kapılı sodyum kanallarının yapısı. Clare ve diğerleri 2000 (132)'den alınmıştır.	17
Şekil 3.1 Sitotoksisite çalışmalarının şematik gösterimi	24
Şekil 3.2 Western blot çalışmasının şematik gösterimi	28
Şekil 4.1 Rapamisin'in zamana göre hücre canlılığı üzerindeki etkisi	31
Şekil 4.2 γ -sekretaz inhibitörünün zamana göre hücre canlılığı üzerindeki etkisi	31
Şekil 4.3 LY-294,002'nin zamana göre hücre canlılığı üzerindeki etkisi	32

Şekil 4.4 Fenitoin'in zamana göre hücre canlılığı üzerindeki etkisi	32
Şekil 4.5 LY-294,002 uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p- p70S6K (Thr389) ve p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonu	34
Şekil 4.6 LY-294,002' nin zamana bağlı olarak p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	35
Şekil 4.7 LY-294,002' nin zamana bağlı olarak p-4E-BP1 (Thr 37/46) ekspresyonuna etkisi (%Değişim)	35
Şekil 4.8 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p- p70S6K(Thr389), p-4E-BP1 (Thr37/46), Noç-4, MMP-9 ve TIMP1 ekspresyonu	37
Şekil 4.9 Rapamisin' nin zamana bağlı olarak p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	38
Şekil 4.10 Rapamisin' nin zamana bağlı olarak p-4E-BP1 (Thr 37/46) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	39
Şekil 4.11 Rapamisin' nin zamana bağlı olarak Noç-4 ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	40
Şekil 4.12 Rapamisin' nin zamana bağlı olarak MMP-9 ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	40
Şekil 4.13 Rapamisin ' nin zamana bağlı olarak TIMP1 ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	41
Şekil 4.14 γ -sekretaz inhibitörü uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p- p70S6K(Thr389) ve p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonu	42
Şekil 4.15 γ -sekretaz inhibitörünün zamana bağlı olarak p-4E-BP1 (Thr 37/46) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	43

- Şekil 4.16 γ -sekretaz inhibitörünün zamana bağlı olarak p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim) 44
- Şekil 4.17 Fenitoin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p- p70S6K (Thr389) ve p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonu 45
- Şekil 4.18 Fenitoin'in zamana bağlı olarak p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim) 46
- Şekil 4.19 Fenitoin'in zamana bağlı olarak p-4E-BP1 (Thr 37/46) ekspresyonuna etkisi (% Değişim) 47
- Şekil 4.20 MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan inhibitör kombinasyonlarında p-p70S6K (Thr389) ve p- 4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonu 48
- Şekil 4.21 Kombinasyonların zamana bağlı olarak p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim) 49
- Şekil 4.22 Kombinasyonların p-4E-BP1 (Thr37/46) zamana bağlı olarak ekspresyonuna etkisi (% Değişim) 51

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 3.1 Jellerin hazırlanışı	26
Tablo 3.2 Örnek yükleme tamponunun hazırlanışı	26
Tablo 4.1 LY-294,002 uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p70S6K (Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu. (n=3, p70S6K(Thr389)/ β -aktin)	34
Tablo 4.2 LY-294,002 uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p-4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu. (n=3, p-4E-BP1(Thr37/46)/ β -aktin)	34
Tablo 4.3 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p70S6K (Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu. (n=3, p70S6K (Thr389)/ β -aktin)	37
Tablo 4.4 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p-4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, p-4E-BP1(Th37/46)/ β -aktin)	38
Tablo 4.5 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde Noç-4 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, Noç-4/ β -aktin)	39
Tablo 4.6 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde MMP-9 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, MMP-9/ β -aktin)	39
Tablo 4.7 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde TIMP1 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3 , TIMP1/ β -aktin)	41
Tablo 4.8 γ -sekretaz inhibitörü için p-4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, p-4E-BP1 (Thr37/46)/ β -aktin)	42

- Tablo 4.9 γ -sekretaz inhibitörü için p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, p-p70S6K (Thr389)/ β -aktin) 43
- Tablo 4.10 Fenitoin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p70S6K(Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, p70S6K(Thr389)/ β -aktin) 45
- Tablo 4.11 Fenitoin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p-4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, p-4E-BP1(Thr37/46)/ β -aktin) 46
- Tablo 4.12 İnhibitör kombinasyonları uygulaması yapılan MDA-MB-231 hücrelerinde p-p70S6K(Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3,p-p70S6K(Thr389)/ β -aktin) 48
- Tablo 4.13 İnhibitör kombinasyonları uygulaması yapılan MDA-MB-231 hücrelerinde p-4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, p-4E-BP1(Thr37/46)/ β -aktin) 49

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ökaryotik organizmalarda hücrelerin kaderi hücre dışından alınan sinyaller ile belirlenmektedir. Bu sinyaller, hücre yüzeyinde ve hücre içinde bulunan reseptörleri aracılığı ile alınır. Bu reseptörler hücre içindeki sinyal yollarını aktive ederek ve/veya doğrudan DNA ile etkileşim içerisine girerek hücre çoğalması, farklılaşma, gelişim, sağ kalım, migrasyon gibi süreçlerde rol oynarlar. Reseptörler ve sinyal yollarında rol alan moleküllerin ekspresyon seviyelerinde, aktivitelerinde veya yolların düzenlenmesinde meydana gelen değişimler kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır (1).

Meme kanserinin de içinde bulunduğu pek çok kanser türünde reseptör tirozin kinazların aşırı ekspresyonu, mutasyonu veya sinyal yolağı bileşenlerindeki mutasyonlar PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının sürekli aktivasyonuna sebep olmaktadır. Bu sinyal yolağı hücre çoğalmasından invazyona, apoptozun önlenmesinden anjiyogeneze, tümör büyümesinden metastaza kadar birçok metabolik ve fizyolojik işlevden sorumludur (2).

Noç sinyal yolağı çeşitli moleküler mekanizmalar ile hücre farklılaşması, çoğalması, canlılığı ve embriyonik dönemde doku gelişimi, organ oluşumu ve sınırlarının belirlenmesi gibi süreçlerde rol oynar. Memelilerde bulunan dört tip Noç reseptöründen (Noç 1-4), Noç 1 ve Noç 4' ün meme kanseri gelişiminde önemli rol oynadığı yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. (3-5).

Kanser gelişiminde önemli rolü olan metastatik süreçte etkili olan PI3K/Akt/mTOR ve Noç sinyal yollarına ilaveten voltaj kapılı sodyum kanallarının da önemli rol oynadığı bilinmektedir. Metastatik meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde nNav1.5(Neonatal voltaj kapılı sodyum kanalı izoformu) ekspresyon seviyesindeki artış bu bilgiyi doğrulamaktadır (6-8).

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı ile Noç sinyal yolağı arasındaki ilişki pek çok malignant hücre tipinde yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Her iki yolağın da benzer genlerin ekspresyonunu arttırdığı, Noç reseptörlerinin PI3K/Akt/mTOR

sinyal yolağı sayesinde p53 inhibisyonuna sebep olduğu, Noç hücre içi bölümünün fosforile ederek yapısal bütünlüğünün korunmasında PI3K/Akt/mTOR yolağının görevli olduğu bilinmektedir. Yine Noç sinyal yolağının γ -sekretaz inhibitörü ile inhibisyonu sonucu Noç ve Akt/mTOR yolaklarının etkisinin azalışına, Akt ve mTOR ekspresyon seviyesinde düşüŖe ek olarak PI3K ve mTOR inhibitörleri de kullanılarak yapılan çalışmalarda Noç-1 aktivasyonunun sonladığı bilinmektedir (9-15).

Noç sinyal yolağına ek olarak PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının iyon kanalları ekspresyonunda da görevli olduğu bilinmektedir (16, 17).

Bu araştırma kapsamında, elde edilen bilgiler ışığında metastatik insan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinde ekspresyon seviyelerinin arttığı bilinen nNav1.5 ve Noç-4 reseptörünün PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı bileşenlerinden mTOR üzerindeki etkilerini ve bu iki önemli molekülün PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı ile ilişkisini açıklamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında çok yaygın olup akciğer kanserinden sonra görülme sıklığı en yüksek olan ikinci kanser türüdür. ACS (*American Cancer Society*) verilerine göre 2008 yılında dünya çapında 1,3 milyon kanser olgusu tanımlanmış olup, kansere bağlı ölümlerin sayısı ise 465.000 olarak rapor belirtilmiştir (18).

Meme kanseri hücreleri birden fazla genetik ve epigenetik anomali göstererek, malin fenotipin ortaya çıkışını, proliferatif sinyalin sürekliliğini ve hücre sağ kalımını sağlarlar. Bunlar arasında BRCA1 (*Breast Cancer 1*) ve BRCA2 (*Breast Cancer 2*) genlerindeki mutasyonlar, kaspaz yolağında görülen bozukluklar, hücre döngüsünün siklin ve siklin bağımlı kinazlar aracılığı ile kontrolünde görülen bozukluklar, hücre döngüsünde görev alan p27, p21, p53 vb proteinlerin kaybı, Bad (*Bcl-2 associated death promoter*), Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), Bcl-XL (*B-cell lymphoma extra large*), FOXO (*Forkhead Box Protein O*) transkripsiyon faktörleri gibi öncül apoptotik proteinlerin kaybı ve/veya etkinliğinin azalışı, TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), Fas ligand, TRAIL (*TNF- α related apoptosis inducing ligand*) gibi apoptotik sinyallerin kaybı, c-myc aşırı ekspresyonu vb mekanizmalar örnek verilebilir (18, 19).

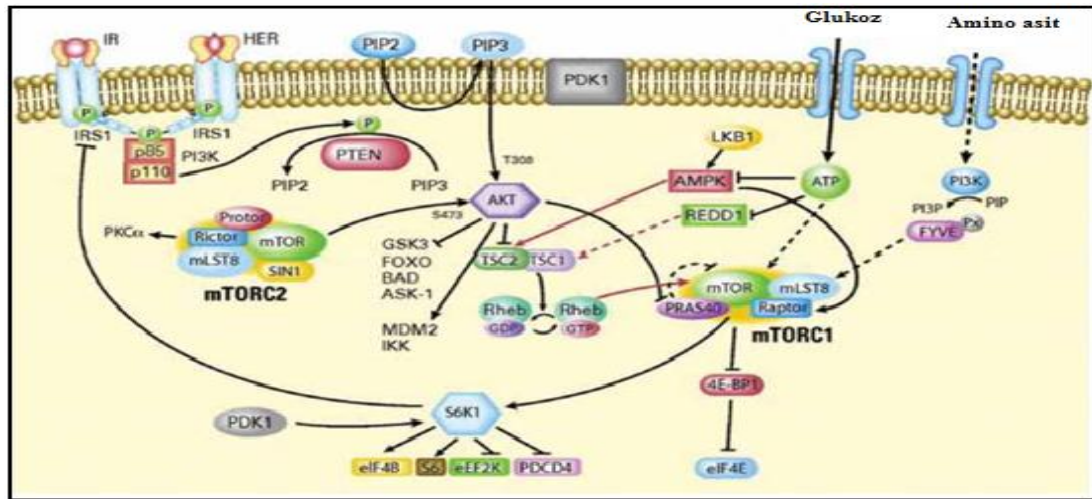
Meme kanseri, klinik ve moleküler açıdan oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu karmaşık yapının ortaya çıkmasında yapısal heterojenite, gen ekspresyon seviyesindeki değişimler önemli rol oynamaktadır (19, 20). Örneğin meme kanseri hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde bazı hücre hatlarında progesteron ve östrojen reseptörü bulunurken (MCF-7, T4D) bazı hücre hatlarında bu reseptörlerin bulunmadığı gözlenmiştir (MDA-MB-231). Ancak reseptör tirozin kinazların, Noç ve G protein kenetli reseptörlerin tüm meme kanseri hücrelerinde normalden daha fazla seviyede sentezlendiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Özellikle HER1 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 1*) ve HER 2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)' nin aşırı ekspresyonu meme kanseri gelişiminde, proliferatif sinyalin sürekliliğini sağlamada, apoptozun

önlenmesinde ve hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunda önemli bir yer tutmaktadır. Bu sinyal yollarına örnek olarak PI3K (Fosfotidilinozitol 3 kinaz)/Akt (Protein kinaz B)/mTOR (*mammalian target of rapamycin*), Ras (*Rat sarcoma*), ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*)/ MAPK(*Mitogen-activated Protein Kinase*) sinyalleri sayılabilir. Yine bu sinyal yolları bileşenlerinde görülen mutasyonlar ve/veya aşırı ekspresyonlar meme kanserinde sıkça görülmektedir (18, 21).

Kansere bağlı ölümlerin %90'ının metastaz nedeni olduğu bilinmekte olup yapılan çalışmalarda metastatik süreçteki rolleri açıklanmış olan PI3K/Akt/mTOR ve Noç sinyal yollarına ilaveten voltaj kapılı sodyum kanallarının neonatal Nav1.5 izoformunda aşırı ekspresyonu görülmektedir (6-8).

2.2 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı; hücre proliferasyonu, sağ kalımı, büyümesi, migrasyon, anjiyogenez, metastaz ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi gibi pek çok hücrel süreçte rol oynar (2, 22-25).



Şekil 2.1 PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı. Meric-Bernstam ve Gonzalez-Angulo 2009 (61)'dan alınmıştır.

PI3K ailesi proteinleri, reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve G proteini kenetli reseptörler (GPCR) aracılığı ile alınan mesajların iletiminden sorumlu olan

proteinlerdir. Yapısal özellikleri, substrat özgülüklerinin farklı oluşu, aktivasyon mekanizmalarının ve fonksiyonlarının birbirinden farklı oluşu sebebiyle üç sınıfa ayrılırlar.

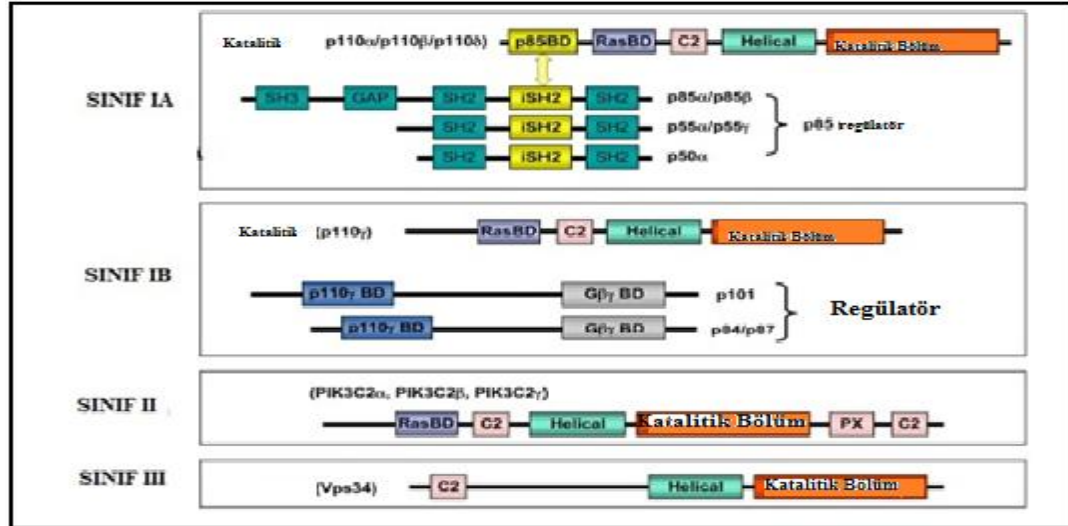
I.SINIF PI3K'lar proliferasyon, sağ kalım ve hücre büyümesi gibi olaylarda rolü en iyi araştırılmış sınıf olup IA ve IB olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır. Regülatör ve katalitik alt birim olmak üzere 2 alt birimden oluşan heterodimerik proteinlerdir. p85 regülatör alt birimi, memelilerde PIK3R1, PIK3R2, PIK3R3 olmak üzere 3 gen tarafından sırasıyla p85 α , p85 β , p55 γ izoformları olarak kodlanır. p110 katalitik alt birimi ise, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD olmak üzere 3 gen tarafından p110 α , p110 β , p110 γ izoformları olarak kodlanır (23, 26).

IA: GPCR, RTK ve Ras gibi bazı onkogenlerle etkileşerek aktive olurlar. Reseptöre bağlanma, aktivasyon ve enzimin membrana lokalizasyonunda görev almakta olup, p110 bağlanma bölümü ve 2 adet SH2 (*Src Homology 2*) bölümü içerir. SH2 bölümü reseptör üzerindeki fosforile tirozin birimlerini tanıyıp bağlanır, membrana lokalizasyonu sağlar. p110 katalitik alt birim ise, N-terminalde p-85 bağlanma bölümü, Ras bağlanma bölümü, membrana bağlanma bölümü, helikal bölüm, C-terminalde katalitik bölümden oluşur. Aktive olan p110 alt birimi membranda PIP₂ (Fosfotidilinozitol 4,5 bifosfat)'den PIP₃ (Fosfotidilinozitol 3,4,5 trifosfat) oluşumunu sağlar (23, 26).

IB: p110 γ katalitik alt birim ve p101 regülatör alt birimden oluşan heterodimerik bir proteindir. GPCR ile etkileşerek aktive olurlar (6, 9).

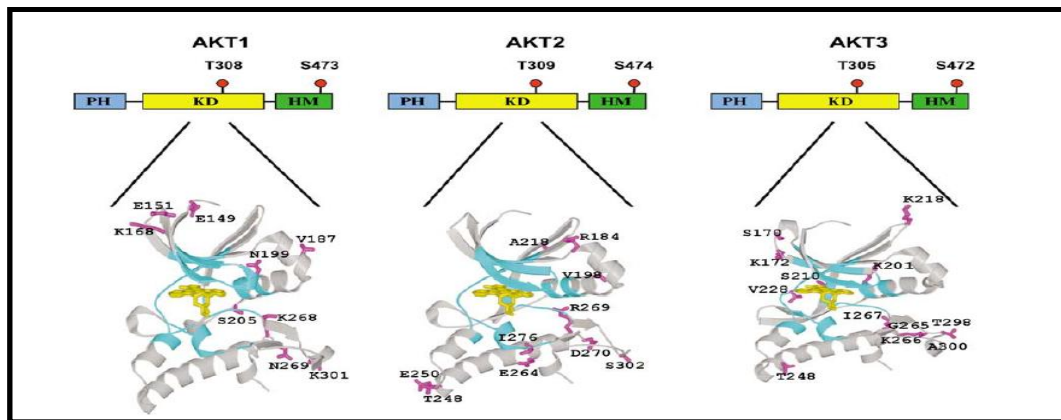
II. SINIF PI3K'lar sadece katalitik alt birimden oluşan monomerik proteinlerdir. PIK3KC2 α , PIK3KC2 β , PIK3KC2 γ olmak üzere 3 izoformu vardır. N-terminal bölümü takiben, Ras bağlanma bölümü, helikal bölüm ve katalitik bölümden oluşurlar. RTK, sitokin reseptör, integrinler aracılığı ile aktive olurlar. Substrat olarak PI (Fosfotidilinozitol) ve PI(4)P (Fosfotidilinozitol 4-fosfat) kullanırlar (23, 26). III.SINIF PI3K'lar vps34 (Homologue of the yeast vacuolar protein sorting defective 34) olarak da adlandırılan, katalitik alt birimden oluşan

monomerik bir proteindir. PI(3)P (Fosfotidilinositol 3-fosfat) üretirler. Hücre büyümesi ve otofajide görevlilerdir(23, 26).



Şekil 2.2 PI3K ailesi proteinlerinin yapısı. Liu, Cheng ve diğerleri 2009 (23)'dan alınmıştır.

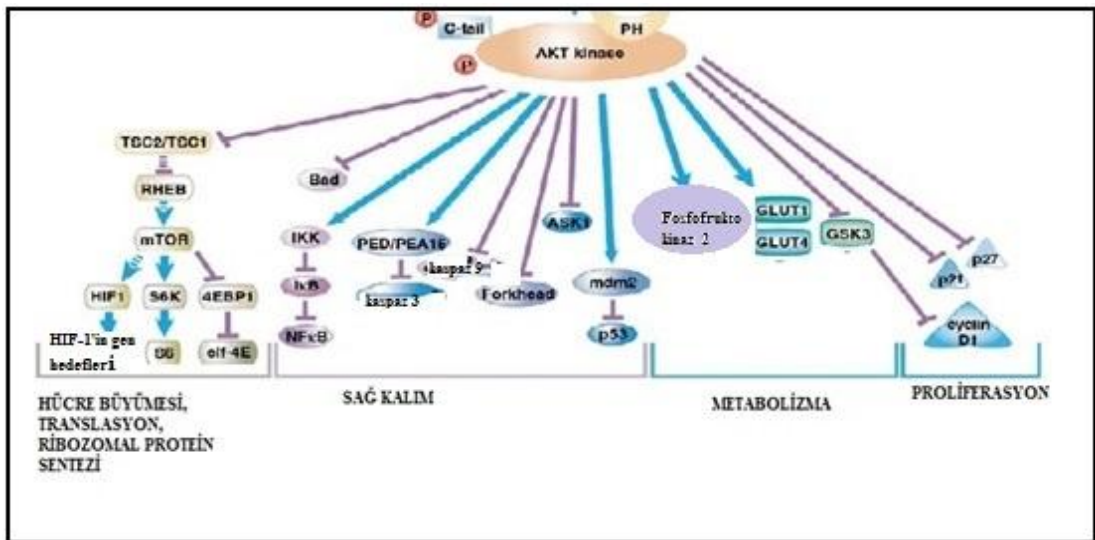
Akt, multifonksiyonel bir serin/treonin kinaz olup farklı genler tarafından kodlanan 3 izoformu bulunmaktadır. Akt1 tüm dokularda, Akt2 insüline duyarlı karaciğer, iskelet kası ve adipöz dokularda, Akt3 ise beyin ve testiste sentezlenir. Tüm izoformlar benzer bir yapıya sahip olup N-terminalde PH (*Pleckstrin Homology*) bölümü, serin/treonin kinaz bölümü ve C-terminalde regülatör bölümden oluşurlar (27-32).



Şekil 2.3 Akt izoformları. Bellacosa, Kumar ve diğerleri 2005 (28)'den alınmıştır.

Akt aktivasyonu, membrana lokalizasyon ve fosforilasyon ile gerçekleşen çok aşamalı bir süreçtir. PI3K aktivasyonu sonucu membranda oluşan PIP_3 'e PH bölümünün yüksek affinite ile bağlanması sonucu Akt membrana lokalize olur. Membranda Akt aktivasyonunu etkileyen 2 bölgeden fosforilasyona uğrar. PDK1 (Fosfotidil Bağımlı Kinaz 1) tarafından aktivasyon ilmeği “T-loop” olarak adlandırılan bölgede Akt1 Treonin 308 (Akt2 Treonin 309, Akt3 Treonin 305), C-terminalde bulunan Serin 473 (Akt2 Serin 474, Akt3 Serin 472) ise mTORC2 tarafından fosforile edilir. Akt aktivasyonu için T-loop fosforilasyonu oldukça önemli olsada C-terminal fosforilasyonu T-loop’da konformasyonel değişime sebep olarak Akt aktivitesini artırır (27, 28).

Fosforile olarak aktifleşen Akt, aralarında GSK3 β (Glikojen sentaz kinaz 3 β), Bad, FOXO transkripsiyon faktörlerinin, p21, mdm 2 (*Mouse double minute 2 homologue*), NOS (Nitrik Oksit Sentaz), NF- κ B (Nuklear Faktör- κ B), Fosfofruktoz 2-kinaz, TSC2 (*Tuberus Sclerosis Complex 2*) vb proteinleri fosforiller. Ayrıca MMP (Matriks Metalloproteinaz) salınımını, GLUT1 (*Glucose Trasporter 1*) ve GLUT4 (*Glucose Trasporter 4*) membrana translokasyonunu, HIF-1 (*Hypoxia İnducible Factor-1*) ve VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*) ekspresyonlarını arttırarak hücre döngüsü, sağ kalımı, hücre büyümesi, metabolizma, anjiyogenez, invazyon gibi süreçlerde rol oynar(22, 25, 27-30, 33, 34).



Şekil 2.4 Akt'nin etkileri. Bellacosa, Kumar ve diğerleri 2005 (28)'den alınmıştır.

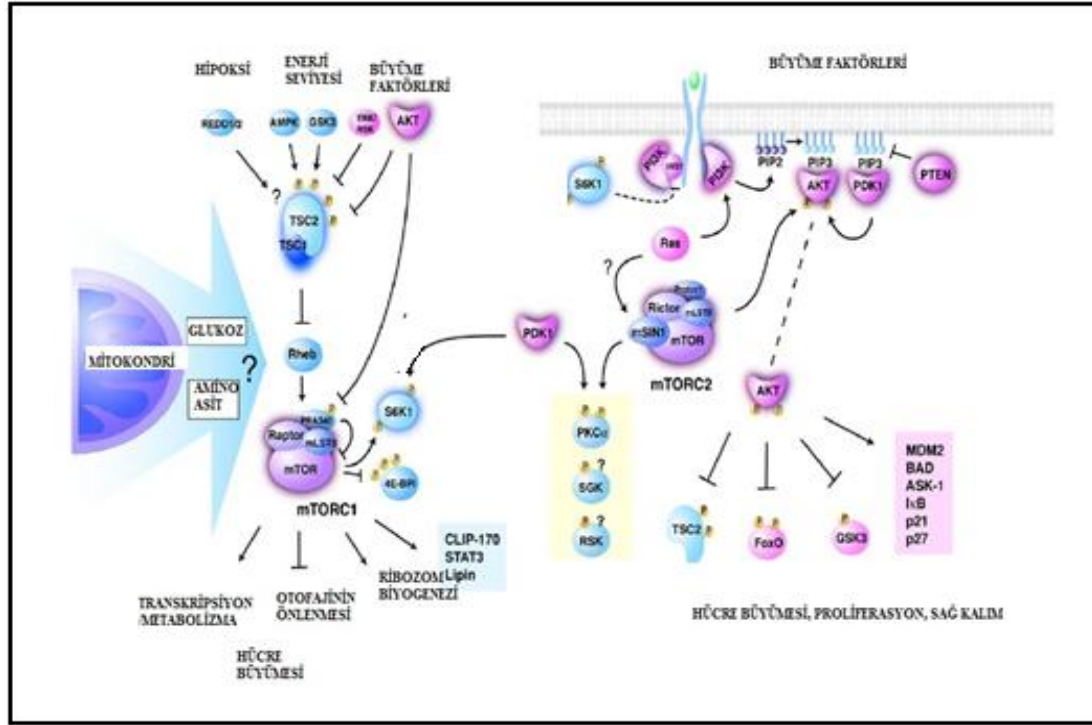
mTOR, serin/treonin kinaz olup mTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) ve mTORC2 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 2*) olarak adlandırılan 2 farklı kompleks ile işlev görür. PI3K/Akt vb sinyal yolları, mitojenik sinyaller, besin alımı, hücre içi enerji ve oksijen seviyesine göre hücre büyümesi ve protein sentezini düzenler (35-41).

mTOR aktivasyonu TSC1, TSC2 ve Ras ailesinden Rheb (*Ras homolog enriched in brain*)'i içeren bir olaydır. TSC1 ve TSC2 ile kompleks halinde bulunan Rheb'in aktivasyonu TSC2 tarafından önlenmektedir. Normal durumda TSC2'ye bağlı olan GTP (Guanozin trifosfat) Akt tarafından TSC2'nin fosforile edilmesi sonucu Rheb'e bağlanır. Rheb mTORC1'de mLSTS8'e bağlanarak mTOR'u aktive eder. Aynı zamanda Akt PRAS40'I fosforile ederek mTOR üzerindeki inhibitör etkisini kaldırır (17, 35, 37, 40, 42-44).

mTORC1; mTOR katalitik alt birimi, Raptor (*Regulatory associated protein of mTOR*), PRAS40 (*Proline Rich Akt Substrate 40 kDa*), mLSTS8 (*Mammalian lethal with sec 13 protein 8*), Deptor (*Dep domain containing mTOR interacting protein*), Tti/Tel 2 kompleksinden oluşur. mTORC1 iki önemli proteini fosforilleyerek translasyonda hızla artışa sebep olur ve bu şekilde protein sentezini düzenler. S6K (Ribozomal protein S6 Kinaz)' yı fosforile ederek ribozomal protein ve ribozom biyogenezi ile ilgili proteinlerin ekspresyonunu sağlar. 4E-BP1 (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein*) fosforile ederek eLF4E (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E*) üzerindeki inhibitör etkisini sonlandırır. Siklin-D1, c-myc, Bcl-2, Bcl-XL, VEGF gibi proteinlerin ekspresyonunu sağlar (17, 36, 43, 44).

Bunlara ek olarak mTORC1 TIF-1A (*Transcription Initiation Factor-1A*)'yı fosforile ederek RNA polimeraz 1 ile etkileşimini, Maf-1 (RNA polimeraz III represörü) baskılayarak tRNA transkripsiyonunu, SREBP1/2 (*Sterol Regulatory Element Binding Protein 1/2*) aktive ederek membran yapısına katılacak lipidlerin sentezini, DAP1 (*Death Associated Protein1*) vb proteinleri baskılayarak otofajinin önlenmesini sağlar (17, 36, 43, 44).

mTORC2; mTOR katalitik alt birimi, Rictor (*Rapamycin insensitive companion of mTOR*), PRAS40, mLST8, mSIN1 (*Mammalian stress-activated protein kinase 1*), Tti/Tel 2 kompleksinden oluşur. Akt, SGK1 (*Serum and Glucocorticoid induced kinase 1*), PKC α (Protein Kinaz C α) vb birçok proteini fosforile eder (17, 44).



Şekil 2.5 mTOR'un etki mekanizmaları. Guertin ve Sabatini 2007 (35)'den alınmıştır.

PI3K'in aktivasyonu sonucu oluşan PIP₃ ikinci mesajcı olarak görev yapan ve pek çok sinyal yolağını etkileyen bir moleküldür. PIP₃ hücre içi seviyesi, PI3K regülasyonu ve PIP₃ fosfatazların aktivasyonu ile kontrol edilmektedir. PTEN (*Phosphatase and Tensin Homologue*) ve SHIP (*SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase*) PIP₃'den PIP₂ oluşumunu sağlayarak sinyal yolağının kontrolünü sağlarlar (22, 23, 26).

2.2.1 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı İnhibitörleri

PI3K/Akt/mTOR yolağının pek çok kanser türünde aşırı uyarılmış oluşu bu yolağın bileşenlerine ait inhibitörlerin geliştirilmesini sağlamıştır (45).

PI3K proteinlerinin inhibisyonu, p110 katalitik alt birimini hedefleyen inhibitörler ile sağlanmaktadır. Bu inhibitörlerden Wortmannin p110 alt biriminin Lizin802 rezidüsü ile kovalent bağ kurarak geri dönüşümsüz şekilde PI3K'yı inhibe eder. LY-294,002 kompetitif ve geri dönüşümlü olarak p110 katalitik alt birimin ATP bağlanma bölgesindeki Valin882, Lizin883, Metiyonin804, Triptofan812, Metiyonin953'e bağlanarak PI3K'ı inhibe eder (46, 47). İzofom seçici inhibitörler ise tedavi edici özellikleri çoğaltılmış, toksik özellikleri azaltmış olup daha kuvvetli inhibisyon sağlarlar (48-50). Bu inhibitörlere örnek olarak GD0491, NVPBEZ235 (51-54), GD40941, XL147, ZSTK474 vb verilebilir (45, 49, 50, 55).

Akt inhibisyonu ise fosfotidilinozitol analogları, ATP (Adenozin trifosfat) kompetitif inhibitörleri, allosterik inhibitörler, PH bölüm inhibitörleri olmak üzere sınıflandırılabilirler. Böylece inaktive olan Akt hedef molekülleri etkileyemez hale gelir (32, 48-50, 56).

mTOR inhibitörlerinden rapamisin ve RAD001, CCI,779, Everolimus, Tesrolimus vb analogları hücre büyümesi ve çoğalmasını inhibe ederek anti-tümoral etki gösterirler. Rapamisin hücre içi reseptörü olan FKBP12 (*FK506-Binding Protein 12*)'ye bağlanarak kompleks oluşturur. Bu kompleks mTORC1'e doğrudan bağlanarak mTOR yolağının inhibisyonuna sebep olur. Ancak mTORC2 üzerinde etki göstermez (37, 38, 57-60).

2.2.2 PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı ve Meme Kanseri

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı proliferasyon, hücre transformasyonu, apoptozun önlenmesi, DNA tamiri, *multi-drug resistance 1* vb proteinlerin ekspresyonunu arttırarak ilaç direnci yaratmak gibi moleküler mekanizmalarda rolü olması nedeniyle kanser gelişimi ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır (38, 57, 61-66).

Kanser gelişiminde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı aktivasyonu üzerinde yapılan çalışmalar genelde iki mekanizma üzerinde durmaktadır. Bunlardan birincisi RTK aşırı uyarımı, ikincisi ise sinyal yolağı bileşenlerindeki somatik mutasyonlardır (67-69).

Meme kanserinde görülen PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı mutasyonlarından en önemlisi p110 α alt birimini kodlayan PIK3CA geninde meydana gelen mutasyonlar olup % 10 – 40 oranında görülürler. Bu mutasyonlar üç amino asidin başka amino asitler ile yer değiştirmesi sonucu meydana gelir. Mutasyonların meydana geldiği bölgeler ise kinaz bölümünde H1047R ve helikal bölümde E542K, E545K birimleridir. p85 α alt birimindeki mutasyonlar ise sıklıkla SH₂ bölümleri arasında görülür. Bu mutasyonlar p85 ile p110 alt birimi arasındaki etkileşimi inhibe ederek enzimatik fonksiyonun artışına yol açar (61, 70-76) .

Akt'deki mutasyonlar genellikle PH bölümündeki 17. amino asit olan lizinin glutamik asit ile yer değiştirmesi (E17K) şeklinde olup % 5 – 24 oranında görülürler. Bu mutasyon plazma membranına sürekli lokalizasyonu Serin 473'den sürekli fosforilasyonunu sağlar (61, 63, 66).

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı regülasyonunda önemli rol oynayan PTEN'de görülen mutasyonlar da oldukça önemli olup meme kanserinde % 50 oranında gözlenmektedir (25, 61, 66, 76, 77)

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı inhibitörlerinin kemoterapi (60, 78) endokrin terapi (tamoksifen, raloksifen vb ilaçlar) (59, 64, 65, 68, 69, 79-88) ve/veya radyoterapi (89-93) ile birlikte kullanıldığında, sinerjistik etki gösterdiği, ilaç direncini azaltarak tümör boyutunda küçülme ve gerilemeye sebep olduğu görülmüştür.

2.3 Noç Sinyal Yolağı

Noç sinyal yolağı basit omurgasızlardan, kompleks omurgalılara kadar korunmuş bir yoldur. Yirminci yüzyılın başlarında ilk kez *Drosophila melanogaster*'in kanatlarındaki dantelimsi, çentikli yapı dikkat çekmiş olup 1985'te

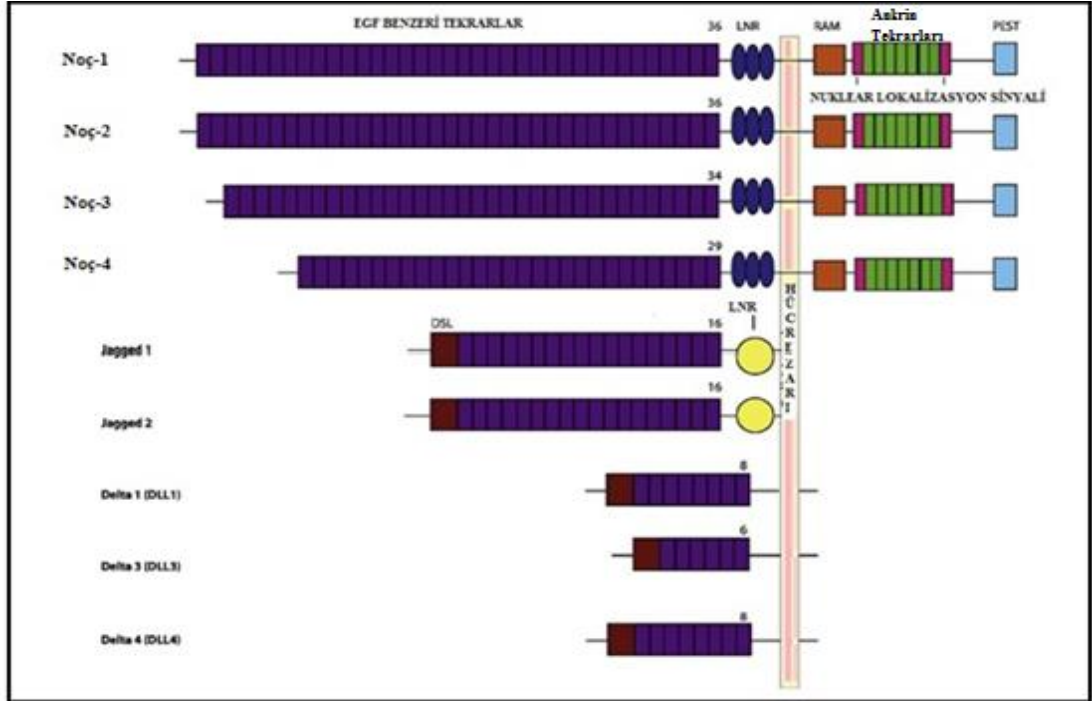
bu fenotipe neden olan gen klonlanmış ve çentik anlamına gelen Noç adı verilmiştir (3, 94). Noç sinyal yolağı çeşitli moleküler mekanizmalar ile hücre farklılaşması, çoğalması, canlılığı, adhezyon ve organ sınırı belirlenmesi gibi süreçlerde rol oynar. Noç sinyal yolağı embriyoda üç germ tabakasından (mezoderm, endoderm,ektoderm) türeyen dokuların gelişiminde, organ oluşumunda ve erişkin organizmada doku yenilenmesi üzerinde etkilidir (3-5).

Memelilerde Noç 1-4 olmak üzere dört adet Noç reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörler, hücre zarını bir kere kateden ve bir seri tipik motifler içeren glikoproteinlerdir. Tüm Noç reseptörleri oldukça benzer bir yapıya sahip olsa da, hücre dışı ve hücre içi bölümlerinde bir takım farklılıklar gösterirler. Reseptörlerin hücre dışı bölümünde 29-36 adet EGF (*Epidermal Growth Factor*) benzeri tekrarlayan birimler içerir. Hücre dışı bölümü takiben NRR (*Negative Regulator Region*) bölümü bulunur. Bu bölüm 3 adet sisteince zengin LNR (*LIN-12, Notch related region*) tekrarlarından oluşur ve reseptör dimerizasyonunda görevlidir. Noç'un hücre içi bölümünde ise 6 adet ankrin tekrarı, RAM (*RBP-J Associated Molecule*) bölümü, 2 adet NLS (Nuklear Lokalizasyon Sinyali), TAD (*Transcriptional Activation Domain*) ve C-terminalde PEST (Proline, Glutamat, Serin, Treonin) dizisi yer alır (3, 94-97).

Noç reseptörlerinin ligandları; memelilerde Delta ve JAG/Serrate (DSL) ailesine ait olup, Delta benzeri(II)-1, 3, 4, JAG1 ve JAG2 olmak üzere 5 adettir. Noç reseptörlerine benzer şekilde DSL ligandları tek geçişli transmembran proteinler olup EGF benzeri tekrarlayan birimler içerirler (3, 5, 94-96).

Yeni sentezlenmiş Noç reseptörleri bir dizi tranlasyon sonrası modifikasyona uğrar. Endoplazmik retikulumda EGF benzeri tekrarlar POFUT1 tarafından fukozilasyon (O-fukozil transferaz) ve Fringe (β 1,3-N-asetilglukozamin transferaz), Rumi tarafından glikozilasyona uğrar. Bu modifikasyonlar doğru katlanma ve ligand ile interaksiyonda önemlidir. Fonksiyonel Noç reseptörü, hücre yüzeyinde heterodimer halde bulunur. Bu yapının oluşması için golgi aygıtına taşınmasını takiben proteinler S1 kırılma bölgesinden furin benzeri konvertaz ile kırılır ve iki

adet alt birim oluşur, bu iki alt birim kovalent olmayan Ca^{+2} 'a duyarlı bir bağlantı ile bir arada tutulurlar (4, 94, 96-100).

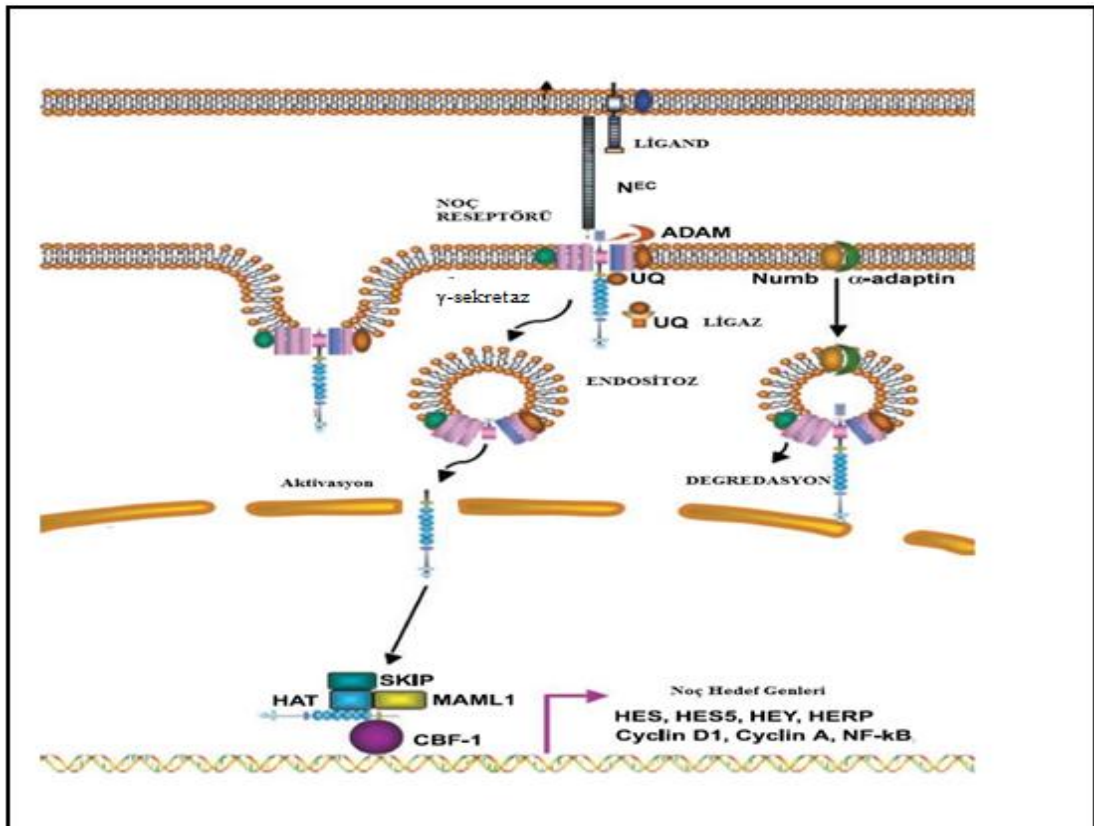


Şekil 2.6 Noç reseptörleri ve ligandlarının yapısal özellikleri. Wang 2011 (96)'den alınmıştır.

Noç sinyal yolağı; diğer sinyal yollarının tersine fosforilasyon kaskadları, ikincil mesajcılar gibi mekanizmalara ihtiyaç duymaz. Translasyon sonrası modifikasyonlar ile son şeklini alan Noç reseptörü membrana yerleştikten sonra ligand bağlanması ve internalizasyon ile sinyal iletimi başlar. Ligand-reseptör etkileşimi sonucu reseptörün hücre dışına bakan kısmında konformasyonel değişim meydana gelerek ikinci bir kırılma bölgesini açığa çıkarır. İkinci kırılma ADAM (*A Disintegrin and Metalloproteinase*) ailesinden TACE (*TNF- α Converting Enzyme*) tarafından gerçekleştirilir (3, 94, 101-103). Bu kırılma membranın hücre dışına yakın kısmında gerçekleşir ve membrana bağlı Noç formunu oluşturur. Üçüncü kırılma zar içi proteolitik yıkım olup γ -sekretaz (Presenilin $\frac{1}{2}$, Nikastrin, Pen-2 ve Aph-1) kompleksi tarafından gerçekleştirilir (3, 102, 104). Bu kırılmalar sonucu serbestleşen NICD (*Notch Intracellular Domain*) hücre çekirdeğine girer (3).

NICD hücre çekirdeğine girdiğinde, DNA'ya doğrudan bağlanamadığından RBP-J (*Recombination Signal Binding Protein-J*) ile birleşir ve RBP-J bağlama bölgesi içeren genlerin transkripsiyonunu aktive eder. NICD ve RBP-J transkripsiyon faktörü olan CSL (CBF1, Su(H), LAG-1) kompleks oluşturur. Bu yapıya transkripsiyonel aktivatör protein ailesinden MAML (*Mastermind Like*), SKIP (*Ski-interacting Protein*), histon asetil transferazlar p300 ve PCAF (*P300/CBP Associated Factor*)'ın da katılımı ile transkripsiyonel aktivatöre dönüşür ve bu şekilde Noç hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatır. Bu genler arasında Hes (*Hairy/enhancer-of-split*), HRT (*Hairy-related Transcription Factor*), Hey (*Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif*), p21, siklin D1, siklin A, NF- κ B vb genler bulunur (3, 94, 100, 105).

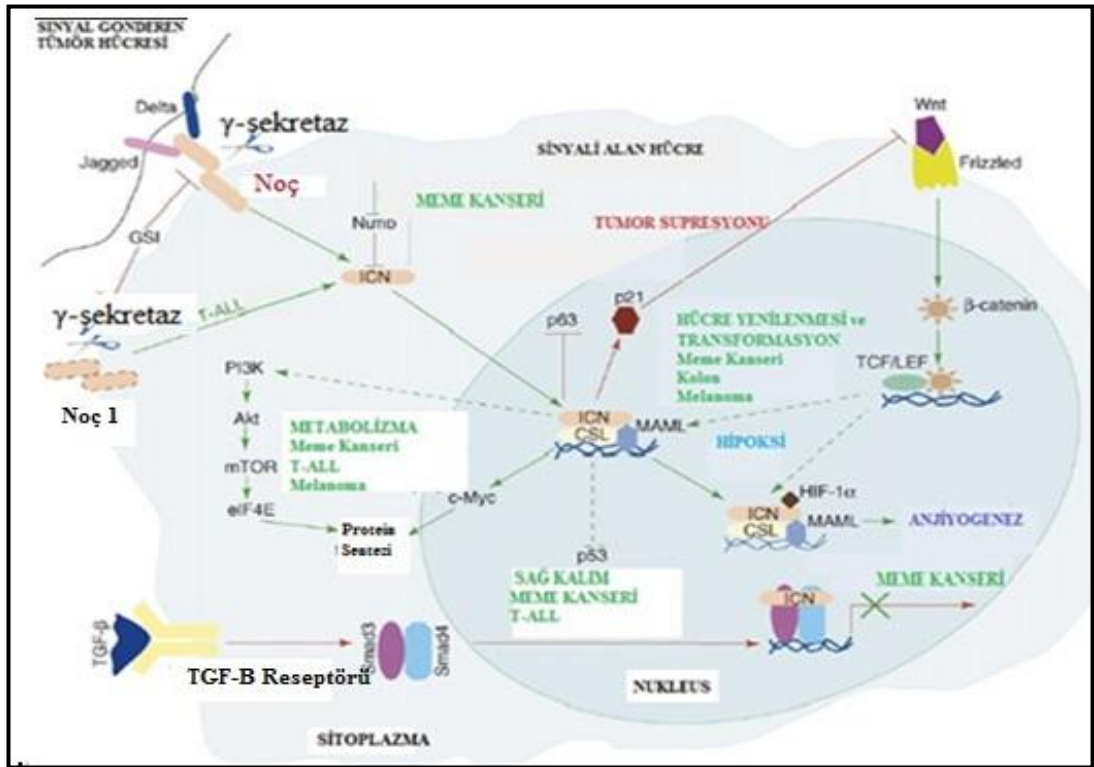
Sinyalin sonlanımı, siklin bağımlı kinaz 8, Numb, E3 ubikuitin ligaz Fbw7, Deltex ve daha bir çok enzimin fosforilasyon ve ubikitinleme mekanizmaları sayesinde Noç reseptörünün degradasyonuna bağlıdır (3, 5, 96, 102, 106, 107).



Şekil 2.7 Noç Sinyal yolağı. Miele 2006 (3)'dan alınmıştır.

2.3.1 Noç Sinyal Yolağı ve Meme Kanseri

Noç reseptörleri veya ligandlarının aşırı ekspresyonu, mutasyonu ve degradesyonda rol oynayan Numb vb genlerin kaybı geniş çapta bozukluklara sebep olmaktadır. Bunlara arasında intrahepatik safra kanalı yetmezliği olan Alagille Sendromu, CADASIL (*Cerebral Autosomal-Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*), T-hücre akut lenfoblastik lösemi, Spondilokostal Dizostoz sayılabilir. Mutasyona uğramış veya aktivitesi artmış olan Noç reseptörleri meme, prostat, pankreas, akciğer, servikal, kolon ve diğer kanser türleri ile ilişkilidir (4, 108-110).



Şekil 2.8 Noç sinyal yolağının kanseri ile ilişkisi. Roy, Pear ve diğerleri 2007 (103)'den alınmıştır.

Meme kanserinde Noç 1 ve Jagged-1 normalden daha fazla seviyede tümör oluşumuna, agregasyona ve zayıf prognoza sebep olmaktadır (111-115). Ayrıca Noç1'in hedef genlerinin proliferasyonu indükleyen genlerin transkripsiyonunu sağ kalma (10), PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı aracılığı ile p53 aracılı apoptozun

önlenmesine (9, 11-14, 116, 117), NF- κ B, VEGF ve matriks metalloproteinazların aktivitesini arttırarak metastaz, invazyona ve ilaç direncine sebep olmaktadır (118, 119).

Noç 1 ile birlikte Noç 4 reseptörünün de meme kanseri gelişiminde oldukça önemli rolü olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (114, 120, 121). Noç 4 ekspresyonunun artışı proliferasyona, invazyona ve kontakt inhibisyonun ortadan kalkmasına sebep olmuştur. Öte yandan PI3K/Akt sinyal yolağı hedeflerinden mdm-2'nin de Noç 4 ubiquitinlenmesine sebep olduğu bilinmekte olup bu yolağın aşırı aktivasyonu sonucu bu etkinin de ortadan kaldırıldığı bilinmektedir (106).

Öte yandan Noç 2 reseptörünün ise tümör gelişimini önlemekte olup, apoptozu sağladığı yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (122).

Bu durum Noç sinyalinin inhibe edilmesine yönelik ilaçların tasarımına yol açmıştır. Sinyal yolağı inhibe edilirken ligand ve reseptör ekspresyonu, ligand ubiquinasyonu, reseptör ligand bağlanması, ADAM ve γ -sekretaz aracılı bölünme, CSL kompleksi ile birleşme, translasyon sonrası modifikasyonlar vb mekanizmalar kullanılmaktadır (97, 123, 124).

Prelinik çalışmalarda en çok kullanılan yöntem γ -sekretaz aracılı proteolitik kırılmanın bu komplekse özgün inhibitörler ile engellenmesi olmuştur. Bu inhibitörler aspartil proteaz transisyon evresini taklit etmek üzere tasarlanmıştır. Yapılan çalışmalarda bu inhibitörlerin proliferasyon ve metastazı inhibe ettiği, kemoterapötik ilaçlarla beraber kullanıldığında ise ilaç direncini azalttığı görülmüştür (108, 112, 123, 125-129).

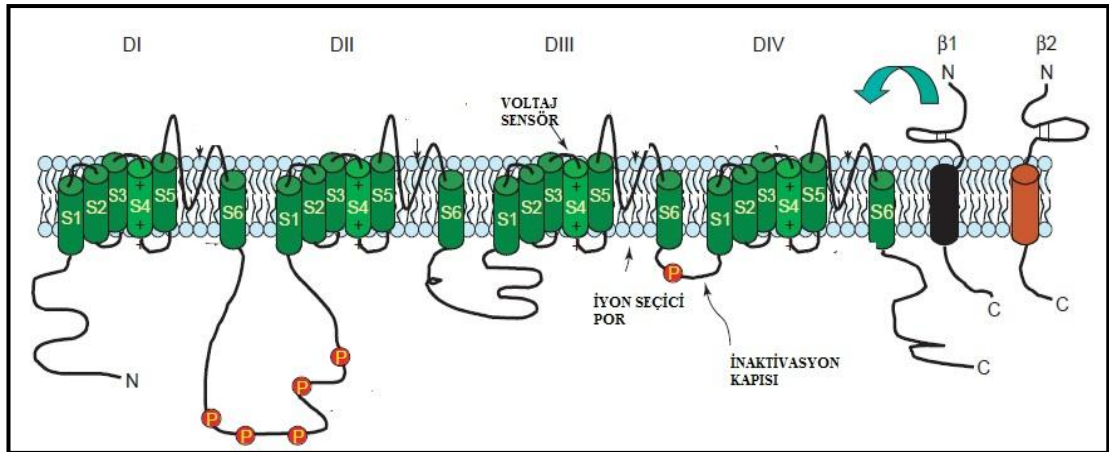
2.4 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları

Canlı tüm hücreler zar potansiyelinin sürdürülmesinden sorumlu iyon kanallarına sahiplerdir. Bu kanallar zar lipitleri, hücre içi ve hücre dışı pH, mekanik stres, zar voltajı ve elektrokimyasal iyon gradienti gibi parametrelere bağlı olarak iyonların hücre zarından geçişine izin veren proteinlerdir. Elektriksel uyarının üretiminde ve iyon dengesinin düzenlenmesinde görevli olan bu kanallar ligand

kapılı iyon kanalları ve voltaja duyarlı iyon kanalları olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Voltaja duyarlı iyon kanallarından, sodyum kanalı ilk olarak 1995 yılında sıçan prostat kanseri hücre hattında tesbit edilmiştir (130).

VGSC (Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları) genellikle nöron ve kas hücreleri gibi hücrelerde bulunmakla birlikte, glia, lenfosit, osteoblast, fibroblast ve endotel hücrelerinde de bulunurlar. Zar depolarizasyonu sırasında hücre içine hızla Na^+ iyonlarının geçişine aracılık ederek hücrelerde aksiyon potansiyelinin üretimini ve yayılımını sağlarlar (131).

Voltaj kapılı sodyum kanalları plazma membranını kateden proteinlerdir. Kanalin por oluşturan kısmı, dört adet homolog alt birimden oluşmaktadır (DI-DIV). Bu alt birimlerden her biri, altı adet zarı kateden bölüme sahiptir (S1-S6). Bu heterodimerik zar proteinleri genellikle por oluşturan bir α -alt birimi ve bu alt birim ile ilişki içerisinde bulunan bir yada daha fazla yardımcı β -alt birimlerinden oluşur (132, 133).



Şekil 2.9 Voltaj kapılı sodyum kanallarının yapısı. Clare ve diğerleri 2000 (132)'den alınmıştır.

Memelilerdeki VGSC α ailesinin en az dokuz işlevsel üründen oluştuğu, SCNA1-SCN11A genleri tarafından kodlandığı bilinmektedir. VGSC α alt birimi tek başına iyon seçici kanal oluşturma yeteneğine sahiptir. VGSC'lerin farklı dokularda farklı işleve sahip olmasının sebebi α -alt birimin en az farklı on gen tarafından

kodlanması ve alternatif kırılma yolu ile elde edilen çok sayıda izoformunun bulunmasından kaynaklanmaktadır (132, 134, 135). VGSC β 'nin ise SCN1-4B genleri tarafından kodlanan dört adet işlevsel ürünü olduğu bilinmektedir. VGSC β alt birimleri α -alt birimlerinin plazma membranına yerleşmesini ve kanalın diğer sinyal proteinleri ile iletişime geçmesini sağlayarak VGSC α aktivitesinin düzenlenmesine neden olur (134-137).

Voltaj kapılı sodyum kanalları invazyon, galvanotaksis, yana genişleme, çapraz göç, adhezyon, endositik zar aktivitesi, damar oluşumu ve nitrik oksit üretimi gibi hücrel süreçlerde rol oynarlar (132, 138).

2.4.1 Voltaj Kapılı Sodyum Kanalları ve Meme Kanseri

Çeşitli hücrel olaylarda rol oynayan özellikle potasyum, sodyum ve klor iyonlarına geçirgen olan iyon kanallarına ait gen ifadelerinin pek çok kanser türünde önemli oranda arttığı bilinmektedir. Bu kanser türlerine örnek olarak; meme, prostat, lenfoma, mezotelyoma, nöroblastom, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri verilebilir (131, 132, 138-140).

Kanser hücrelerinde VGSC'nın embriyonik formları görülmektedir. Bu formlar onkofötal genlerin alternatif kırılma farklılıklarından doğmaktadır ve bu sayede kanal sürekli olarak açık durumda tutulmaktadır. Gelişim esnasında Nav1.5'in D1:S3 bölgesinde alternatif kırılması sonucunda 5' ekzon (neonatal) ve 3' ekzon (*adult*) arasında 31 nükleotidlik fark görülür, bu farklılık 7 amino asitlik bir değişime sebep olmaktadır (141). Meme kanserinde görülen form Nav1.5'in neonatal formu olup D1:S3'ün hücre dışı ucunda korunmuş olan aspartatın lizin ile yer değiştirmiş halidir. Aspartat kalıntısının olmayışı bütün D1:S3 5' neonatal ekzonların karakteristik özelliğidir (134, 141-143).Yine yapılan çalışmalar ile elde edilen bilgiler yardımı ile metastatik meme kanseri biyopsi örneklerinde neonatal Nav1.5 seviyesinin artmış olduğu tespit edilmiştir, bu kanal hücrelerin metastatik özelliklerini destekleyici şekilde aktivite göstermektedir (144).

İnsan meme kanseri hücre hatlarında VGSC β alt birimlerinin gen ifadelerinin arttığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Örnek olarak $\beta 1$ 'in mRNA ve protein

seviyelerinin metastatik meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinde yüksek oranda artışı verilebilir (145).

Bölgesel yada genel VGSC aktivitesinden kaynaklanan Na^+ iyonu konsantrasyonundaki herhangi bir değişim, zar potansiyelini, Ca^{+2} ve pH dengesini, Na^+ bağımlı enzimlerin aktivitesini değiştirmek yolu ile metastatik hücre davranışları üzerinde etkili olabilmektedir. Örneğin MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar Na^+ iyonlarının hücre dışına geçişinin hücre zarı etrafındaki pH'nın düşüşüne dolayısı ile sistein katepsinlerin proteolitik aktivitesini arttırarak invaziv özelliğin artmasına sebep olmuştur (146, 147).

Yine iyon dengesinin değişimi iyon bağımlı pek çok kinaz proteinlerini de aktive etmektedir. Bunlara örnek olarak PKA (Protein Kinaz A), PKC (Protein Kinaz C), Ca^{+2} /kalmodulin bağımlı protein kinaz örnek verilebilir. Aktin iskeletini düzenleyen bu kinazlar invazyon, hücre göçü, salgılama ve vesiküler taşımayı arttıırırlar (7, 8, 148, 149).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Kimyasal Malzemeler

Deneyleerde kullanılan kimyasal maddeler; Hidroklorik asit (%37), H₂O₂ (Hidrojen peroksit) çözeltisi (%30), akrilamid- bisakrilamid çözeltisi (%30), gliserol, sodyum klorür (NaCl), sodyum florür (NaF), sodyum molibdat (Na₂MoO₄), sodyum pirofosfat (Na₄P₂O₇), sodyum ortovanadat (Na₃VO₄), sodyum hidroksit (NaOH), sodyum deoksikolat, imidazol, glisin, Tris HCl, Tris baz, SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), Fenitoin, γ -sekretaz inhibitörü, LY-294,002, proteaz inhibitör kokteyl, Etilen glikol tetraasetik asit (EGTA), Fenilmetilsülfonil florid (PMSF), Etilendiamin tetrasetik asit (EDTA), *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) yüksek glukozlu, Tripsin-EDTA çözeltisi (%0.25), izopropil alkol, protein moleküler ağırlığı belirleyici, *Ponceau S* boyası, *BCA kit* (Sigma, Almanya). *Phosphate buffered saline* (PBS) tablet, amonyum persülfat (APS), tetrametiletlen diamin (TEMED) , β -merkaptobetanol, *Triton X-100*, Dimetil sülfoksit (DMSO), Bovine serum albumin (BSA), *Tween 20* (Amresco, ABD). Rapamisin, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) (Serva, Almanya). Fetal bovine serum (FBS), *n* penisilin-streptomisin amfoterisin çözeltisi, L- Glutamin, tripan mavisi çözeltisi (Biological Industries, İsrail). Fosfo-p70S6 kinaz (Thr389) monoklonal antikoru, Fosfo-4E-BP1(Thr 37/46) monoklonal antikoru, Noç-4 monoklonal antikoru, MMP-9 monoklonal antikoru, TIMP1 monoklonal antikoru, anti-tavşan sekonder antikoru, anti fare sekonder antikoru, *20XLumiglo* ve *20XPeroxide* (Cell Signaling Techonolgy, Amerika). β -aktin monoklonal antikoru, anti tavşan sekonder antikoru, asetik asit, metanol (Merck, Almanya). Nitroselüloz membran (Amersham, Almanya).

3.2 Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı (2-8°)	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C)	Arçelik, Türkiye
Mikroplaka okuyucusu	Molecular Devices, ABD

Laminer hava akımlı kabin	Hera Cell, ABD
İnkübatör	Hera Cell, ABD
Manyetik Karıştırıcı	İKAMAG, Türkiye
Ters fazlı mikroskop	Nikon TMS, Japonya
Analitik Terazı	Mettler, İsviçre
Santrifüj	Nüve, Türkiye
pH metre	Orion, ABD
Çalkalayıcı	Heidolph, Almanya
Elektroforez cihazı	BioRad, ABD
Western blot transfer cihazı	Biorad, ABD
Otomatik pipetler	Gilson, Fransa
Kodak Gel Logic 1500	Carestream Healty Inc. , ABD

3.3 Yöntemler

Çalışmamızda insan metastatik meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinin kültürü yapılarak deneylerde kullanılmak üzere çoğaltıldı. Öncelikle hücrelere uygulanan inhibitörlerin proliferasyon üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile belirlendi. İnhibitörlerin mTOR üzerindeki etkileri p-p70S6(Thr389) kinaz ve p-4E-BP1(Thr 37/46), yolaklar arasında etkileşim olup olmadığını incelemek için Noç-4, MMP-9, TIMP-1 ekspresyonu Western Blot yöntemi ile değerlendirildi.

3.3.1 Hücrelerin Çözülmesi ve Ekimi

Sıvı azot tankından alınan dondurulmuş hücreler, 37°C' lik inkübatörde 1-2 dakika bekletildikten sonra, dikey laminar hava akımlı kabine aktararak, % 1 *penicillin-streptomycin amphotericin* çözeltisi, 2 mM L-Glutamin ve % 10 FBS içeren yüksek glukozlu besiyeri içeren 15 mililitrelik santrifüj tüpüne alındı.

Hücre süspansiyonu 1200 g' de 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılarak geride kalan pellete 1 mililitre besiyeri eklendi. Hücreler pipetlenerek, homojen bir karışım elde edildikten sonra kültür kaplarına alınarak, üzerlerine besiyeri eklendi.

Ters fazlı mikroskop altında incelendikten sonra %5 CO₂ içeren 37°C' lik inkübatöre yerleştirildi. Kültürün devamlılığını sağlamak için besiyeri her gün değiştirildi. Hücrelerin kültür kabını % 80 oranında kapladıkları günlerde ise hücreler, tripsinlenerek pasajlandı.

3.3.2 Tripsinizasyon

Kültür kaplarından atık besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, kabın içerisinde kalan besiyerinden arındırabilmek için oda sıcaklığına getirilmiş PBS ile hücreler iki kez yıkandı. Daha sonra kültür kabı içerisine % 0.25' lik Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek inkübatör içerisinde 2-3 dakika hücreler tripsin ile muamele edildi. Ters fazlı mikroskop altında hücrelerin kültür kabından tamamen ayrıldıkları görüldükten sonra tripsin hacminin iki katı olacak şekilde besiyeri kültür kabına ilave edildi. Hücre süspansiyonu 1200 g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pellet 1 mililitre besiyeri ile pipetlenerek Thoma lamında sayımı yapıldıktan sonra kültür kaplarına ekildi.

3.3.3 Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin bulunduğu kültür kaplarından besiyeri uzaklaştırılıp oda sıcaklığındaki PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, tripsinizasyon aşamasına geçildi. Dondurma tüpü içerisine 700 µl yüksek glukozlu besiyeri, 200 µl FBS, 100 µl

DMSO (%10 DMSO, %20 FBS, %70 besiyeri) karışımı hazırlandı. Santrifüjden sonra pelletin üzerine hazırlanan karışım eklenerek, hücrelere zarar verilmeden pipetaj yapıldı. İçerisinde izopropil alkol bulunan dondurma kabına, tüpler konularak -80°C 'de 10 saat bekletildi. Hücreler daha uzun süreli saklama sağlayabilmek için sıvı azot tankına alındı.

3.3.4 MTT Yöntemi ile Sitotoksisite Çalışmaları

MTT yöntemi, hücrelerdeki dehidrogenaz aktivitesini ölçen kolorimetrik bir yöntemdir. Canlı hücrelerdeki mitokondri, sarı renkli MTT boyasındaki tetrazolyum halkasını mitokondriye bağlı reaksiyon sayesinde suda çözünmeyen formazana indirger. Oluşan koyu mavi-mor renkli formazanın çözünmesiyle ortaya çıkan renk değişikliği değerlendirilir. Mitokondriyal dehidrogenazların toplam aktivitesi ile hücre çoğalması arasında doğrusal bir ilişki olduğundan, ortama eklenen kimyasal bileşiğin sitotoksik olması durumunda, hücreler canlılığını yitirecek formazan bileşikleri azalacak ve verilen absorbans düşecektir (150).

Bu yöntemde MDA-MB-231 hücreleri sayılarak 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. 24 saat 37°C , % 5 CO_2 'li ortamda tamamen yapışmış olan hücrelerin besiyeri, serumsuz besiyeri (%1 penisilin-streptomisin amfoterisin çözeltisi, 2 mM L-Glutamin içeren yüksek glukozlu besiyeri) ile değiştirilmiştir. 18 saat boyunca serumsuz besiyeri ile inkübe edilen hücrelere inhibitörler 100 μl olacak şekilde uygulanmıştır. Seçilen inhibitör dozları; rapamisin için 1, 10, 100 nM, γ -sekretaz inhibitörü için 1, 5, 25 μM , LY,294-002 için 1, 10, 100 μM , fenitoin için ise 7, 70, 700 μM (169)' lardır. Fenitoin çözücüsü olan NaOH, verilen dozlara göre ayarlanmış olup 7 μM için 3×10^{-7} N (Normal), 70 μM için 3×10^{-6} , 700 μM için 3×10^{-5} N'dir. Diğer inhibitörlerin çözücüsü olan DMSO ise, ortam hacminin % 0.1' inin üzerine çıkmayacak şekilde ayarlanmıştır. İlaçlar çözücülerinde hazırlandıktan sonra 0.20 μm ' lik filtre ile steril edilip hücrelere uygulanmıştır. Negatif kontrol kuyucuklarına (ilaç uygulanmamış hücre grubu, maksimum yaşam) inhibitörlerinin çözücülerini olan DMSO (γ -sekretaz inhibitörü, rapamisin, LY,294-002) ve NaOH (Fenitoin) içeren besiyeri eklenmiştir. Pozitif kontrol kuyucuklarına (minimum

yaşam) ise % 5' lik H_2O_2 içeren besiyeri eklenmiştir. İlaç uygulamasını takiben hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Uygulamadan 24, 48 ve 72 saat sonra MTT reaktifi ile hücre çoğalması değerlendirilmiştir. İnkübasyon süresi dolan grupların tüm kuyucuklarına MTT çözeltisi, PBS içerisinde (5mg/ml, pH 7,2) 25 μ l olacak şekilde ilave edilerek karanlıkta 37°C, % 5 CO_2 ' li ortamda 4 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda oluşan formazan bileşiklerini çözünür hale getirmek için tüm kuyucukların üzerine 0,01 N HCl içeren % 10' luk SDS çözeltisi eklendi ve 18 saat 37°C, %5 CO_2 ' li ortamda inkübe edildi. Oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.



Şekil 3.1 Sitotoksosite çalışmalarının şematik gösterimi

3.3.5 Hücre Lizatlarının Hazırlanışı

Hücrelerin bulunduğu kültür kaplarından besiyeri uzaklaştırılıp oda sıcaklığındaki PBS ile iki kez yıkandıktan sonra, tripsinizasyon aşamasına geçildi. Hücre sayımı yapıldıktan sonra, 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her kuyuya 3×10^5 hücre ekildi. 24 saat yapışmaları beklendikten sonra, 18 saat boyunca serumsuz besiyeri ile hücreler muamele edildi. Bu işlem ile hücrelerin aynı proliferasyon fazında yakalanması ve tam besiyerinde bulunan serumun kullanılan inhibitörlerle olası etkileşiminin azaltılması amaçlanmıştır. Serumsuz besiyeri ile inkübasyon süresi dolan hücrelere, daha önce belirtilmiş olan dozlardaki inhibitörler uygulandı.

Son derişimleri 50 mM TRİS-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, % 1 Triton X-100, %1 SDS, % 0,5 sodyum deoksikolat, 1 mM EGTA, 50 mM NaF olacak şekilde lizis tamponu, 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek +4°C'de muhafaza edildi. Lizat hazırlama aşamasından hemen önce tampon çözeltiye 2 mM İmidazol, 10 mM Na₄P₂O₇, 1,15 mM Na₂MoO₄, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1:10 dilüsyon oranında proteaz inhibitör kokteyli eklendi.

Lizat hazırlama işlemlerinin tümü buz üzerinde ve +4°C'de gerçekleştirildi. İnhibitörlerle ile inkübasyon süresi dolan hücreler, +4°C'de 5 dakika bekletildi ve besiyeri uzaklaştırılıp iki kez PBS ile yıkandı. Kuyu başına 150 µl lizis tamponu eklendi. Hücreler daha önce soğutulmuş olan kazıyıcı ile kaldırıldı. Daha önceden -20°C' de soğutulmuş 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine örnekler alındı. Örnekler +4°C' ye soğutulan santrifüjde 14000 g' de 15 dakika santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatant kullanılacağı zamana kadar -20°C' de muhafaza edildi.

3.3.6 Örneklerdeki Protein Miktarının Belirlenmesi

Western blot yöntemi için gerekli protein miktarını belirlemek amacıyla lizatlardaki protein miktarı Bisikoninik asit yöntemi ile hesaplandı (151). Bu yöntem için temin edilen *BCA kit* içerisinde bulunan *Reagent A* (0.1 N NaOH içerisinde bisikoninik asit, sodyum karbonat, sodyum tartarat ve sodyum bikarbonat) ve *Reagent B* (%4' lük bakır(II) sülfat pentahidrat) sırasıyla 50:1 oranında karıştırıldı. Standartlar 1000 µg/ml, 800 µg/ml, 600 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml olacak şekilde 1 mg/ml lizis tamponu içerisinde çözdürülmüş BSA'dan hazırlandı.

96 kuyucuklu plaklardaki her kuyuya 200 µl olacak şekilde hazırlanmış karışım konuldu. Standartlar için 12 kuyucuk, her lizat için 1 kuyu ve sadece lizis tamponu içeren kör için ise 2 kuyucuk kullanıldı. Örnekler, standartlar ve lizis tamponu 25 µl olacak şekilde kuyulara pipetlendi. Oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 2 saat inkübasyonu takiben spektrofotometrede 562 nm' de ölçüm yapıldı.

Standartların verdiği absorbans değerlerine göre elde edilen grafikten çıkarılan denkleme göre örneklerin mg/ml'inde bulunan protein miktarı bulundu.

3.3.7 Protein Analizleri

3.3.7.1 Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Western blot yöntemine geçilmeden önce hüre lizatları poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırıldı. Bu yöntemde kullanılan stok çözeltiler olan ayırıcı jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), paketleyici jel tamponu (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8), %10'luk SDS, yürütme tamponu (0,25 M Tris-HCl, 1,92 M glisin, pH 8,3) 10X olacak şekilde hazırlandı, kullanılmadan hemen önce 1X olacak şekilde seyreltildi. Yöntemde kullanılan jel ise %4-20 oranında hazırlandı. Bu jelin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3.1 Jellerin hazırlanışı

Jel (%)	Deiyonize Distile su (ml)	%30'luk akril.-bisakrilamid çözeltisi (ml)	Ayırıcı Jel Tamponu (ml)	Paketleyici Jel Tamponu (ml)	%10 SDS çözeltisi (ml)	%10 APS çözeltisi (µl)	TEMED (µl)
%4	6,1	1,3	-	2,5	0,1	50	10
%20	0,8	6,6	2,5	-	0,1	50	5

% 20' lik olarak hazırlanan ayırıcı jel daha önce hazırlanıp, jel dökülmeden önce APS ve TEMED eklendi. Ayırıcı jel döküldükten sonra yüzeyi düzeltmek için izopropil alkol kullanıldı. Jel donduktan sonra, üzeri kendi tamponu ile yıkanarak izopropil alkol uzaklaştırıldı. Hazırlanan paketleyici jel ayırıcı jelin üzerine dökülüp, üzerine tarak yerleştirilip polimerize olması beklendi.

Tablo 3.2 Örnek yükleme tamponunun hazırlanışı

Deiyonize distile su	0,5M Tris-HCl, pH:6.8	Gliserol	%10'luk SDS	%0,5'lik Bromfenol mavisi
3,55 ml	1,25 ml	2,5 ml	2 ml	0,2 ml

Örnek yükleme tamponu yukarıda belirtilen şekilde hazırlanıp kullanılmadan önce 950 µl tampona 50 µl β-merkaptotanol eklendi. -20°C 'den alınan örnekler 30

μg olacak şekilde 1:1 oranında örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı. 95°C ' de 5 dakika boyunca ısıtılarak denatüre edildi. Bu işlemden sonra örnekler 1 dakika buzun üzerinde bekletildi. İlk kuyuya protein moleküler ağırlık belirteci ($5\mu\text{l}$) olmak üzere örnekler ($40\mu\text{l}$) kuyulara yüklendi. Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilip, tanka 1X yürütme tamponu eklendi. Örnekler 100 volt sabit voltajda 1 saat 30 dakika yürütüldü (152).

3.3.7.2 Transfer ve Blotlama

Elektroforez işleminden sonra jeller 15 dakika boyunca transfer tamponunda (25 mM Tris-HCl, 192 mM glisin, % 20 metil alkol, % 0,1 SDS) dengelendi. Jelin boyutuna uygun olarak kesilip hazırlanmış nitroselüloz membran, filtre kağıtları ve fiber ped 2 dakika boyunca transfer tamponu ile dengelendikten sonra sırası ile fiber ped, 2 adet filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı, fiber ped ile hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek paketlenme yapıldı.

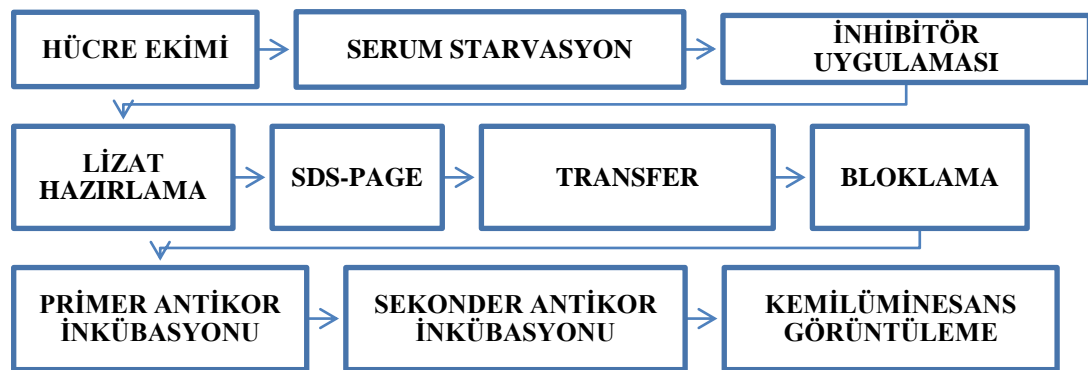
Bu işlemden sonra *Biorad Mini Transblot* cihazının tankı transfer tamponu ile doldurularak transfer işlemi 70 volt sabit voltajda $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 1 saat 30 dakikada gerçekleştirildi. Transferden sonra nitroselüloz membran *Ponceau S* boyası ile boyanarak transferin düzgün gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.

Membran TBS-T (20 mM Tris baz, 137 mM NaCl, %0,1 Tween 20) içerisinde çözülerek hazırlanmış % 5 oranında yağsız süt tozu içeren bloklama tamponuna alındı, 1 saat oda sıcaklığında bloklandı. Bloklama işleminden sonra membran 5 dakika boyunca TBS-T tamponu ile yıkandı.

Primer antikorla inkübasyon için önce % 5 oranında BSA içeren TBS-T tamponu hazırlandı. Fosfo-p70S6 kinaz (Thr389) monoklonal antikor, Fosfo-4E-BP1(Thr 37/46) monoklonal antikor, Noç-4 monoklonal antikor, MMP-9 monoklonal antikor, β -aktin monoklonal antikor ve TIMP1 monoklonal antikor 1:1000 dilüsyon hazırlanan tampon çözelti içine eklendi. Membranlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyunca primer antikor ile inkübe edildi. Bağlanmayan primer antikorun uzaklaştırılması için membran 5 dakikalık sürelerle 3 kere TBS-T tamponu ile yıkandı.

Sekonder antikor olarak kullanılan anti-tavşan sekonder antikor ve anti fare sekonder antikor, 1:2000 oranında % 5 BSA içeren TBS-T tamponunda hazırlandı. 1 saat oda sıcaklığında membran sekonder antikor ile inkübe edildi. Bağlanmayan sekonder antikorun uzaklaştırılması için membran 5 dakikalık sürelerle 3 kere TBS-T tamponu ile yıkandı.

Her membran için yükleme miktarını normalize etmek amacıyla membranlara monoklonal β -aktin ile tekrar blotlama yapıldı. Bu işlem için membran önce TBS-T ile oda sıcaklığında, 15 dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Membran tekrar %5 oranında yağsız süt tozu içeren bloklama tamponuna alındı, 1 saat oda sıcaklığında bloklandı. Bloklama işleminden sonra membran 5 dakika boyunca TBS-T tamponu ile yıkandı. β -aktin 1:1000 dilüsyon oranında, %5 oranında BSA içeren TBS-T içerisinde hazırlandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası membran TBS-T ile 5 dakikalık sürelerle 3 kere yıkandı. Sekonder antikor olarak kullanılan anti-tavşan sekonder antikor, 1:2000 oranında %5 BSA içeren TBS-T içerisinde hazırlandı. 1 saat oda sıcaklığında membran sekonder antikor ile inkübe edildi. Bağlanmayan sekonder antikorun uzaklaştırılması için membran 5 dakikalık sürelerle 3 kere TBS-T tamponu ile yıkandı.



Şekil 3.2 Western blot çalışmasının şematik gösterimi

3.3.8 Kemiluminesans Görüntüleme

Yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra membran kurumadan *20XLumiglo* ve *20XPeroxide* arttırılmış kemiluminesans kiti, kullanım protokolüne uygun olarak hazırlanan çözelti (9 ml deiyonize distile su, 0,5 ml *20XLumiglo*, 0,5 ml

20X Peroxide) ile sinyalin arttırılması gerçekleştirildi. 5 dakika boyunca karanlık ortamda, substrat solüsyonu ile inkübe edilen membran daha sonra Kodak Gel Logic 1500 görüntüleme sistemine alındı ve protein bantları gözlemlendi.

3.3.9 Dansitometrik Analiz

Image Quant TL programında bulunan moleküler görüntüleme analiz yazılımı kullanılarak dansitometrik analiz gerçekleştirildi. Her bağımsız deneyde, protein bantlarının yoğunlukları β -aktin bant yoğunluklarına oranlandı ve verilerin ortalaması hesaplandı.

3.3.10 İstatiksel Analiz

Hücrelere uygulanan inhibitörlerin doz ve günlere göre etkinliği Graphpad Prism programı kullanılarak "İki Yönlü Varyans Analizi" ile test edilmiştir. Deneylerin tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği "Tek Yönlü Anova" ile test edilmiştir. Protein ekspresyonu ve fosforilasyon seviyelerindeki değişim ise "Student t" testi ile analiz edilmiştir. $p \leq 0,05$ olan değerler istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanan İnhibitörlerin Sitotoksik Etkileri

Çalışmamızda insan metastatik meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleri üzerinde PI3K inhibitörü olan LY-294,002 1-10-100 µM, mTOR inhibitörü olan rapamisin 1-10-100 nM, Noç sinyal yolağı inhibitörü olan γ-sekretaz inhibitörü 1-5-25 µM, voltaja duyarlı sodyum iyon kanalı inhibitörü olan fenitoin 7-70-700 µM olmak üzere uygulanan inhibitör konsantrasyonlarının hücre canlılığına olan etkileri 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda MTT yöntemi ile araştırıldı.

İnhibitörlerin etkinlik ölçütü olan hücrelerin %50' sini öldüren inhibitör konsantrasyonu (IC50) değerleri aşağıda belirtilmiş olan formüle göre hesaplandı.

$$IC50 = [1 - (\text{Test-MI}) / (\text{MO-MI})] \times 100$$

Test: İnhibitör uygulaması yapılan hücrelerin verdiği absorbansın ortalaması

MO: İnhibitör uygulaması yapılmayan hücrelerin verdiği absorbansın ortalaması (Negatif kontrol)

MI: %5'lik H₂O₂ içeren besiyeri ile muamele edilen hücrelerin verdiği absorbansın ortalaması (Pozitif kontrol)

Buna göre, rapamisin için etkin süre 24 saat olup etkin doz 1 nM olarak belirlenmiştir. Ancak doz artışına bağlı olarak azalan hücre canlılık oranını bu inhibitör için görülmemiştir. Voltaja duyarlı sodyum kanallarının hücre çoğalmasında etkisi olmadığı için fenitoin uygulanmış hücrelerde, uygulanan doz ve zaman aralıklarında bir fark gözlenmemiştir. γ-sekretaz inhibitörü için etkin süre 48 saat ve sonrası olup etkin doz 12,5 µM olarak hesaplanmıştır. LY-294,002 iki için ise etkin saat 48 saat ve sonrası olup 10 µM olarak hesaplanmıştır.

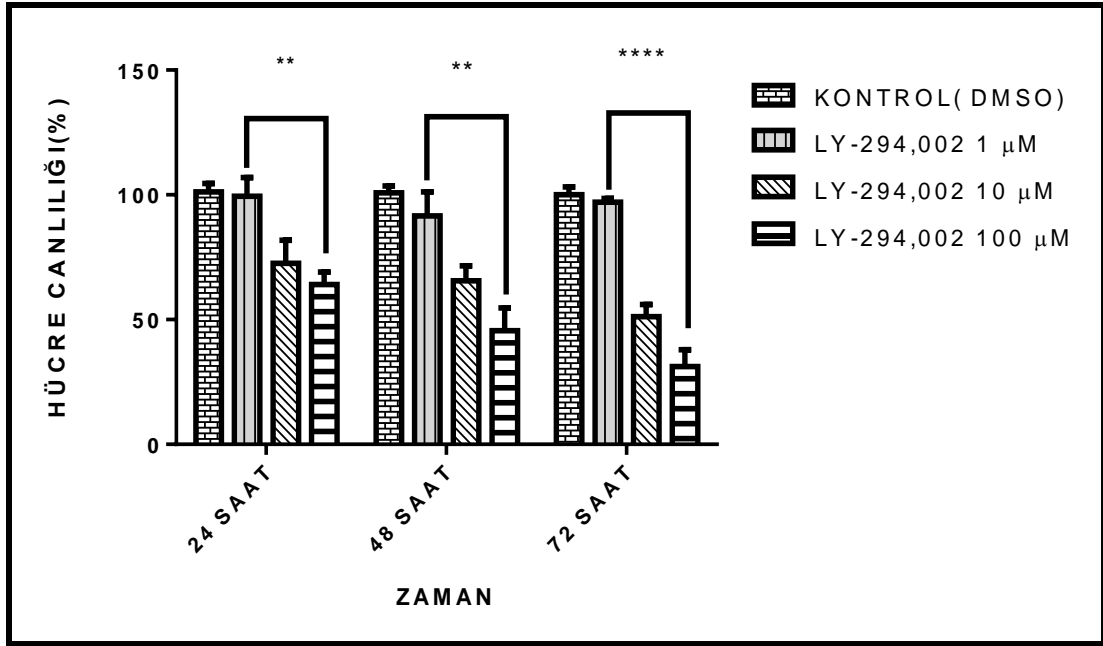
Tüm deneyler en 3 kez tekrarlanmış ve her uygulama üçlü örnek olarak çalışılmıştır.



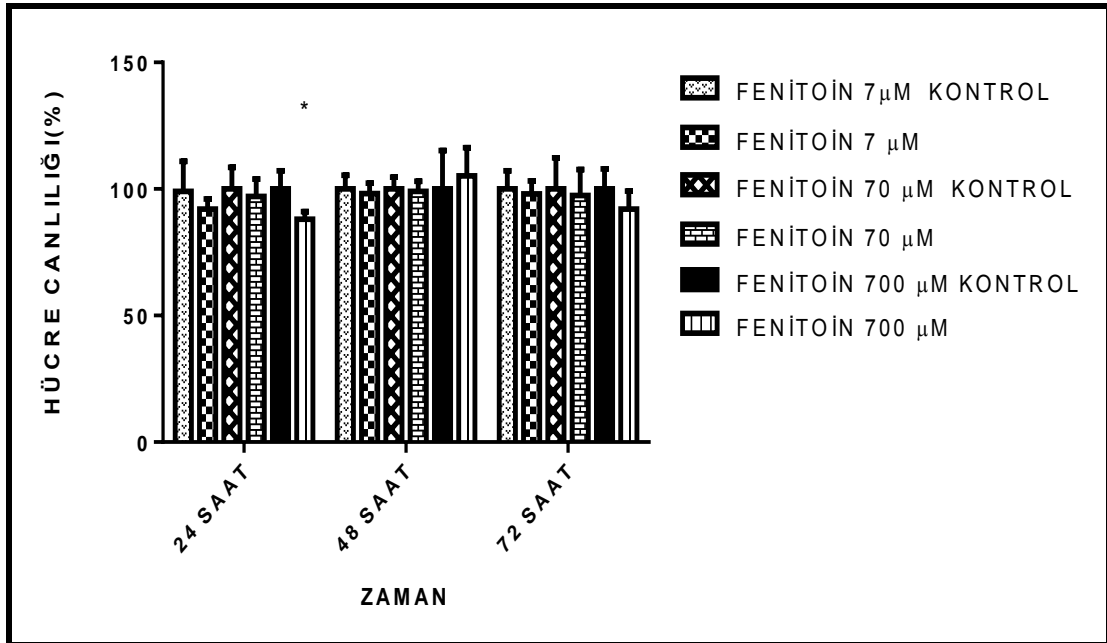
Şekil 4.1 Rapamisin'in zamana göre hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Kontrole oranla elde edilen inhibisyon sonuçları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)



Şekil 4.2 γ -sekretaz inhibitörünün zamana göre hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Kontrole oranla elde edilen inhibisyon sonuçları istatistiksel anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)



Şekil 4.3 LY-294,002'nin zamana göre hücre canlılığı üzerindeki etkisi. Kontrole oranla elde edilen inhibisyon sonuçları istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)



Şekil 4.4 Fenitoin'in zamana göre hücre canlılığı üzerindeki etkisi. ($p \geq 0,05$)

4.2 MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanan İnhibitörlerin mTOR Üzerindeki Etkisi

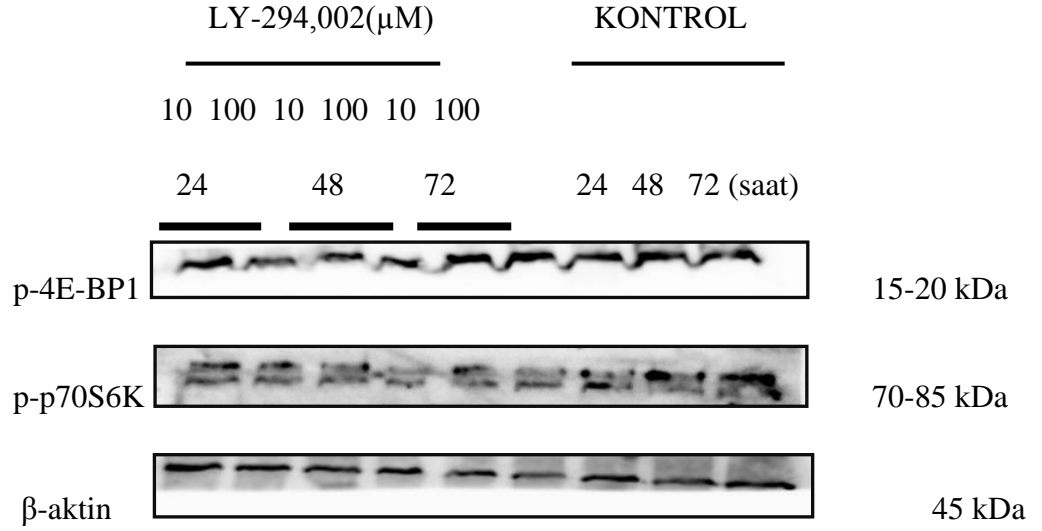
PI3K inhibitörü olan LY-294,002 10-100 μ M, mTOR inhibitörü olan rapamisin 1-10-100 nM, Noç sinyal yolağı inhibitörü olan γ -sekretaz inhibitörü 1-5-25 μ M, voltaja duyarlı sodyum iyon kanalı inhibitörü olan Fenitoin 7-70-700 μ M olmak üzere 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan bu inhibitörlerin mTOR üzerine olan etkisi incelendi. p-p70S6K (Thr389), p-4E-BP1 (Thr37/46) ve rapamycin uygulanan grup için Noç-4, MMP-9 ve TIMP1 ekspresyon düzeyleri Western Blot yöntemi ile değerlendirildi. İnhibitör uygulaması yapılmayan hücreler sinyal yolağının bazal aktivitesini gözlemlemek için kontrol olarak kullanıldı.

4.2.1 LY-294,002'nin p-p70S6K(Thr389) ve p-4E-BP1(Thr37/46) Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

PI3K inhibitörü olan LY-294,002 10 ve 100 μ M olmak üzere 24, 48, 72 saat boyunca uygulanmış ve mTOR üzerindeki etkileri mTOR'un substratları olan p-p70S6K (Thr389), p-4E-BP1 (Thr37/46) üzerinden Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; LY-294,002 10 μ M dozda p-p70S6K(Thr389) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 17, 48 saat sonunda % 26, 72 saat sonunda % 42 oranında azaltmıştır. 100 μ M dozda ise p-p70S6K(Thr389) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 18, 48 saat sonunda % 38, 72 saat sonunda % 45 oranında azaltmıştır.

LY-294,002 10 μ M dozda p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 35, 48 saat sonunda % 54, 72 saat sonunda % 43 oranında azaltmıştır. 100 μ M dozda ise p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 58, 48 saat sonunda %57, 72 saat sonunda %36 oranında azaltmıştır.



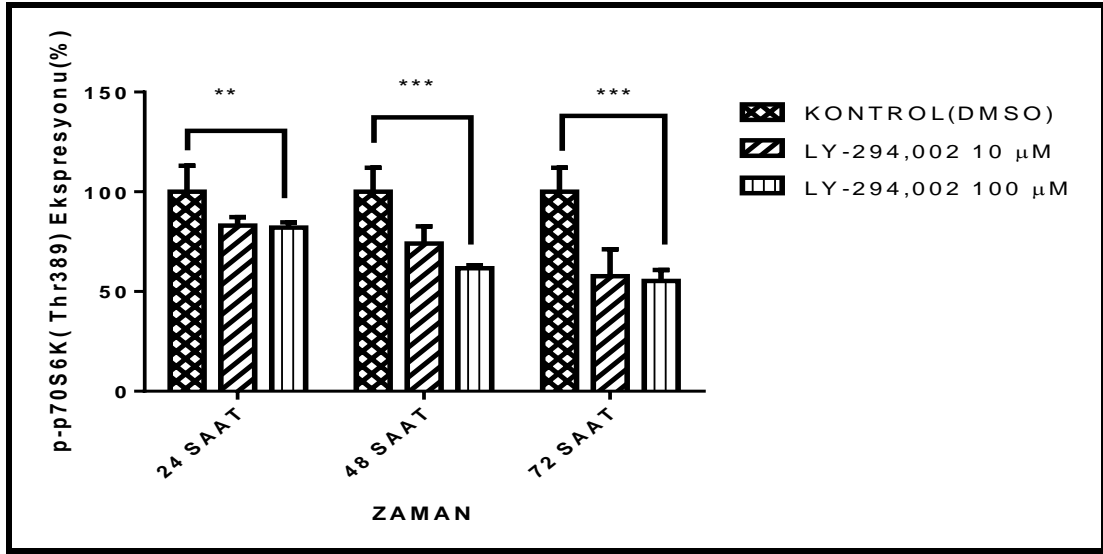
Şekil 4.5 LY-294,002 uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p- p70S6K (Thr389) ve p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonu

Tablo 4.1 LY-294,002 uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p70S6K (Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu. (n=3, p70S6K (Thr389)/β-aktin)

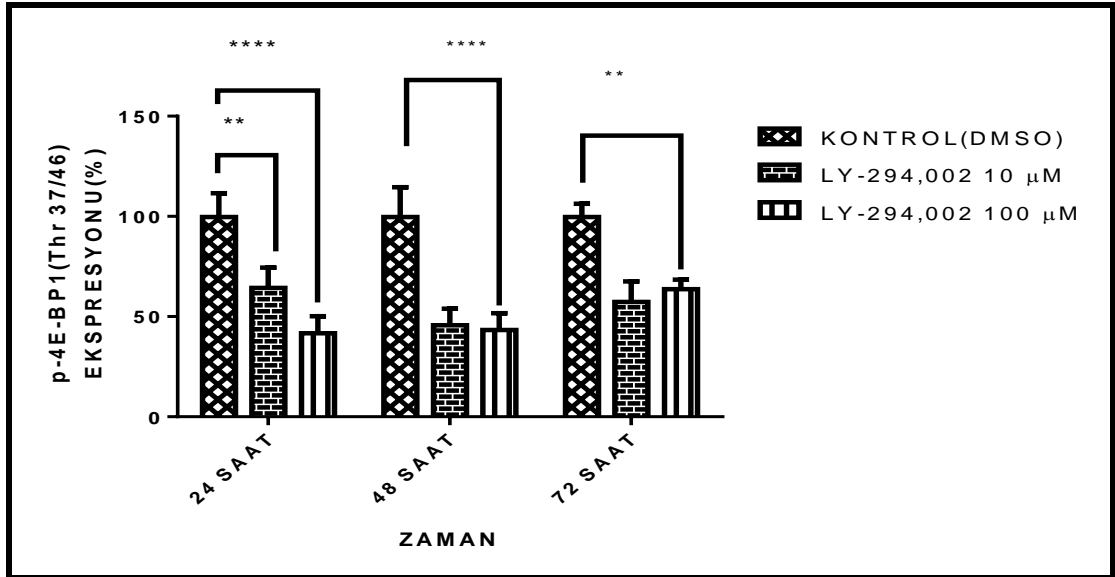
	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU ± STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL(DMSO)	1,493±0,122	1,570 ± 0,111	1,686 ± 0,183
LY-294,002 10 μM	1,249±0,066	1,167 ± 0,140	0,986± 0,226
LY-294,002 100 μM	1,233±0,035	0,986 ± 0,226	0,939 ± 0,097

Tablo 4.2 LY-294,002 uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p-4E-BP1(Thr37/46)/ ekspresyonuna ve ait ortalama relatif bant yoğunluğu. (n=3 , p- 4E-BP1(Thr37/46)/β-aktin)

	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU ± STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL(DMSO)	1,303±0,159	1,418±0,214	1,483±0,105
LY-294,002 10 μM	0,847±0,129	0,654±0,114	0,855±0,147
LY-294,002 100 μM	0,554±0,110	0,622±0,120	0,950±0,072



Şekil 4.6 LY-294,002' nin zamana bağlı olarak p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrole oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “**”, $p < 0,01$ “***”, $p < 0,001$ “****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)



Şekil 4.7 LY-294,002' nin zamana bağlı olarak p-4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrole oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “**”, $p < 0,01$ “***”, $p < 0,001$ “****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)

4.2.2 Rapamisin'in p-p70S6K (Thr389), p-4E-BP1 (Thr37/46), Noç-4, MMP-9 ve TIMP1 Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

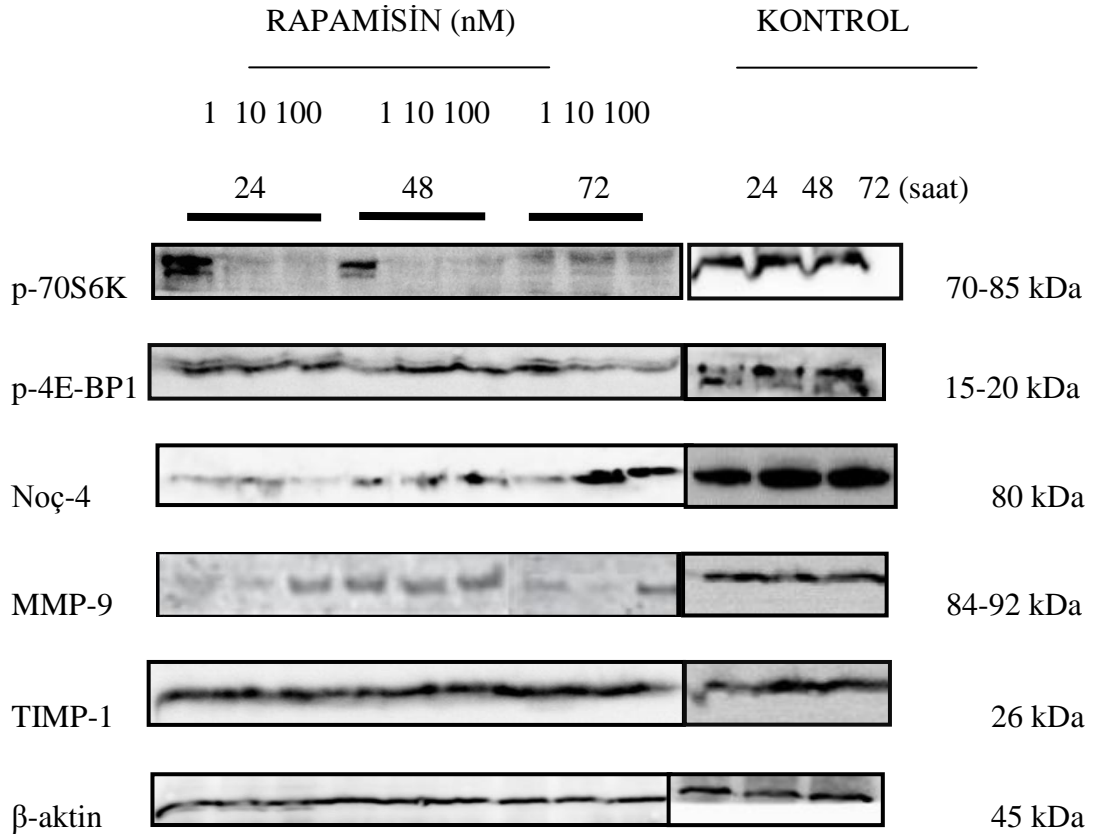
mTOR inhibitörü olan rapamisin 1,10 ve 100 nM olmak üzere 24, 48, 72 saat boyunca uygulanmıştır. İnhibitörün mTOR'un substratları olan p-p70S6K (Thr389) ve p- 4E-BP1(Thr37/46) üzerindeki etkilerine ek olarak Noç-4, MMP-9 ve TIMP1 üzerindeki etkileri de Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; rapamisin 1 nM dozda p-p70S6K (Thr389) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 22, 48 saat sonunda % 32, 72 saat sonunda % 39 oranında azaltmıştır. 10 nM dozda 24 saat sonunda % 48, 48 saat sonunda % 60, 72 saat sonunda % 31 oranında azaltmıştır. 100 nm dozda ise 24 saat sonunda % 54, 48 saat sonunda % 47, 72 saat sonunda % 29 oranında azaltmıştır.

1 nM dozda p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonu 24 saat sonunda % 23, 48 saat sonunda % 59, 72 saat sonunda % 30 oranında azaltmıştır. 10 nM dozda p-4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 28, 48 saat sonunda %26, 72 saat sonunda % 60 oranında azaltmıştır.100 nm dozda ise 24 saat sonunda % 36, 48 saat sonunda % 26, 72 saat sonunda ise % 61 oranında azaltmıştır.

Rapamisin'in Noç-4 ekspresyonu üzerinde elde edilen bulgulara göre ise; 1 nm dozda 24 saat sonunda % 73, 48 saat sonunda % 67, 72 saat sonunda % 51 oranında azaltmıştır. 10 nm dozda 24 saat sonunda % 52, 48 saat sonunda % 59, 72 saat sonunda ise % 48 oranında azaltmıştır. 100 nm dozda ise 24 saat sonunda % 83 oranında, 48 saat sonunda % 59, 72 saat sonunda ise % 36 oranında azaltmıştır.

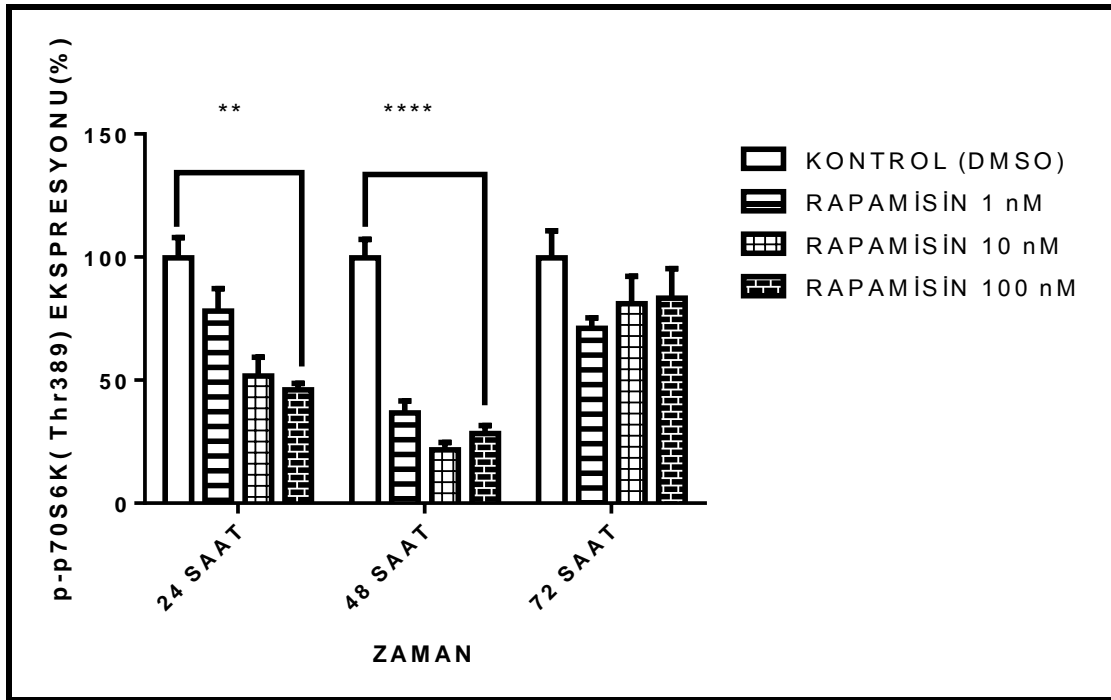
MMP-9 ekspresyonu üzerinde elde edilen bulgulara göre ise; 1 nm dozda 24 saat sonunda % 45, 48 saat sonunda % 54, 72 saat sonunda % 70 oranında azaltmıştır. 10 nm dozda 24 saat sonunda % 40, 48 saat sonunda % 64, 72 saat sonunda % 70 oranında azaltmıştır. 100 nm dozda ise 24 saat sonunda % 70, 48 saat sonunda % 63, 72 saat sonunda % 63 oranında azaltmıştır. TIMP1 ekspresyonu üzerine etkilerinden elde edilen bulgulara göre ise; 10 nm 24 saat sonunda % 2, 100 nm ise %13 oranında arttırmıştır. Belirtilen zaman dilimi ve konsantrasyonlar haricinde TIMP1 ekspresyon düzeyi sabit kalmıştır.



Şekil 4.8 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p- p70S6K (Thr389), p- 4E-BP1(Thr37/46), Noç-4, MMP-9 ve TIMP1 ekspresyonu

Tablo 4.3 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p70S6K (Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, p70S6K(Thr389)/β-aktin)

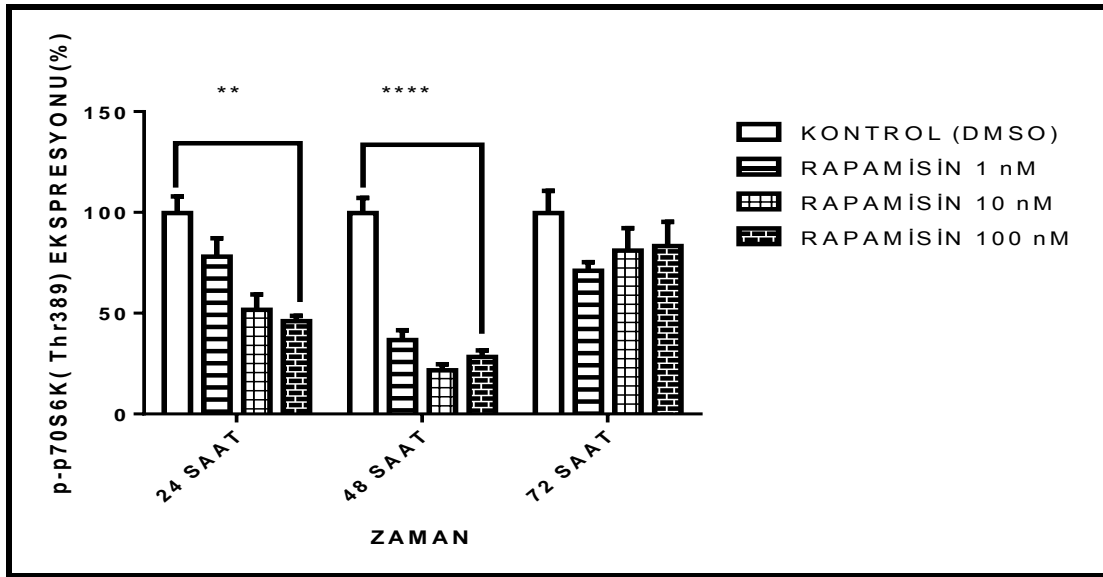
	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU ± STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL(DMSO)	1,493±0,122	1,570 ±0,111	1,686 ±0,183
RAPAMİSİN 1 nM	0,866±0,102	0,751 ± 0,104	0,673± 0,043
RAPAMİSİN 10 nM	0,576±0,084	0,448 ± 0,065	0,767± 0,103
RAPAMİSİN 100 nM	0,513±0,030	0,588 ± 0,063	0,787± 0,113



Şekil 4.9 Rapamisin'in zamana bağlı olarak p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrole oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)

Tablo 4.4 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu ($n=3$, p-4E-BP1(Th37/46)/ β -aktin)

	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL(DMSO)	1,303 \pm 0,159	1,418 \pm 0,214	1,483 \pm 0,105
RAPAMİSİN 1 nM	1,003 \pm 0,071	0,581 \pm 0,099	1,031 \pm 0,091
RAPAMİSİN 10 nM	0,938 \pm 0,137	1,049 \pm 0,095	0,589 \pm 0,130
RAPAMİSİN 100 nM	0,833 \pm 0,135	1,091 \pm 0,099	0,574 \pm 0,119



Şekil 4.10 Rapamisin'nin zamana bağlı olarak p-4E-BP1 (Thr 37/46) ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrole oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)

Tablo 4.5 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde Noç-4 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, Noç-4/ β -aktin)

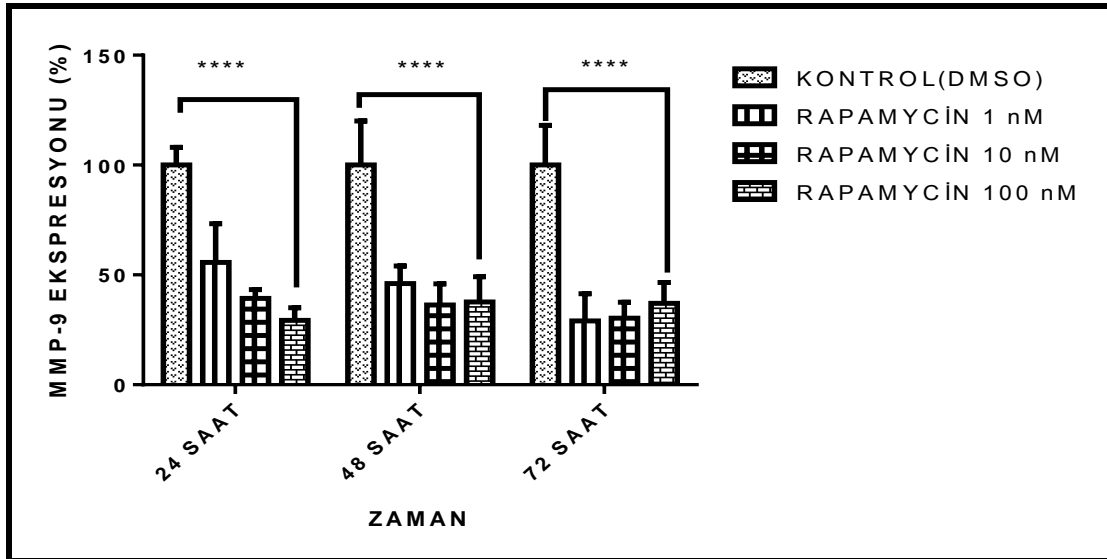
	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL(DMSO)	0,856 \pm 0,217	0,802 \pm 0,246	0,821 \pm 0,148
RAPAMİSİN 1 nM	0,811 \pm 0,050	0,391 \pm 0,028	0,371 \pm 0,050
RAPAMİSİN 10 nM	0,870 \pm 0,080	0,370 \pm 0,032	0,532 \pm 0,043
RAPAMİSİN 100 nM	0,653 \pm 0,128	0,212 \pm 0,036	0,444 \pm 0,081

Tablo 4.6 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde MMP-9 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3 , MMP-9/ β -aktin)

	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL(DMSO)	1,440 \pm 0,094	1,444 \pm 0,148	1,517 \pm 0,092
RAPAMİSİN 1 nM	0,392 \pm 0,057	0,482 \pm 0,069	0,751 \pm 0,129
RAPAMİSİN 10 nM	0,550 \pm 0,089	0,625 \pm 0,084	0,794 \pm 0,093
RAPAMİSİN 100 nM	0,260 \pm 0,058	0,635 \pm 0,069	0,980 \pm 0,135



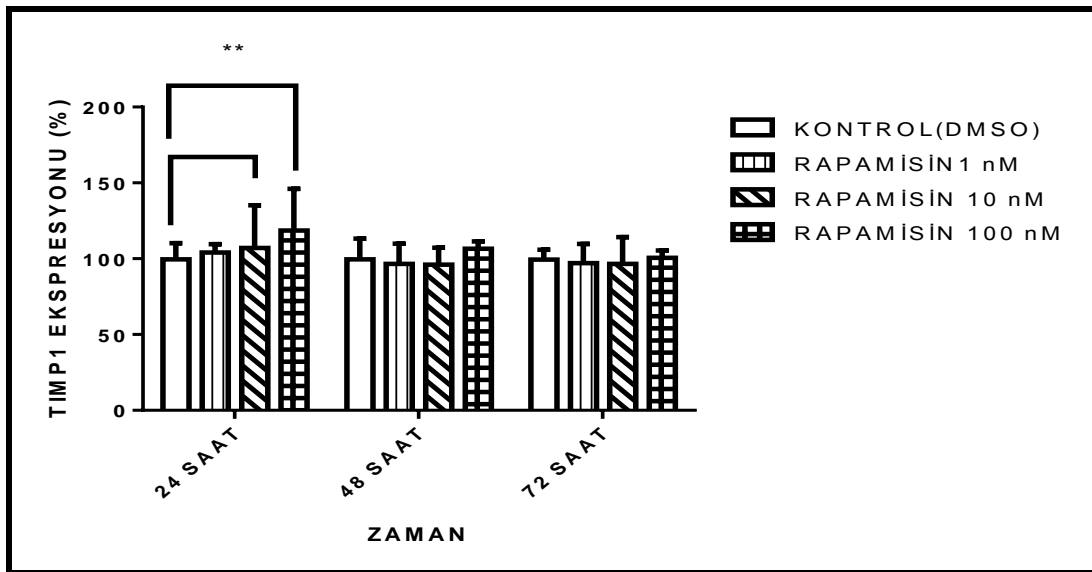
Şekil 4.11 Rapamisin'in zamana bağlı olarak Noç-4 ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrolle oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)



Şekil 4.12 Rapamisin'in zamana bağlı olarak MMP-9 ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrolle oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)

Tablo 4.7 Rapamisin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde TIMP1 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3 , TIMP1/ β -aktin)

	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL(DMSO)	1,526 \pm 0,162	1,546 \pm 0,206	1,563 \pm 0,102
RAPAMİSİN 1 nM	1,595 \pm 0,086	1,499 \pm 0,201	1,519 \pm 0,195
RAPAMİSİN 10 nM	1,641 \pm 0,425	1,489 \pm 0,181	1,522 \pm 0,277
RAPAMİSİN 100 nM	1,816 \pm 0,424	1,649 \pm 0,077	1,579 \pm 0,079



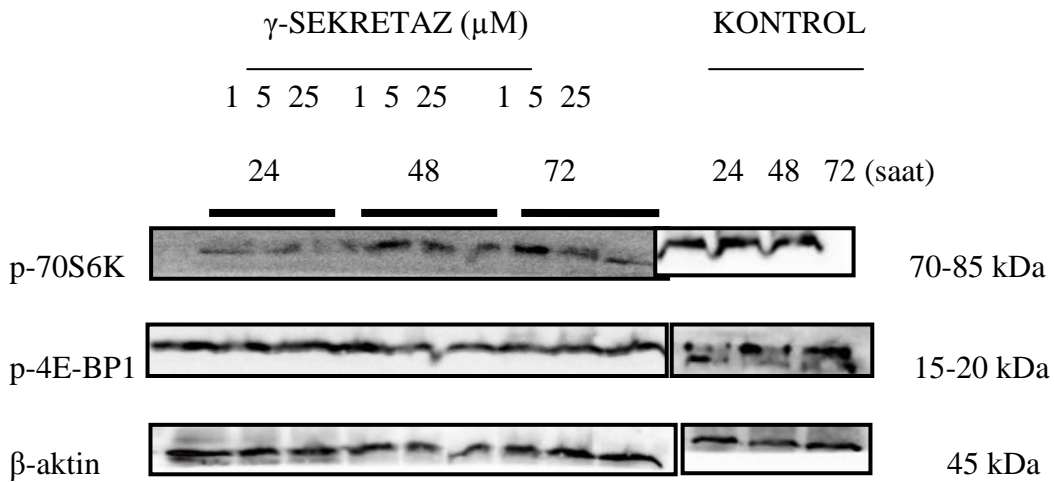
Şekil 4.13 Rapamisin'in zamana bağlı olarak TIMP1 ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrolle oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)

4.2.3 γ -Sekretaz İnhibitörünün p-p70S6K (Thr389) ve p-4E-BP1 (Thr37/46) Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Noç sinyal yolağı inhibitörü olan γ -sekretaz inhibitörü 1, 5 ve 25 μ M olmak üzere 24, 48, 72 saat boyunca uygulanmıştır. İnhibitörün etkisi mTOR'un substratları olan p- p70S6K(Thr389) ve p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonu üzerinden Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; γ -sekretaz inhibitörü 1 μ M dozda p-p70S6K(Thr389) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 58, 48 saat sonunda % 32, 72 saat sonunda % 39 oranında azaltmıştır. 5 μ M dozda 24 saat sonunda % 62, 48 saat sonunda % 43, 72 saat sonunda % 58 oranında azaltmıştır. 25 μ M dozda ise 24 saat sonunda % 63, 48 saat sonunda % 41, 72 saat sonunda % 66 oranında azaltmıştır.

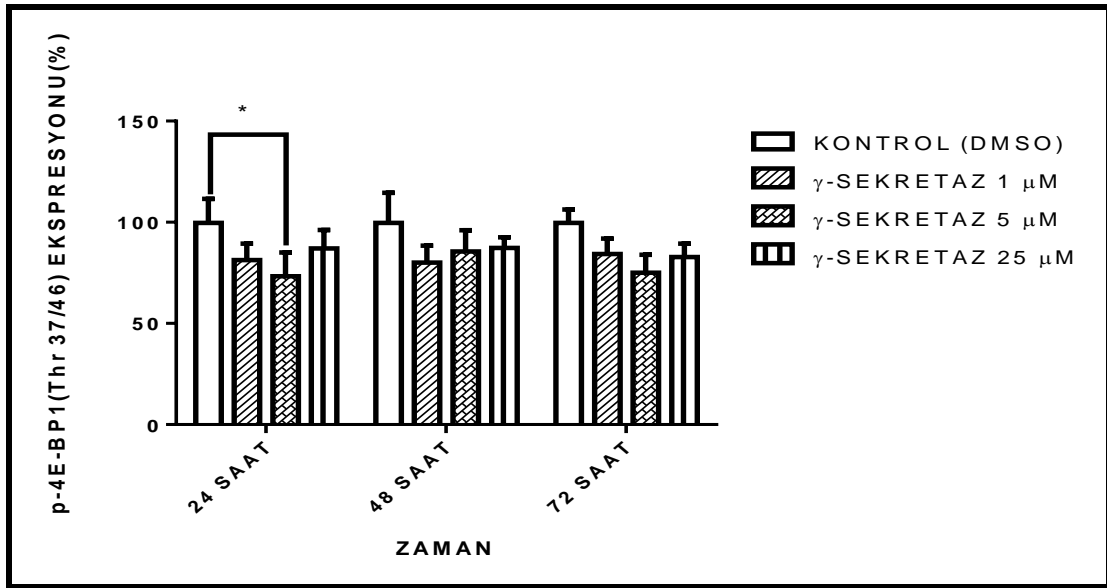
p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonunu ise 1 μ M dozda 24 saat sonunda % 19, 48 saat sonunda % 9, 72 saat sonunda % 16 oranında azaltmıştır. 5 μ M dozda 24 saat sonunda % 27, 48 saat sonunda % 13, 72 saat sonunda % 25 oranında azaltmıştır. 25 μ M dozda 24 saat sonunda % 13, 48 saat sonunda % 22, 72 saat sonunda % 17 oranında azaltmıştır.



Şekil 4.14 γ -sekretaz inhibitörü uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p- p70S6K(Thr389) ve p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonu.

Tablo 4.8 γ -sekretaz inhibitörü için p-4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, p-4E-BP1 (Thr37/46)/ β -aktin)

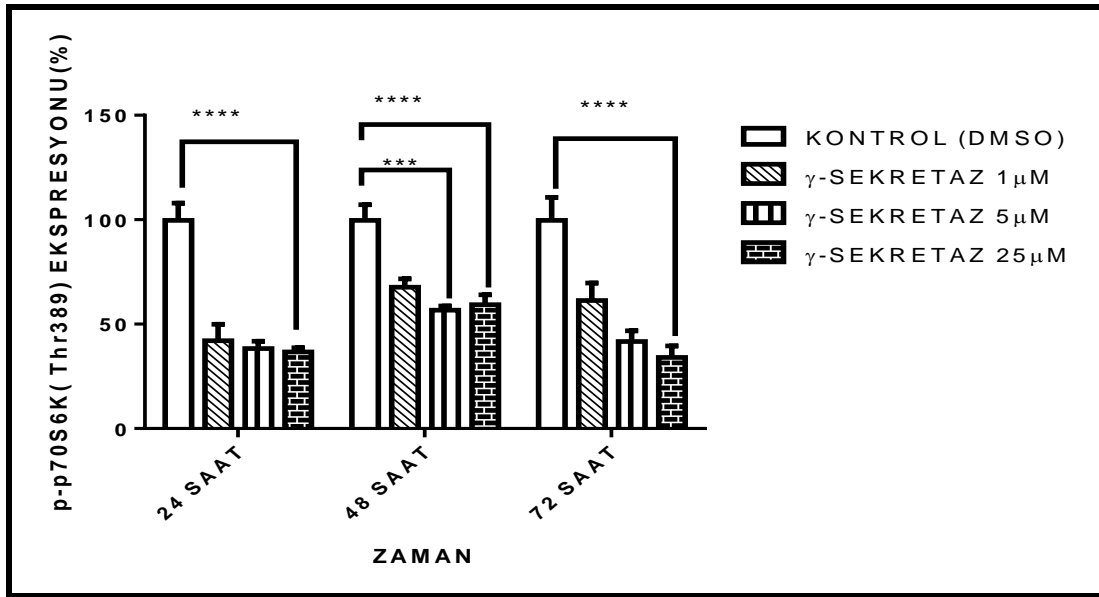
	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL(DMSO)	1,303\pm0,105	1,418\pm0,214	1,481\pm0,105
γ-SEKRETAZ İNHİBİTÖRÜ 1 μM	1,065\pm0,106	1,293\pm0,033	1,255\pm0,113
γ-SEKRETAZ İNHİBİTÖRÜ 5 μM	0,958\pm0,152	1,241\pm0,073	1,118\pm0,132
γ-SEKRETAZ İNHİBİTÖRÜ 25 μM	1,141\pm0,120	1,116\pm0,146	1,234\pm0,097



Şekil 4.15 γ -sekretaz inhibitörünün zamana bağlı olarak p-4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrole oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)

Tablo 4.9 γ -sekretaz inhibitörü için p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu ($n=3$, p-p70S6K (Thr389)/ β -aktin)

	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL(DMSO)	1,493 \pm 0,122	1,570 \pm 0,111	1,686 \pm 0,183
γ -SEKRETAZ İNHİBİTÖRÜ 1 μ M	0,629 \pm 0,119	1,072 \pm 0,061	1,042 \pm 0,142
γ -SEKRETAZ İNHİBİTÖRÜ 5 μ M	0,580 \pm 0,046	0,901 \pm 0,033	0,709 \pm 0,087
γ -SEKRETAZ İNHİBİTÖRÜ 25 μ M	0,556 \pm 0,298	0,938 \pm 0,078	0,578 \pm 0,095



Şekil 4.16 γ -sekretaz inhibitörünün zamana bağlı olarak p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrole oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)

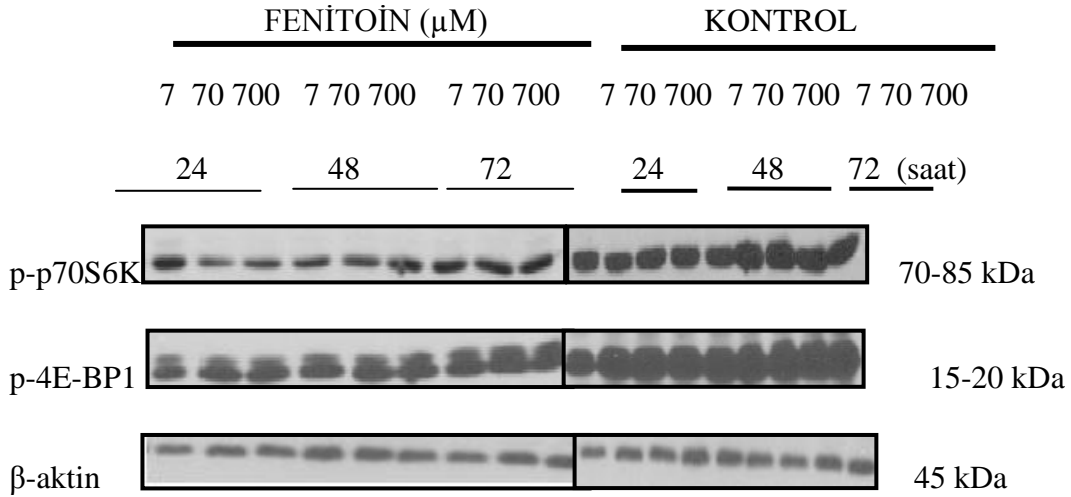
4.2.4 Fenitoin’in p-p70S6K(Thr389) ve p-4E-BP1(Thr37/46) Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Voltaj kapılı sodyum iyon kanalı inhibitörü olan fenitoin 7, 70 ve 700 μM olmak üzere 24, 48, 72 saat boyunca uygulanmıştır. İnhibitörün etkisi mTOR’un substratları olan p-p70S6K (Thr389) ve p-4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonu üzerinden Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; fenitoin 7 μM dozda p-p70S6K (Thr389) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 24, 48 saat sonunda % 17, 72 saat sonunda % 12 oranında azaltmıştır. 70 μM dozda 24 saat sonunda % 19, 48 saat sonunda % 13, 72 saat sonunda % 15 oranında azaltmıştır. 700 μM dozda ise 24 saat sonunda % 21, 48 saat sonunda % 26, 72 saat sonunda % 7 oranında azaltmıştır.

p-4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonunu ise 7 μM dozda 24 saat sonunda % 22, 48 saat sonunda % 23 oranında azaltmış, 72 saat sonunda etki gözlenmemiştir. 70

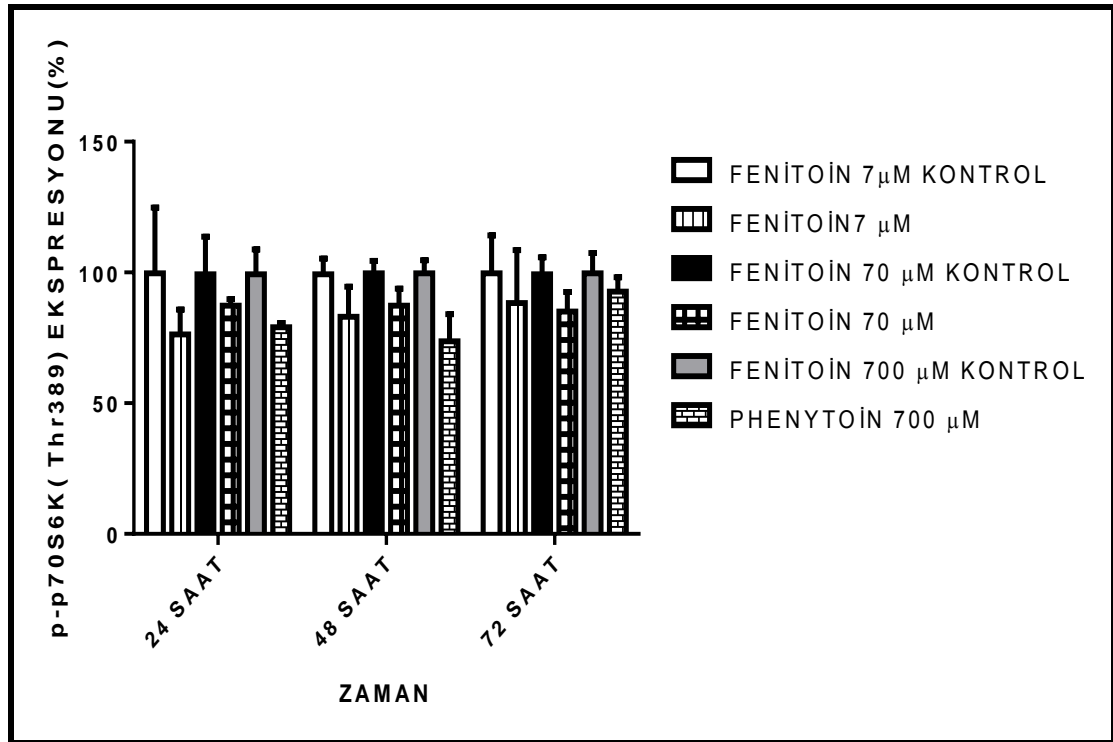
μM dozda 24 saat sonunda % 10, 48 saat sonunda % 16 oranında azalmış, 72 saat sonunda etki gözlenmemiştir. 700 μM dozda 24 saat sonunda % 4, 48 saat sonunda % 15, 72 saat sonunda % 11 oranında azaltmıştır.



Şekil 4.17 Fenitoin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p- p70S6K (Thr389) ve p- 4E-BP1(Thr37/46) ekspresyonu.

Tablo 4.10 Fenitoin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p70S6K (Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3 , p70S6K (Thr389)/ β -aktin)

	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
FENİTOİN 7 μM KONTROL	1,401\pm0,352	1,284\pm0,079	1,395\pm0,198
FENİTOİN 7 μM	1,071\pm0,132	1,073\pm0,151	1,283\pm0,278
FENİTOİN 70 μM KONTROL	1,200\pm0,171	1,168\pm0,058	1,439\pm0,098
FENİTOİN 70 μM	0,981\pm0,028	1,027\pm0,075	1,229\pm0,110
FENİTOİN 700 μM KONTROL	1,276\pm0,119	1,538\pm0,077	1,429\pm0,111
FENİTOİN 700 μM	1,104\pm0,023	1,141\pm0,159	1,331\pm0,074



Şekil 4.18 Fenitoin'in zamana bağlı olarak p-p70S6K(Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim). ($p \leq 0,05$)

Tablo 4.11 Fenitoin uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde p-4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu ($n=3$, p-4E-BP1 (Thr37/46)/ β -aktin)

	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
PHENYTOİN 7 µM KONTROL	1,509 \pm 0,170	1,527 \pm 0,349	1,509 \pm 0,394
PHENYTOİN 7 µM	1,188 \pm 0,142	1,190 \pm 0,160	1,504 \pm 0,124
PHENYTOİN 70 µM KONTROL	1,466 \pm 0,293	1,432 \pm 0,420	1,585 \pm 0,341
PHENYTOİN 70 µM	1,328 \pm 0,112	1,205 \pm 0,143	1,542 \pm 0,132
PHENYTOİN 700 µM KONTROL	1,554 \pm 0,413	1,626 \pm 0,225	1,560 \pm 0,446
PHENYTOİN 700 µM	1,503 \pm 0,400	1,392 \pm 0,096	1,389 \pm 0,160



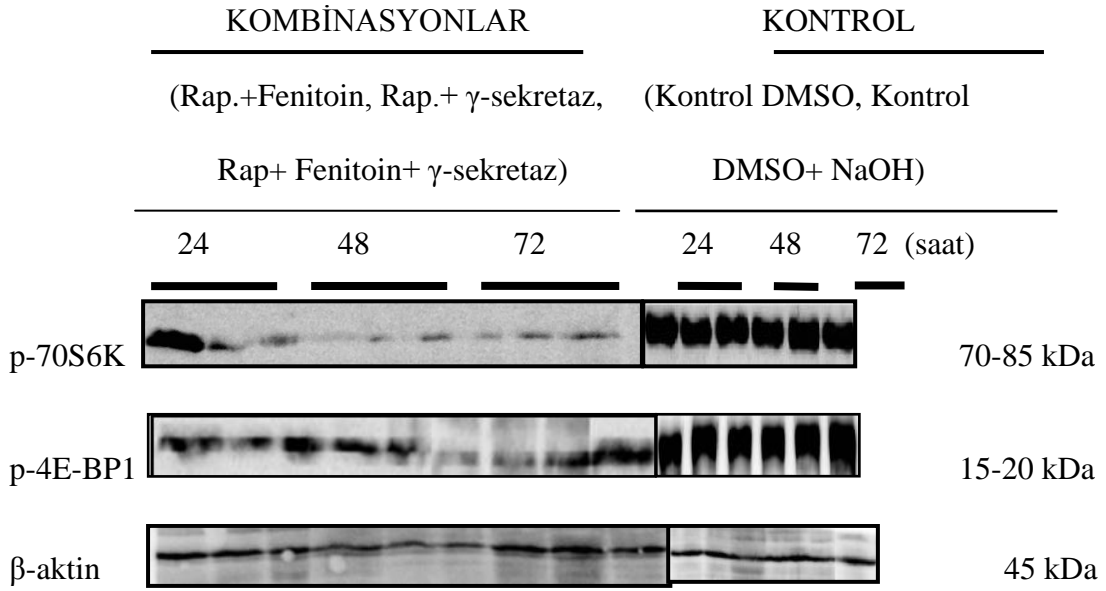
Şekil 4.19 Fenitoin'in zamana bağlı olarak p-4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonuna etkisi (% Değişim). ($p \leq 0,05$)

4.2.5 MDA-MB-231 Hücrelerine Uygulanan İnhibitör Kombinasyonlarının mTOR Üzerindeki Etkisi

IC50 değerleri MTT yöntemi ile belirlenen inhibitörler; rapamisin 1nM ve fenitoin 70 µM, rapamisin 1nM ve γ -sekretaz inhibitörü 12.5 µM, rapamisin 1nM, γ -sekretaz 12.5 µM ve fenitoin 70 µM olmak üzere uygulanmıştır. Kontrol olarak ise; rapamisin ve γ -sekretaz'ın çözücülerini olan DMSO ve fenitoin çözücüsü olan 3×10^{-6} N NaOH kullanılmıştır. Bu inhibitör kombinasyonlarının rapamisinin etkisini artırıp arttırmadığı ise mTOR' un substratları olan p-p70S6K (Thr389) ve p-4E-BP1 (Thr37/46) üzerinden Western Blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; rapamisin ve fenitoin p-p70S6K (Thr389) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 46, 48 saat sonunda % 58, 72 saat sonunda %55 oranında azaltmıştır. γ -sekretaz ve rapamisin 24 saat sonunda % 74, 48 saat sonunda % 78, 72 saat sonunda % 73 oranında azaltmıştır. İnhibitörlerin üçlü kombinasyonu

ise 24 saat sonunda % 71, 48 saat sonunda % 46, 72 saat sonunda % 71 oranında azaltmıştır.

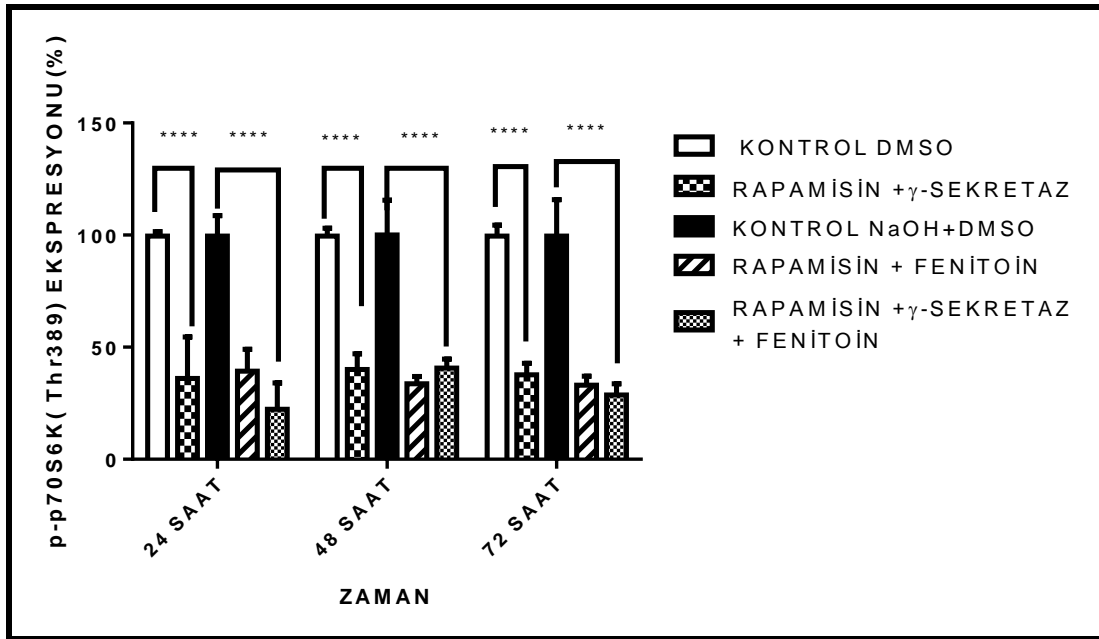


Şekil 4.20 MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan inhibitör kombinasyonlarında p-p70S6K (Thr389) ve p-4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonu

Rapamisin ve fenitoin p-4E-BP1 (Thr 37/46) ekspresyonunu 24 saat sonunda % 69, 48 saat sonunda % 82, 72 saat sonunda % 79 oranında azaltmıştır. γ -sekretaz ve rapamisin 24 saat sonunda % 81, 48 saat sonunda % 79, 72 saat sonunda % 86 oranında azaltmıştır. İnhibitörlerin üçlü kombinasyonu ise 24 saat sonunda % 84, 48 saat sonunda % 80, 72 saat sonunda % 82 oranında azaltmıştır.

Tablo 4.12 İnhibitör kombinasyonları için p- p70S6K (Thr389) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3, p- p70S6K (Thr389)/ β -aktin)

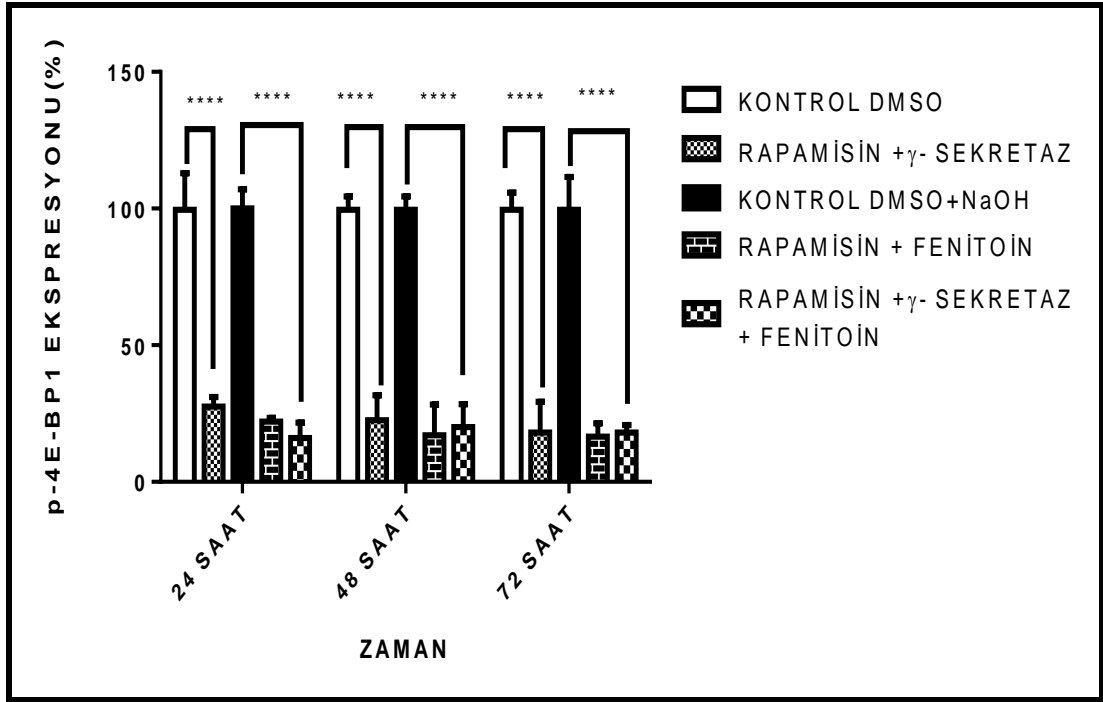
	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL DMSO	0,950 \pm 0,017	1,001 \pm 0,034	0,947 \pm 0,048
KONTROL DMSO+NaOH	1,312 \pm 0,119	1,251 \pm 0,194	1,283 \pm 0,205
RAPAMİSİN+ FENİTOİN	0,517 \pm 0,126	0,430 \pm 0,040	0,431 \pm 0,053
RAPAMİSİN+ γ -SEKRETAZ	0,349 \pm 0,175	0,404 \pm 0,069	0,357 \pm 0,048
RAPAMİSİN+ γ -SEKRETAZ+FENİTOİN	0,298 \pm 0,158	0,512 \pm 0,050	0,374 \pm 0,064



Şekil 4.21 Kombinasyonların zamana bağlı olarak p-p70S6K (Thr389) ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrolle oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)

Tablo 4.13 İnhibitör kombinasyonları için MDA-MB-231 hücrelerinde p-4E-BP1 (Thr37/46) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu ($n=3$, p-4E-BP1(Thr37/46)/ β -aktin)

	ORTALAMA RELATİF BANT YOĞUNLUĞU \pm STANDART SAPMA		
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
KONTROL DMSO	1,136 \pm 0,159	1,229 \pm 0,055	1,342 \pm 0,163
KONTROL DMSO+NaOH	1,615 \pm 0,113	1,327 \pm 0,056	1,716 \pm 0,103
RAPAMİSİN+ FENİTOİN	0,357 \pm 0,024	0,230 \pm 0,144	0,291 \pm 0,093
RAPAMİSİN+ γ -SEKRETAZ	0,316 \pm 0,040	0,280 \pm 0,115	0,248 \pm 0,143
RAPAMİSİN+ γ -SEKRETAZ + FENİTOİN	0,271 \pm 0,086	0,272 \pm 0,109	0,320 \pm 0,056



Şekil 4.22 Kombinasyonların p-4E-BP1 (Thr37/46) zamana bağlı olarak ekspresyonuna etkisi (% Değişim). Kontrolle oranla elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Belirgin olarak gözlenen değişimler $p < 0,05$ “***”, $p < 0,01$ “****”, $p < 0,001$ “*****” ile gösterilmiştir. ($p < 0,05$)

5. TARTIŞMA

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı meme kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde proliferasyon, sağ kalım, metastaz, anjiyogenez vb. mekanizmalar sayesinde kanser gelişimine ve kanser ilaçlarına dirence sebep olmaktadır. Bu sinyal yolağının onkogenik aktivasyonuna yol açan değişiklikler reseptör tirozin kinazların ekspresyonundaki artış, PI3K'nın katalitik alt birimini kodlayan PIK3CA genindeki mutasyon, PTEN'in fonksiyonel kaybı, Akt ve mTOR ekspresyonundaki ve/veya aktivitesindeki artış olarak özetlenebilir (2, 23, 24).

mTOR; mTORC1 ve mTORC2 olmak üzere iki farklı protein kompleksi içinde yer alan PI3K/Akt sinyal yolağındaki önemli moleküllerden biri olup serin/treonin kinaz aktivitesi sayesinde p70S6K ve 4E-BP1'i fosforile ederek protein sentezini ve kanser gelişiminde önemli olan D-tipi siklin, c-myc, Bcl-2, Bcl-x1 vb genlerin ekspresyonlarını attırır (35, 37, 153).

Öte yandan üzerine organ oluşumu, doku yenilenmesi, hücre farklılaşması, canlılığı ve çoğalmasında etkili olan Noç reseptörlerinin ve ligandlarının aşırı ekspresyonu ve/veya mutasyonu sonucu bu sinyal yolağında kanser gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (95-97). Meme kanserinde sıklıkla Noç-1, Noç-4 reseptörleri ve ligandlarının aşırı ekspresyonu görölüyor olup bu durum proliferasyon, sağ kalım, apoptozun önlenmesi , metastaz, invazyon ve ilaç direncine yol açmaktadır (9, 11-14, 116, 117). Yine çoğu iyon kanalının onkogenik gelişime katılan hücrenel süreçlerde gerekli olduğu bilinmektedir. Meme kanserinde sıklıkla görülen form voltaj kapılı sodyum kanalı neonatal Nav1.5 olup bu kanalın ekspresyonundaki artışın metastaz ve invazyona sebep olduğu bilinmektedir (7, 8, 141, 143).

Çalışmamızda, metastatik meme kanseri hücre dizisi olan MDA-MB-231 hücrelerinde, Noç sinyal yolağı ve nNav1.5 inhibisyonunun mTOR üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmanın güvenilirliğini test etmek amacıyla ise PI3K/Akt sinyal yolağı ve mTOR'un spesifik inhibisyonunun da mTOR üzerindeki etkileri incelenmiştir.

MDA-MB-231 hücrelerinde, ilk olarak kullanılan inhibitörlerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Rapamisin için elde edilen sonuçlara göre 1 nM dozda hücreler % 50 oranında canlıklarını yitirmiştir. Rapamisin' in etkinliği 24 saat sonrasında azalmaya başlamıştır. Ancak doz artışına bağlı olarak görülen hücre canlılığı azalışı bu inhibitör için görülmemiştir. Bunun sebepleri arasında yolağın geri dönüşümlü aktivasyon ile sürekli olarak uyarımı, inhibitörün hızla metabolize olması ve/veya rapamisinin hücre içi reseptörü olan ve etkinliğini sağlayan FKBP12'nin inhibitörün artan konsantrasyonuna bağlı aşırı uyarım sonucu desensitizasyonu ile alakalı olabilir. Bulunan bu sonuç daha önceki çalışmalar ile uyumludur (55, 68, 71, 76, 77, 83, 86, 154-160).

PI3K inhibitörü olan LY-294,002 için elde edilen sonuçlara göre 10 μ M dozda ve 48 saatlik inkübasyon süreci sonunda hücre canlılığı % 50 oranında azalmıştır. Doz artışına bağlı hücre canlılığının azalışı bu inhibitör için görülmekte olup elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur (46, 59, 68, 70, 71, 77, 83, 92, 93, 156, 159, 161).

Noç sinyal yolağı inhibitörü olan γ -sekretaz inhibitörü için elde edilen sonuçlara göre 12,5 μ M doz ve 48 saatlik inkübasyon süreci sonunda hücre canlılığı % 50 oranında azalmıştır. Doz artışına bağlı hücre canlılığının azalışı bu inhibitör için de görülmekte olup elde edilen bu sonuç daha önceki çalışmalarla uyumludur (120, 127, 162-165)

Hücrelerin Fenitoin ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu kullanılan dozlar ve/veya inkübasyon süreleri sonucunda hücre canlılığı ve çoğalması üzerinde etki görülmemiştir. Voltaja duyarlı sodyum iyon kanallarının hücrelerin metastatik potansiyelini etkileyen hücre göçü, invazyon gibi süreçlerde etkin olduğu hücre çoğalmasını etkilemediği bilinmektedir. Yapılan sitotoksiste çalışması da bu bilgi ile uyumludur (166).

Çalışmamızın ikinci aşaması ise daha önce belirtilen inhibitörlerin mTOR üzerindeki etkilerini incelemek üzerine olup, etkiler mTOR'un önemli iki substratı olan p70S6K ve 4E-BP1 fosforile formları kullanılmıştır.

mTOR' un özgün inhibitörü olan rapamisin p70S6K fosforilasyonunu doz artışına bağımlı olarak inkübasyon süreleri boyunca en az % 22 oranında azaltmıştır. Sonuçlar kontrollere göre değerlendirilmiş ve istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). 24 saatin ardından ilaçlı besiyerinin yenilenmesi ile fosforilasyon seviyelerindeki azalışın daha yüksek miktarda olduğu görülmektedir. Ancak 72 saat sonunda besiyerinin değiştirilmemesine bağımlı olarak fosforilasyon seviyelerindeki azalışın benzer miktarlarda oluşu yine ilacın etkinliğinin azalışına ve/veya FKBP12 desensitizasyonuna bağlanabilir. Yine 4E-BP1 fosforilasyonundaki değişim doz bağımlı olarak 24 saat sonunda en az % 23 oranında azalış gözlenirse de 48 saatlik inkübasyon süresinde p70S6K'nın fosforilasyon seviyesine benzer bir sonuç elde edilmiştir. p70S6K fosforilasyonundaki azalışın 4E-BP1'den daha fazla oluşu rapamisinin direkt olarak p70S6K aktivasyonunu engellemesine bağımlıdır. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

LY-294,002 ise doz bağımlı olarak etkin süresi olan 48 saatlik inkübasyon süresi ile etkisi artarak p70S6K ve 4E-BP1 fosforilasyon seviyesini en az % 17 oranında olmak üzere azaltmıştır. Sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Ancak bu inhibitörün rapamycin kadar kuvvetli etki yaratmadığı görülmüştür. Bu durum RTK, GPCR, Akt, mTOR'un geri dönüşümlü aktivasyonu ve diğer sinyal yollarının mTOR'u aktive edişi ile alakalıdır.

Daha önce yapılan çalışmalarda tümör invazyonun gelişiminde matriks metalloproteinazlar ve onların doku inhibitörlerinin önemli işleve sahip olduğu gösterilmiştir. Matriks metalloproteinazlar inaktif formda salınırlar, hücreler arası matriks bileşenleri yıkabilmeleri için aktifleşmeleri gerekmektedir. MMP'leri aktivasyonu çeşitli inhibitörler tarafından düzenlenir bunlar arasında en önemlisi metalloproteinazların doku inhibitörleridir (TIMP). MMP ve TIMP'ler arasındaki denge hücreler arası matriks proteinlerinin yıkımını kontrol eder. Çoğu kanser türünde MMP ekspresyonu ve aktivitesinin arttığı bilinmektedir. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının metastatik süreç üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. İlaç uygulamaları sonucu MMP-9 ekspresyonunun azalışı, TIMP1 ekspresyonunun azalışı MMP-9/TIMP-1 oranını azaltacaktır (6). Çalışmamızda bu bilgiler doğrultusunda MMP-9 ve TIMP1 ekspresyon seviyeleri de incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre

doz bağımlı olarak MMP-9 ekspresyonunun azaldığı fakat 48 saat sonunda tüm inhibitörler için % 70'in üzerine çıkamadığı gözlenmiştir. mTOR'un direkt gen hedefleri arasında bulunan VEGF'in rapamisin inhibisyonu sonucu seviyesinin azaldığı, tümör invazyonunda ve anjiyogenezde azalışa sebep olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (167, 168). Ancak MMP'lerin mTOR'un direkt gen hedefleri arasında olmadığı bilinmektedir. Bu durum dolaylı yollardan mTOR'un MMP-9 ekspresyon seviyesinde de etkili olabileceği düşüncesini ortaya koymaktadır. TIMP1 ekspresyonu ise 24 saat sonunda 10 nM ve 100 nM dozda kontrole göre artış gösterse de diğer inkübasyon sürelerinde belirgin bir etki göstermemiştir. Ancak TIMP1 ekspresyon oranının her koşulda MMP-9 ekspresyon oranından fazla oluşu yolağın inhibisyonunun invazyonu da azalttığı sonucuna varabiliriz. Elde edilen bu sonuç istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

Noç sinyal yolağı ve mTOR'un ilişkili olduğu pek çok malin hücre tipinde yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Örneğin her iki yolak da benzer genlerin ekspresyonunu artırır (c-myc, Bcl-x1, VEGFR vb), Noç reseptörleri PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı ile ilişki kurarak p53 inhibisyonunu sağlar, Akt'nin fosforilasyon hedeflerinden olan GSK3 β ise NICD'i fosforile ederek yapısal bütünlüğünün korunmasına sebep olur (95-97). Yine Noç sinyal yolağının γ -sekretaz inhibitörü ile inhibisyonu sonucu Noç ve Akt/mTOR yolaklarının etkisinin azalışına, Akt ve mTOR ekspresyon seviyesinde düşüşe ek olarak PI3K ve mTOR inhibitörleri de kullanılarak yapılan çalışmalarda Noç-1 aktivasyonunun sonladığı bilinmektedir (9-15). Yapılan çalışmaların çoğu Noç-1 ve PI3K/Akt/mTOR yolakları arasında olsa da MDA-MB-231 hücrelerinde Noç-4 reseptörünün fazla eksprese olduğu bilindiği için çalışmamızda mTOR inhibisyonunun Noç-4 ekspresyonu üzerindeki etkisi ve γ -sekretaz inhibitörünün p70S6K ve 4E-BP1'in fosforilasyon seviyeleri incelenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre; γ -sekretaz inhibitörün doz bağımlı olarak p70S6K ve 4E-BP1 fosforilasyonunu en az % 22 oranında, 24 saat sonunda en fazla olmak üzere azalttığı gözlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durum daha önce yapılan çalışmalar ile elde edilen sinyal yolakları arasındaki ilişkiyi açıklayan bulgular ile uyumludur. Genellikle Noç-1 ile PI3K/Akt/mTOR yolağı arasında bir bağlantı olduğu görülse de γ -sekretaz'ın tüm Noç reseptörlerini

inhibe ettiği göz önünde bulundurulmalıdır. Öte yandan rapamisinin 100 nm en fazla olmak üzere ancak doz bağımsız olarak inkübasyon süreleri boyunca Noç-4 ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Dolayısı ile mTOR' un hedef genleri arasında Noç-4 olduğunu ve Noç sinyal yolağının inhibisyonunda mTOR üzerinde etkili olduğu sonucuna varabiliriz.

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının daha önce de belirttiğimiz gibi metastatik süreçte etkili olduğu mTOR substratlarından SGK1' in iyon transportunda görevli genlerin ifadenmesini arttırdığı bilinmektedir (16, 17). Bu bilgiler eşliğinde invazyon ve migrasyonda da etkili olan nNav1.5 ile PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı arasındaki ilişki araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; voltaj kapılı sodyum kanalı inhibitörü Fenitoin'in ile inkübasyonu sonucu doza bağımlı olarak inkübasyon süresi artışına göre azalsa da p70S6K fosforilasyon seviyesinde azalma yaratmıştır. 4E-BP1 fosforilasyon seviyesinde ise doz bağımlı sonuç görülme de en fazla % 23 olmak üzere bir azalma gözlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Buradan yola çıkarak kuvvetli olmasa da bu iki molekül arasında etkileşim olduğu sonucuna varabiliriz.

Son olarak γ -sekretaz inhibitörü ve fenitoin rapamisin ile birlikte sinerjistik etki gösterip göstermediği incelenmiştir. Beklendiği üzere inhibitörlerin üçlü kombinasyonları p70S6K ve 4E-BP1'in fosforilasyon seviyesinin azalışında en etkili grup olmuştur. Öte yandan γ -sekretaz ve rapamisin kombinasyonu üçlü inhibitör kombinasyonundan sonra en etkili olan grup olmuştur. Çalışmamızın daha önceki aşamasında inhibitörler belirtildiği gibi tek tek hücrelere verildiğinde elde edilen her iki protein için de fosforilasyon seviyelerinde belirli miktarlarda azalış görüldüğü göz önünde bulundurulmalıdır. Dolayısı ile elde edilen bu sonuç daha önceki sonuçlar ile uyumlu olup, rapamisin ile bu inhibitörlerin sinerjistik etki göstermesi mantıklıdır. Elde edilen bu sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Sonuç olarak, çalışmamızda mTOR üzerinde etkili olabilecek iki mekanizma incelenmiştir.

1. nNav1.5 inhibisyonunun mTOR üzerindeki etkileri, p70S6K ve 4E-BP1' in fosforilasyon seviyelerindeki azalışa bağlı olarak ilk defa gözlemlenmiştir.
2. Noç sinyal yolağı ile mTOR arasındaki ilişki çalışmamızda incelenmiş olup, mTOR'un Noç-4 ekspresyonunu azalttığı ilk defa gözlemlenmiştir.
3. Noç sinyal yolağı inhibisyonu sonucu elde edilen bulgulara göre p70S6K'ın bu yolakta da görevli olabileceği sonucuna varılmıştır.
4. Rapamisin'e ek olarak kullanılan voltaj kapılı sodyum kanalı inhibitörü fenitoin ve Noç sinyal yolağı inhibitörü γ -sekretazın rapamisin ile birlikte sinerjistik etki gösterdiği ilk defa gözlemlenmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı, kanser gelişiminin tam ortasında bulunması ve diğer sinyal yolakları ile ilişkili olması açısından kanser tedavisinde oldukça büyük bir önem sağlamaktadır. Bu çerçevede, bu sinyal yolağı üzerinde etkili olabilecek inhibitörlerin kombine olarak uygulanmasının tedavide daha etkili sonuçlar vereceğı görülmektedir.

Bu tez çalışmasında mTOR üzerinde etkili olan 2 yeni mekanizma bulunmuştur. Sadece yolağın aktive olup olmadığı incelendiğı için kullanılan p-p70S6K ve p-4E-BP1'in total protein seviyesine bakılmamıştır. Total proteinler ile birlikte mTOR'un hedefi olan c-myc, D-tipi siklin vb. genlerin ifadenmesi de incelenmelidir.

Ayrıca mTOR'un metastaz ve invazyon üzerindeki etkilerini daha kuvvetli araştırmak açısından MMP-9,TIMP-1, nNav 1.5 gen ifadelerine ek olarak, jelatin zimografi yönteminin de kullanılması daha kesin bir bilgi elde etmede yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Blume-Jensen P, Hunter T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411 (6835), 355-65.
2. Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. (2010). Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(1), 87-90.
3. Miele L. (2006). Notch signaling. *Clinical Cancer Research*, 12(4), 1074-9.
4. Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. (2007). Notch signaling in development and cancer. *Endocrine Reviews*, 28(3), 339-63.
5. Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Just U. (2011). The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency. *European Journal of Cell Biology*, 90(6-7), 572-81.
6. Deryugina EI, Quigley JP. (2006). Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 25(1), 9-34.
7. Brisson L, Gillet L, Calaghan S, Besson P, Le Guennec JY, Roger S, et al. (2011). Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene*, 30(17), 2070-6.
8. Brackenbury WJ, Chioni AM, Diss JK, Djamgoz MB. (2007). The neonatal splice variant of Nav1.5 potentiates in vitro invasive behaviour of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 101(2), 149-60.
9. Zhu H, Bhaijee F, Ishaq N, Pepper DJ, Backus K, Brown AS, et al. (2013). Correlation of Notch1, pAKT and nuclear NF-kappaB expression in triple negative breast cancer. *American Journal of Cancer Research*, 3(2), 230-9.
10. Cohen B, Shimizu M, Izrailit J, Ng NF, Buchman Y, Pan JG, et al. (2010). Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123(1), 113-24.

11. Wang Z, Li Y, Banerjee S, Kong D, Ahmad A, Nogueira V, et al. (2010). Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-kappaB signaling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(4), 726-36.
12. Bedogni B, Warneke JA, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. (2008). Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3660-70.
13. Liu ZJ, Xiao M, Balint K, Smalley KS, Brafford P, Qiu R, et al. (2006). Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Research*, 66(8), 4182-90.
14. Meurette O, Stylianou S, Rock R, Collu GM, Gilmore AP, Brennan K. (2009). Notch activation induces Akt signaling via an autocrine loop to prevent apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Research*, 69(12), 5015-22.
15. Calzavara E, Chiamonte R, Cesana D, Basile A, Sherbet GV, Comi P. (2008). Reciprocal regulation of Notch and PI3K/Akt signalling in T-ALL cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(5), 1405-12.
16. Ohashi E, Kogai T, Kagechika H, Brent GA. (2009). Activation of the PI3 kinase pathway by retinoic acid mediates sodium/iodide symporter induction and iodide transport in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Research*, 69(8), 3443-50.
17. Ma XM, Blenis J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), 307-18.
18. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698-707.
19. Bertos NR, Park M. (2011). Breast cancer - one term, many entities? *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3789-96.

20. Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Research*, 5(2), 89-95.
21. O'Toole SA, Beith JM, Millar EK, West R, McLean A, Cazet A, et al. (2013). Therapeutic targets in triple negative breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 66(6), 530-42.
22. Vivanco I, Sawyers CL. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(7), 489-501.
23. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(8), 627-44.
24. Luo J, Manning BD, Cantley LC. (2003) Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*, 4(4), 257-62.
25. Jiang BH, Liu LZ. (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances In Cancer Research*, 102, 19-65.
26. Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann MP. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784(1), 159-85.
27. Toker A. (2012). Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Advances in Biological Regulation*, 52(1), 78-87.
28. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in Cancer Research*, 94, 29-86.
29. Manning BD, Cantley LC. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-74.
30. Ruan GX, Kazlauskas A. (2011). Focus on molecules: Akt (PKB). *Experimental Eye Research*, 93(5), 570-1.

31. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 17(3), 590-603.
32. Crowell JA, Steele VE, Fay JR. (2007). Targeting the AKT protein kinase for cancer chemoprevention. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(8), 2139-48.
33. Altomare DA, Khaled AR. (2012). Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. *Current Medicinal Chemistry*, 19(22), 3748-62.
34. Franke TF. (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene*, 27(50), 6473-88.
35. Guertin DA, Sabatini DM. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, 12(1), 9-22.
36. Dunlop EA, Tee AR. (2009). Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cellular Signalling*, 21(6), 827-35.
37. Borders EB, Bivona C, Medina PJ. (2010). Mammalian target of rapamycin: biological function and target for novel anticancer agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(24), 2095-106.
38. Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. (2009). Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. *Seminars in Oncology*, 36(3), 3-17.
39. Laplante M, Sabatini DM. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-93.

40. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 21-35.
41. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF. (2007). Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discovery Today*, 12(3-4), 112-24.
42. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. (2004). mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), 200-16.
43. Wang X, Proud CG. (2009). Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. *Trends in Cell Biology*, 19(6), 260-7.
44. Bhaskar PT, Hay N. (2007). The two TORCs and Akt. *Developmental Cell*, 12(4), 487-502.
45. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. (2008). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resistance Updates : Reviews And Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 11(1-2), 32-50.
46. Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence JC, Jr., Abraham RT. (1996). Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *The EMBO Journal*, 15(19), 5256-67.
47. Garcia-Echeverria C, Sellers WR. (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene*, 27(41), 5511-26.
48. Granville CA, Memmott RM, Gills JJ, Dennis PA. (2006). Handicapping the race to develop inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *Clinical Cancer Research*, 12(3), 679-89.

49. Markman B, Dienstmann R, Tabernero J. (2010). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. *Oncotarget*, 1(7), 530-43.
50. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. (2008). Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Current Opinion in Pharmacology*, 8(4), 393-412.
51. Schnell CR, Stauffer F, Allegrini PR, O'Reilly T, McSheehy PM, Dartois C, et al. (2008). Effects of the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 on the tumor vasculature: implications for clinical imaging. *Cancer Research*, 68(16), 6598-607.
52. Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, et al. (2008). Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7), 1851-63.
53. Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, et al. (2008). NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Research*, 68(19), 8022-30.
54. Brachmann SM, Hofmann I, Schnell C, Fritsch C, Wee S, Lane H, et al. (2009). Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 22299-304.
55. Torbett NE, Luna-Moran A, Knight ZA, Houk A, Moasser M, Weiss W, et al. (2008). A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. *The Biochemical Journal*, 415(1), 97-110.

56. Rhodes N, Heerding DA, Duckett DR, Eberwein DJ, Knick VB, Lansing TJ, et al. (2008). Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. *Cancer Research*, 68(7), 2366-74.
57. Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, Filipits M, Bartsch R. (2012). mTOR inhibitors in breast cancer: a systematic review. *Gynecologic Oncology*, 127(3), 662-72.
58. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(11), 868-80.
59. Chen X, Zhao M, Hao M, Sun X, Wang J, Mao Y, et al. (2013). Dual inhibition of PI3K and mTOR mitigates compensatory AKT activation and improves tamoxifen response in breast cancer. *Molecular Cancer Research*, 11(10), 1269-78.
60. Mondesire WH, Jian W, Zhang H, Ensor J, Hung MC, Mills GB, et al. (2004). Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 10(20), 7031-42.
61. McAuliffe PF, Meric-Bernstam F, Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. (2010). Deciphering the role of PI3K/Akt/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis. *Clinical Breast Cancer*, 10(3), S59-65.
62. Ghayad SE, Cohen PA. (2010). Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 5(1), 29-57.
63. Cidado J, Park BH. (2012). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway for breast cancer therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 17(3-4), 205-16.
64. Bostner J, Karlsson E, Pandiyan MJ, Westman H, Skoog L, Fornander T, et al. (2013). Activation of Akt, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict

tamoxifen treatment benefit. *Breast Cancer Research and Treatment*, 137(2), 397-406.

65. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan KH, Yang Y, et al. (2004). Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clinical Cancer Research*, 10(20), 6779-88.

66. Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM. (2011). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *The Oncologist*, 16(4), 404-14.

67. Engelman JA. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews Cancer*, 9(8), 550-62.

68. No M, Choi EJ, Kim IA. (2009). Targeting HER2 signaling pathway for radiosensitization: alternative strategy for therapeutic resistance. *Cancer Biology & Therapy*, 8(24), 2351-61.

69. Dey JH, Bianchi F, Voshol J, Bonenfant D, Oakeley EJ, Hynes NE. (2010). Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K/AKT signaling, induces apoptosis, and impairs mammary tumor outgrowth and metastasis. *Cancer Research*, 70(10), 4151-62.

70. Kataoka Y, Mukohara T, Shimada H, Saijo N, Hirai M, Minami H. (2010). Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 21(2), 255-62.

71. Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, Pearlman RV, et al. (2005). Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Research*, 65(23), 10992-1000.

72. Adams JR, Schachter NF, Liu JC, Zacksenhaus E, Egan SE. (2011). Elevated PI3K signaling drives multiple breast cancer subtypes. *Oncotarget*, 2(6), 435-47.

73. Beaver JA, Gustin JP, Yi KH, Rajpurohit A, Thomas M, Gilbert SF, et al. (2013). PIK3CA and AKT1 mutations have distinct effects on sensitivity to targeted pathway inhibitors in an isogenic luminal breast cancer model system. *Clinical Cancer Research*, 19(19), 5413-22.
74. Crowder RJ, Phommaly C, Tao Y, Hoog J, Luo J, Perou CM, et al. (2009). PIK3CA and PIK3CB inhibition produce synthetic lethality when combined with estrogen deprivation in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Research*, 69(9), 3955-62.
75. Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, et al. (2005). PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Research*, 65(7), 2554-9.
76. Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, Do KA, Sangai T, Adkins F, et al. (2012). PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 18(6), 1777-89.
77. DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, Grunwald V, Ray RB, Hidalgo M. (2004). Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. *Annals Of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 15(10), 1510-6.
78. Yi YW, Kang HJ, Kim HJ, Hwang JS, Wang A, Bae I. (2013). 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*, 52(9), 667-75.
79. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, et al. (2005). AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *The Journal of Pathology*, 207(2), 139-46.

80. Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. (2002). Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(9), 707-17.
81. Generali D, Fox SB, Brizzi MP, Allevi G, Bonardi S, Aguggini S, et al. (2008). Down-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT/molecular target of rapamycin metabolic pathway by primary letrozole-based therapy in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(9), 2673-80.
82. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, et al. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12(4), 395-402.
83. He X, Wang Y, Zhu J, Orloff M, Eng C. (2011). Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling. *Cancer Letters*, 301(2), 168-76.
84. Ghayad SE, Bieche I, Vendrell JA, Keime C, Lidereau R, Dumontet C, et al. (2008). mTOR inhibition reverses acquired endocrine therapy resistance of breast cancer cells at the cell proliferation and gene-expression levels. *Cancer Science*, 99(10), 1992-2003.
85. Cavazzoni A, Bonelli MA, Fumarola C, La Monica S, Airoud K, Bertoni R, et al. (2012). Overcoming acquired resistance to letrozole by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer cell clones. *Cancer Letters*, 323(1), 77-87.
86. deGraffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, Donzis EJ, Middleton AK, Silva JM, et al. (2004). Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity. *Clinical Cancer Research*, 10(23), 8059-67.
87. Yi YW, Hong W, Kang HJ, Kim HJ, Zhao W, Wang A, et al. (2013). Inhibition of the PI3K/AKT pathway potentiates cytotoxicity of EGFR kinase inhibitors in

triple-negative breast cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(5), 648-56.

88. Miller TW, Forbes JT, Shah C, Wyatt SK, Manning HC, Olivares MG, et al. (2009). Inhibition of mammalian target of rapamycin is required for optimal antitumor effect of HER2 inhibitors against HER2-overexpressing cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 15(23), 7266-76.

89. Contessa JN, Hampton J, Lammering G, Mikkelsen RB, Dent P, Valerie K, et al. (2002). Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene*, 21(25), 4032-41.

90. Liang K, Lu Y, Jin W, Ang KK, Milas L, Fan Z. (2003). Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(11), 1113-20.

91. Albert JM, Kim KW, Cao C, Lu B. (2006). Targeting the Akt/mammalian target of rapamycin pathway for radiosensitization of breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(5), 1183-9.

92. Liang K, Jin W, Knuefermann C, Schmidt M, Mills GB, Ang KK, et al. (2003). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway for enhancing breast cancer cells to radiotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(4), 353-60.

93. Nakamura JL, Karlsson A, Arvold ND, Gottschalk AR, Pieper RO, Stokoe D, et al. (2005). PKB/Akt mediates radiosensitization by the signaling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*;71(3):215-22.

94. Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S. (2013). Notch signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(10), 2135-40.

95. Weinmaster G. (1997). The ins and outs of notch signaling. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 9(2), 91-102.

96. Wang MM. (2011). Notch signaling and Notch signaling modifiers. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(11), 1550-62.
97. Yin L, Velazquez OC, Liu ZJ. (2010). Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 80(5), 690-701.
98. Fiuza UM, Arias AM. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *The Journal of Endocrinology*, 194(3), 459-74.
99. Chillakuri CR, Sheppard D, Lea SM, Handford PA. (2012). Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(4), 421-8.
100. Fortini ME. (2009). Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Developmental Cell*, 16(5), 633-47.
101. McGowan PM, Mullooly M, Caiazza F, Sukor S, Madden SF, Maguire AA, et al. (2013). ADAM-17: a novel therapeutic target for triple negative breast cancer. *Annals Of Oncology: Official Journal of The European Society For Medical Oncology*, 24(2), 362-9.
102. Brou C. (2009). Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. *Experimental Cell Research*, 315(9), 1549-55.
103. Roy M, Pear WS, Aster JC. (2007). The multifaceted role of Notch in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17(1), 52-9.
104. Tolia A, De Strooper B. (2009). Structure and function of gamma-secretase. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(2), 211-8.
105. Barrick D, Kopan R. (2006). The Notch transcription activation complex makes its move. *Cell*, 124(5), 883-5.
106. Borggreffe T, Liefke R. (2012). Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway. *Cell Cycle*, 11(2), 264-76.

107. Rennstam K, McMichael N, Berglund P, Honeth G, Hegardt C, Ryden L, et al. (2010). Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122(2), 315-24.
108. Groth C, Fortini ME. (2012). Therapeutic approaches to modulating Notch signaling: current challenges and future prospects. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(4), 465-72.
109. Allenspach EJ, Maillard I, Aster JC, Pear WS. (2002). Notch signaling in cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 1(5), 466-76.
110. Capaccione KM, Pine SR. (2013). The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. *Carcinogenesis*, 34(7), 1420-30.
111. Stylianou S, Clarke RB, Brennan K. (2006). Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Research*, 66(3), 1517-25.
112. Han J, Hendzel MJ, Allalunis-Turner J. (2011). Notch signaling as a therapeutic target for breast cancer treatment? *Breast Cancer Research*, 13(3), 210.
113. Leong KG, Karsan A. (2006). Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*, 107(6), 2223-33.
114. Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR. (2011). Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1815(2), 197-213.
115. Reedijk M, Odorcic S, Chang L, Zhang H, Miller N, McCready DR, et al. (2005). High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Research*.;65(18):8530-7.
116. McKenzie G, Ward G, Stallwood Y, Briend E, Papadia S, Lennard A, et al. (2006). Cellular Notch responsiveness is defined by phosphoinositide 3-kinase-dependent signals. *BMC Cell Biology*, 7, 10.

117. Efferson CL, Winkelmann CT, Ware C, Sullivan T, Giampaoli S, Tammam J, et al. (2010). Downregulation of Notch pathway by a gamma-secretase inhibitor attenuates AKT/mammalian target of rapamycin signaling and glucose uptake in an ERBB2 transgenic breast cancer model. *Cancer Research.*, 70(6), 2476-84.
118. Wang J, Fu L, Gu F, Ma Y. (2011). Notch1 is involved in migration and invasion of human breast cancer cells. *Oncology Reports*, 26(5), 1295-303.
119. Bolos V, Mira E, Martinez-Poveda B, Luxan G, Canamero M, Martinez AC, et al. (2013). Notch activation stimulates migration of breast cancer cells and promotes tumor growth. *Breast Cancer Research*, 15(4), 54.
120. Clementz AG, Rogowski A, Pandya K, Miele L, Osipo C. (2011). NOTCH-1 and NOTCH-4 are novel gene targets of PEA3 in breast cancer: novel therapeutic implications. *Breast Cancer Research*, 13(3), 63.
121. Speiser J, Foreman K, Drinka E, Godellas C, Perez C, Salhadar A, et al. (2012). Notch-1 and Notch-4 biomarker expression in triple-negative breast cancer. *International Journal of Surgical Pathology*, 20(2), 139-45.
122. O'Neill CF, Urs S, Cinelli C, Lincoln A, Nadeau RJ, Leon R, et al. (2007). Notch2 signaling induces apoptosis and inhibits human MDA-MB-231 xenograft growth. *The American Journal of Pathology*, 171(3), 1023-36.
123. Purow B. (2012). Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 727, 305-19.
124. Espinoza I, Miele L. (2013). Notch inhibitors for cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 139(2), 95-110.
125. Brennan K, Clarke RB. (2013). Combining Notch inhibition with current therapies for breast cancer treatment. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 5(1), 17-24.

126. Han J, Ma I, Hendzel MJ, Allalunis-Turner J. (2009). The cytotoxicity of gamma-secretase inhibitor I to breast cancer cells is mediated by proteasome inhibition, not by gamma-secretase inhibition. *Breast Cancer Research*, 11(4), 57.
127. Rasul S, Balasubramanian R, Filipovic A, Slade MJ, Yague E, Coombes RC. (2009). Inhibition of gamma-secretase induces G2/M arrest and triggers apoptosis in breast cancer cells. *British Journal of Cancer*, 100(12), 1879-88.
128. Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. (2003). Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene*, 22(42), 6598-608.
129. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Banerjee S, Kong D, et al. (2010). Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1806(2), 258-67.
130. Catterall WA. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 493-531.
131. Diss JK, Fraser SP, Djamgoz MB. (2004). Voltage-gated Na⁺ channels: multiplicity of expression, plasticity, functional implications and pathophysiological aspects. *European Biophysics Journal*, 33(3), 180-93.
132. Clare JJ, Tate SN, Nobbs M, Romanos MA. (2000). Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discovery Today*, 5(11), 506-20.
133. Sato C, Ueno Y, Asai K, Takahashi K, Sato M, Engel A, et al. (2001). The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature*, 409(6823), 1047-51.
134. Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, et al. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*, 11(15), 5381-9.

135. Brackenbury WJ, Djamgoz MB, Isom LL. (2008). An emerging role for voltage-gated Na⁺ channels in cellular migration: regulation of central nervous system development and potentiation of invasive cancers. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology And Psychiatry*, 14(6), 571-83.
136. Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, et al. (2000). beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), 2308-13.
137. Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, et al. (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of The Society For Neuroscience*, 23(20), 7577-85.
138. Roger S, Potier M, Vandier C, Besson P, Le Guennec JY. (2006). Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy? *Current Pharmaceutical Design*, 12(28), 3681-95.
139. Onganer PU, Djamgoz MB. (2005). Small-cell lung cancer (human): potentiation of endocytic membrane activity by voltage-gated Na(+) channel expression in vitro. *The Journal of Membrane Biology*, 204(2), 67-75.
140. Le Guennec JY, Ouadid-Ahidouch H, Soriani O, Besson P, Ahidouch A, Vandier C. (2007). Voltage-gated ion channels, new targets in anti-cancer research. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 2(3), 189-202.
141. Onkal R, Mattis JH, Fraser SP, Diss JK, Shao D, Okuse K, et al. (2008). Alternative splicing of Nav1.5: an electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue. *Journal of Cellular Physiology*, 216(3), 716-26.
142. Gao R, Wang J, Shen Y, Lei M, Wang Z. (2009). Functional expression of voltage-gated sodium channels Nav1.5 in human breast cancer cell line MDA-MB-

231. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical Sciences*, 29(1), 64-7.

143. Onkal R, Djamgoz MB. (2009). Molecular pharmacology of voltage-gated sodium channel expression in metastatic disease: clinical potential of neonatal Nav1.5 in breast cancer. *European Journal of Pharmacology*, 625(1-3), 206-19.

144. Chioni AM, Fraser SP, Pani F, Foran P, Wilkin GP, Diss JK, et al. (2005). A novel polyclonal antibody specific for the Na(v)1.5 voltage-gated Na(+) channel 'neonatal' splice form. *Journal of Neuroscience Methods*, 147(2), 88-98.

145. Chioni AM, Brackenbury WJ, Calhoun JD, Isom LL, Djamgoz MB. (2009). A novel adhesion molecule in human breast cancer cells: voltage-gated Na⁺ channel beta1 subunit. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(5), 1216-27.

146. Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. (2004). CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26991-7007.

147. Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, et al. (2009). Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8680-91.

148. Roger S, Besson P, Le Guennec JY. (2003). Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1616(2), 107-11.

149. Chioni AM, Shao D, Grose R, Djamgoz MB. (2010). Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity-dependent positive feedback and cellular migration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(2), 346-58.

150. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55-63.
151. Walker J. (2009). The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook*. New York: Humana Press
152. Laemmli UK, Favre M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4: I. DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*, 80(4), 575-99.
153. Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM. (2009). Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of The American Society of Clinical Oncology*, 27(13), 2278-87.
154. Soni A, Akcakanat A, Singh G, Luyimbazi D, Zheng Y, Kim D, et al. (2008) eIF4E knockdown decreases breast cancer cell growth without activating Akt signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(7), 1782-8.
155. Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, Teruya-Feldstein J, Etemadmoghadam D, Bowtell D, et al. (2009). Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell*.;16(2):115-25.
156. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research*, 66(3), 1500-8.
157. Shapira M, Kakiashvili E, Rosenberg T, Hershko DD. (2006). The mTOR inhibitor rapamycin down-regulates the expression of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 8(4), 46.
158. Chang SB, Miron P, Miron A, Iglehart JD. (2007). Rapamycin inhibits proliferation of estrogen-receptor-positive breast cancer cells. *The Journal of Surgical Research*, 138(1), 37-44.

159. Wang LH, Chan JL, Li W. (2007). Rapamycin together with herceptin significantly increased anti-tumor efficacy compared to either alone in ErbB2 over expressing breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, 121(1), 157-64.
160. Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, Petti F, McCormack S, Haley JD, et al. (2006). Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(11), 2676-84.
161. Brunner-Kubath C, Shabbir W, Saferding V, Wagner R, Singer CF, Valent P, et al. (2011). The PI3 kinase/mTOR blocker NVP-BEZ235 overrides resistance against irreversible ErbB inhibitors in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 129(2), 387-400.
162. Rizzo P, Miao H, D'Souza G, Osipo C, Song LL, Yun J, et al. (2008). Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Research*, 68(13), 5226-35.
163. Osipo C, Patel P, Rizzo P, Clementz AG, Hao L, Golde TE, et al. (2008). ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor. *Oncogene*, 27(37), 5019-32.
164. Lee CW, Raskett CM, Prudovsky I, Altieri DC. (2008). Molecular dependence of estrogen receptor-negative breast cancer on a notch-survivin signaling axis. *Cancer Research*.;68(13):5273-81.
165. Yamaguchi N, Oyama T, Ito E, Satoh H, Azuma S, Hayashi M, et al. (2008). NOTCH3 signaling pathway plays crucial roles in the proliferation of ErbB2-negative human breast cancer cells. *Cancer research*, 68(6), 1881-8.
166. Yang M, Kozminski DJ, Wold LA, Modak R, Calhoun JD, Isom LL, et al. (2012). Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 134(2), 603-15.

167. Tang L, Ma X, Tian Q, Cheng Y, Yao H, Liu Z, et al. (2013). Inhibition of angiogenesis and invasion by DMBT is mediated by downregulation of VEGF and MMP-9 through Akt pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for The British Industrial Biological Research Association.*, 56, 204-13.
168. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature medicine*, 8(2), 128-35.
169. Aktaş Çakır C. *Nnav1.5 Sodyum Kanalı Ve Noç-4 Reseptör Sinyalinin Baskılanmasının İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Çoğalma Ve Metastatik Potansiyel Üzerine Etkisinin İncelenmesi* Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2013

