

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE PI3K/Akt/mTOR
SİNYAL YOLAĞI İNHİBİSYONUNUN RESEPTÖR
TİROZİN KİNAZLARIN EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

Uzm. Biol. Gürcan TUNALI

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2012

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRE DİZİLERİNDE PI3K/Akt/mTOR
SİNYAL YOLAĞI İNHİBİSYONUNUN RESEPTÖR
TİROZİN KİNAZLARIN EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

Uzm. Biol. Gürcan TUNALI

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. A. Lale DOĞAN

ANKARA

2012

Anabilim Dalı: Temel Onkoloji

Program: Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi

Tez Başlığı: Meme Kanseri Hücre Dizilerinde PI3K/Akt/mTOR Sinyal
Yolağı İnhibisyonunun Reseptör Tirozin Kinazların
Ekspresyonuna Etkisi

Öğrencinin Adı-Soyadı: Gürcan TUNALI

Savunma Sınavı Tarihi: 11.07.2012

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Emin KANSU
Hacettepe Üniversitesi



Danışman: Doç. Dr. A. Lale DOĞAN
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Dicle GÜÇ
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY
Ankara Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI
Hacettepe Üniversitesi



Onay:

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



Prof. Dr. Mustafa Kadri ALTUNDAĞ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan, eğitimim süresince ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. A. Lale DOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans programına kabul edilip, bu tez konusunda çalışmama olanak tanıyan ve bana her konuda yardımcı olan saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Dicle GÜÇ'e, Sayın Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya ve Sayın Dr. Hande CANPINAR'a içtenlikle teşekkür ederim.

Engin bilgi ve birikimlerinin yanı sıra güler yüzlü ve pozitif enerjisiyle bana örnek olan Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Emin Kansu'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Deneyimlerini benimle paylaşan ve ilgilerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma ve H. Ü. Temel Onkoloji Anabilim Dalı çalışanlarına desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında maddi ve manevi olarak yanımda olan, beni destekleyen, yüreklendiren ve bana güvenen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Tunalı, G., Meme kanseri hücre dizilerinde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı inhibisyonunun reseptör tirozin kinazların ekspresyonuna etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2012. Meme kanseri patogenezinde önemli yeri olan faktörler arasında reseptör tirozin kinazların (RTK) ekspresyonlarında ve aktivitelerinde (EGFR, HER2, HER3) artış bulunmaktadır. HER2/HER3 heterodimer oluşumu, transformasyon potansiyeli en yüksek olan reseptör etkileşimidir ve PI3K/Akt sinyal yolağının onkojenik aktivasyonuna yol açar. Akt proteini, FOXO transkripsiyon faktörü aracılığıyla RTK ekspresyonunu baskılamaktadır. PI3K/Akt yolağını inhibe eden ajanlar, (Akt inhibitörü ve PI3K/mTOR dual inhibitörleri) sinyal yolağını bloke etmekle beraber bu baskılamayı da ortadan kaldırmakta ve RTK düzeyleri ile aktivitelerini artırmaktadır. Bu artış, PI3K/Akt yolağının re-aktivasyonuna yol açan kritik nedenlerden biridir.

Bu çalışmada MDA-MB-468 ve SKBR-3 meme kanseri hücre dizilerinde dual bir PI3K/mTOR inhibitörü olan PI-103'ün reseptör tirozin kinaz ekspresyonları üzerindeki zamana bağlı etkisi incelendi. Tümör hücrelerinde, p-Akt ve p-p70S6K protein ekspresyonlarında ilk üç saat boyunca istatistiksel olarak anlamlı azalma izlendi. Bu inhibisyonu 6. saatten sonra sinyal yolağının re-aktivasyonu izledi. MDA-MB-468 hücrelerinde bazal EGFR ve HER3, SKBR-3 hücrelerinde ise bazal HER2 ve HER3 ekspresyonları oldukça yüksek düzeyde bulundu. Tümör hücrelerinde Akt ve mTOR seviyesinde gözlenen geçici inhibisyonu takip eden sinyal yolağı re-aktivasyonunun, EGFR, HER2 ve HER3 ekspresyon düzeyleri üzerinde zamana bağlı değişim yapmadığı gözlemlendi. Bu sonuçlara göre, reseptörlerin kinaz aktivitelerinin de incelenmesinin yararlı olacağına kanaat edildi.

Sonuç olarak, dual PI3K/Akt inhibitörlerin tedavi stratejilerindeki etkinliği, RTK ekspresyonu üzerindeki transkripsiyonel ve posttranslasyonel etkileri ile ilişkili olabilir. Bu inhibitörlerin, sinyal iletimini bozarken, tümör hücreleri lehine RTK re-aktivasyonlarına yol açabileceği akılda tutulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: EGFR, HER2, HER3, PI3K, mTOR, PI-103, meme kanseri

ABSTRACT

Tunali, G., The effect of inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on receptor tyrosine kinase expression in breast cancer cell lines, Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master Thesis in Tumor Biology and Immunology, Ankara, 2012. Increase in receptor tyrosine kinases (RTK) expression and activities (EGFR, HER2, HER3) take place among the important factors in breast cancer pathogenesis. HER2/HER3 heterodimer formation is the receptor interaction with the highest transforming potential and it causes oncogenic PI3K/Akt activation. Akt protein represses RTK expression via FOXO transcription factor. Inhibitors of PI3K/Akt pathway (Akt inhibitor and PI3K/mTOR dual inhibitors) relieve this suppression while blocking signaling pathway and lead to increase in RTK levels and activities. This increase is one of the critical causes of PI3K/Akt pathway's reactivation.

In this study, the time dependent effect of dual PI3K/Akt inhibitor PI-103 on receptor tyrosine kinase expressions in MDA-MB-468 and SKBR-3 breast cancer cell lines was investigated. In tumor cells, there were significant decreases in p-Akt and p-p70S6K protein expression during first three hours. This inhibition was followed by reactivation of signaling pathway after six hours. Basal expression of EGFR and HER3 in MDA-MB- 468 cells and basal expression of HER2 and HER3 in SKBR-3 cells were found to be very high. Transient inhibition at Akt and mTOR level in tumor cells followed by reactivation of signaling pathway did not result in a time-dependent change on EGFR, HER2 and HER3 expression levels. According to these results, we concluded that it will also be useful to evaluate receptor kinase activities.

As a result, the impact of dual PI3K/Akt inhibitors on treatment strategies may be relevant to their transcriptional and posttranslational effects on RTK expression. It should be kept in mind that, these inhibitors may trigger RTK reactivation in favor of tumor cells while disrupting signal transduction.

Keywords: EGFR, HER2, HER3, PI3K, mTOR, PI-103, breast cancer

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Reseptör Tirozin Kinazlar	3
2.1.1 Reseptör Tirozin Kinazların Yapısı	3
2.1.2 Reseptör Tirozin Kinazların Aktivasyonu	4
2.2 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörlerinin Yapısı ve Fonksiyonları	6
2.3 Meme Kanseri	10
2.3.1 Epidermal Büyüme Faktörü reseptörleri ve Meme Kanseri	10
2.4 PI3K/Akt Sinyal Yolağı ve Kanser	13
2.4.1 PI3K/Akt Sinyal Yolağı ve Meme Kanseri	16
2.4.2 EGF Reseptör Ailesi İnhibitörleri	17
2.4.3 PI3K/Akt İnhibitörleri	18
2.4.4 mTOR İnhibitörleri	19
2.5 PI-103 (Dual PI3K ve mTOR İnhibitörü)	20
2.6 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri ve Terapötik Yaklaşımlar	21

2.7 Amaç	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1 Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar	24
3.2 Aletler ve Cihazlar	27
3.3 Hücre Kültürü	28
3.4 Tripsinizasyon	29
3.5 İlaç Uygulamaları	30
3.5.1 PI-103 Stok Çözelti Hazırlanışı	30
3.5.2 PI-103'ün Hücre Dizilerine Uygulanması	30
3.6 Lizat Hazırlama	31
3.7 Protein Kantitasyonu	32
3.8 Western Blot	34
3.8.1 Poliakrilamid Jel Elektroforezi	35
3.8.2 Semi-dry Transfer ve Blotlama	37
3.9 Kemoluminesans Görüntüleme	39
3.10 Dansitometrik Analiz	39
3.11 İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1 MDA-MB-468 Hücre Dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu	41
4.1.1 PI-103'ün MDA-MB-468 Hücre Dizisinde p-Akt (Ser473) Ekspresyon Düzeyine Etkisi	41
4.1.2 PI-103'ün MDA-MB-468 Hücre Dizisinde p-Akt (Thr308) Ekspresyon Düzeyine Etkisi	44
4.1.3 PI-103'ün MDA-MB-468 Hücre Dizisinde p-p70S6K Ekspresyon Düzeyine Etkisi	46

4.2 MDA-MB-468 Hücre Dizisinde PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu ve EGFR Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	49
4.3 MDA-MB-468 Hücre Dizisinde PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu ve HER3 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	51
4.4 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu	54
4.4.1 PI-103'ün SKBR-3 Hücre Dizisinde p-Akt (Ser473) Ekspresyon Düzeyine Etkisi	54
4.4.2 PI-103'ün SKBR-3 Hücre Dizisinde p-Akt (Thr308) Ekspresyon Düzeyine Etkisi	56
4.4.3 PI-103'ün SKBR-3 Hücre Dizisinde p-p70S6K Ekspresyon Düzeyine Etkisi	59
4.5 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu ve HER2 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	61
4.6 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu ve HER3 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	64
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

4ICD	HER4 hücre içi bölgesi
ACS	American Cancer Society
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AR	Amfiregulin
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B hücre lenfoma-2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
BH3	Bcl-2 homology domain 3
BTC	Betasellülin
E/K(Lys)	Glutamik asit/Lizin
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
eIF4E	Ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 4E
EPR	Epiregulin
ErbB	Avian erythroblastosis oncogene B
ErbB1	Avian erythroblastosis oncogene B1
ErbB2	Avian erythroblastosis oncogene B2
ErbB3	Avian erythroblastosis oncogene B3
ErbB4	Avian erythroblastosis oncogene B4
ER α	Östrojen reseptörü-alfa
FKBP12	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 12
FOXO	Forkhead Box Protein O
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2

GTP	Guanozin trifosfat
H/R	Histidin/Lösin
HB-EGF	Heparin bağlayan epidermal büyüme faktörü
HER1	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 1
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HER3	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 3
HER4	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 4
HIF-1	Hipoksi ile indüklenebilen faktör-1
Hsp90	Heat shock protein 90
IRS	İnsülin reseptör substratı
JAK	Janus kinase
LRR	Leucine-rich repeat
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
Mcl-1	Myeloid leukemia cell differentiation protein-1
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
NRG	Nörogulin
PDK1	Fosfatidilinozitol bağımlı kinaz 1
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Fosfatidilinozitol 3 kinaz
PIP2	Fosfatidilinozitol 4,5 bisfosfat
PIP3	Fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfat
PKB	Protein kinaz B (Akt)
PKC	Protein kinaz C
PLC γ	Fosfolipaz C γ

PTB	Fosfotirozin bağlanma bölgesi
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RTK	Reseptör tirozin kinaz
S6K	Ribozomal protein S6 kinaz
SCF ^{skp2}	Skp, Cullin, F-box containing complex
Ser(S)/Thr(T)	Serin/Treonin
SH2	Src homology 2 domain
Shc	Src homology 2 domain containing protein
Skp	S-phase kinase-associated protein
Src	Sarcoma
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TACE	Tumor necrosis factor- α converting enzyme
TGF- α	Transforme edici büyüme faktörü-alfa
TSC2	Tuberous sclerosis protein 2
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1	Reseptör tirozin kinaz ailesi	4
Şekil 2.2	Reseptör tirozin kinazların aktivasyon mekanizması	5
Şekil 2.3	Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyon mekanizması	8
Şekil 2.4	Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin sinyal ağı	9
Şekil 2.5	PI3K/Akt sinyal yolağı	15
Şekil 2.6	PI-103 inhibitörünün PI3K/Akt/mTOR ve Ras/Raf/MAPK sinyal yolları üzerine etkisi	20
Şekil 3.1	Hücre kültürü uygulamaları	31
Şekil 3.2	Lizat hazırlama işlemi	34
Şekil 4.1	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi	42
Şekil 4.2	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	43
Şekil 4.3	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	43
Şekil 4.4	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi	44
Şekil 4.5	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	45
Şekil 4.6	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	46

Şekil 4.7	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi	47
Şekil 4.8	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	48
Şekil 4.9	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	48
Şekil 4.10	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi	49
Şekil 4.11	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	50
Şekil 4.12	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu ve EGFR ekspresyonu üzerine etkisi	51
Şekil 4.13	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER3 ekspresyonuna etkisi	52
Şekil 4.14	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER3 ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	53
Şekil 4.15	MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu ve HER3 ekspresyonu üzerine etkisi	53
Şekil 4.16	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi	54
Şekil 4.17	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	55
Şekil 4.18	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	56

Şekil 4.19	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi	57
Şekil 4.20	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	58
Şekil 4.21	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	58
Şekil 4.22	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi	59
Şekil 4.23	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	60
Şekil 4.24	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi (% Değişim)	61
Şekil 4.25	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER2 ekspresyonuna etkisi	62
Şekil 4.26	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER2 ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	63
Şekil 4.27	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu ve HER2 ekspresyonu üzerine etkisi	63
Şekil 4.28	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER3 ekspresyonuna etkisi	64
Şekil 4.29	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER3 ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik analiz)	65
Şekil 4.30	SKBR-3 hücre dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu ve HER3 ekspresyonu üzerine etkisi	66

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 4.1	MDA-MB-468 hücre dizisinde p-Akt (Ser473) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	42
Tablo 4.2	MDA-MB-468 hücre dizisinde p-Akt (Thr308) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	45
Tablo 4.3	MDA-MB-468 hücre dizisinde p-p70S6K ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	47
Tablo 4.4	MDA-MB-468 hücre dizisinde EGFR ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	50
Tablo 4.5	MDA-MB-468 hücre dizisinde HER3 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	52
Tablo 4.6	SKBR-3 hücre dizisinde p-Akt (Ser473) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	55
Tablo 4.7	SKBR-3 hücre dizisinde p-Akt (Thr308) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	57
Tablo 4.8	SKBR-3 hücre dizisinde p-p70S6K ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	60
Tablo 4.9	SKBR-3 hücre dizisinde HER2 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	62
Tablo 4.10	SKBR-3 hücre dizisinde HER3 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu	65

1. GİRİŞ

Ökaryotik organizmalardaki hücrelerin kaderi hücre dışından alınan sinyaller ile belirlenmektedir. Bu sinyaller, hücre yüzeyinde bulunan çeşitli reseptör tirozin kinazlar (RTK) aracılığı ile hücre dışından hücre içine taşınırlar. Böylece hücre içindeki sinyal yollarını aktive ederek hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını, gelişimini, sağkalımını ve migrasyonunu düzenlerler. Reseptör tirozin kinazların ve sinyal yollarında rol alan moleküllerin ekspresyon düzeylerinde, aktivitelerinde ve/veya yolların düzenlenmesinde meydana gelen değişiklikler kanserin gelişimine katkıda bulunmaktadır (1, 2).

Reseptör tirozin kinaz ailesinde yer alan çeşitli büyüme faktörü reseptörleri karsinogenez sürecinde önemli bir yere sahiptir. Bu büyüme faktörü reseptörlerinden epidermal büyüme faktörü reseptör (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*) ailesi içinde yer alan EGFR (ErbB1/HER1), HER2 (ErbB2/neu) ve HER3 (ErbB3) reseptörleri PI3K/Akt/mTOR (*Phosphatidylinositol 3-kinases/Akt/Mammalian target of rapamycin*) sinyal yolağının aktivasyonunun başlamasından sorumlu olan membran proteinleridir. Tümör hücrelerinde bu reseptör tirozin kinazları kodlayan genler mutasyona veya amplifikasyona uğrayabilir ya da bu genlerde ekspresyon artışı görülebilir (3-5).

EGFR-HER3 ve HER2-HER3 komplekslerinin aktive ettiği önemli sinyal yollarından biri PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağıdır. Bu yolak gen transkripsiyonu, hücre migrasyonu, apoptozis, sağkalım gibi hücre fonksiyonları düzenler (6). İnsan kanserlerinde ise bu sinyal yolağı hücre çoğalmasından invazyona, apoptozisin inhibisyonundan anjiyogeneze ve tümör büyümesinden metastaza kadar birçok metabolik ve fizyolojik işlevden sorumlu olan bir yolaktır. Kanser hücrelerinde bir tümör baskılayıcı proteinin kaybı (PTEN) ya da bir onkoprotein fonksiyon kazanması bu sinyal yolağının kontrolsüz olarak aktive olmasına ve tümör oluşumuna yol açmaktadır. Meme kanseri de bu tümörler arasında yer almaktadır (7).

PI3K/Akt sinyal yolağının önemli bir bileşeni olan Akt kinazın aktivasyonu reseptör tirozin kinazların ekspresyonunu düzenler. Aktif Akt, reseptör tirozin kinazları kodlayan genler ile etkileşime girerek bu genlerin ekspresyonunu gerçekleştiren proteinleri fosforilleyip inaktive eder. Bu şekilde reseptör tirozin kinazların ekspresyonunu önler (8).

Dual PI3K-mTOR inhibitörleri PI3K ve mTOR komplekslerinin aktivasyonunu engeller. Böylece hem mTORC1-S6K (*The mammalian target of rapamycin complex 1- Ribosomal protein S6 kinase*) sinyalinin RTK substratları üzerinde oluşturduğu negatif geri bildirim mekanizması ortadan kalkar hem de bu geri besleme mekanizmasının ve mTORC2 (*The mammalian target of rapamycin complex 2*) fosforilasyonu sonucu Akt kinazın, reseptör tirozin kinazları kodlayan genlerin ekspresyonunda rol alan proteinleri fosforilleyerek inaktive etmesi önlenir. Sonuç olarak PI3K ve mTOR komplekslerinin inhibisyonu reseptör tirozin kinazların fosforilasyonunu ve ekspresyonunu uyarır (8, 9).

PI-103, PI3K ve mTOR proteinlerinin dual bir inhibitörü olup, hem PI3K'nın katalitik kısmı olan p110 α ile etkileşime girerek PI3K'yi inaktive hem de mTOR kompleksleri olan mTORC1 ve mTORC2'yi inhibe ederek S6K ve Akt proteinlerinin aktivasyonunu önlediği çeşitli kanser hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (10).

Bu çalışmanın amacı; PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının PI-103 ile farmakolojik inhibisyonunu sağlamak ve EGFR amplifikasyonu olan MDA-MB-468 hücre dizisi ile, HER2 amplifikasyonu olan SKBR-3 hücre dizisinde bu inhibisyonun reseptör tirozin kinaz ekspresyonları üzerindeki zamana bağlı etkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Reseptör Tirozin Kinazlar

Kompleks organizmalarda hücreler hem dış çevreden hem de komşu hücrelerden gelen devamlı bilgi akışına maruz kalırlar. Bu sinyallerin bütünlüğü ve hücre tarafından doğru bir şekilde yorumlanması hücrenin ve organizmanın bulunduğu çevreye adaptasyonunu sağlar. Bu adaptasyonda membrana lokalize olmuş reseptörler önemli rol oynarlar. Bunlardan tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler geniş bir aile oluşturmaktadır (2, 11).

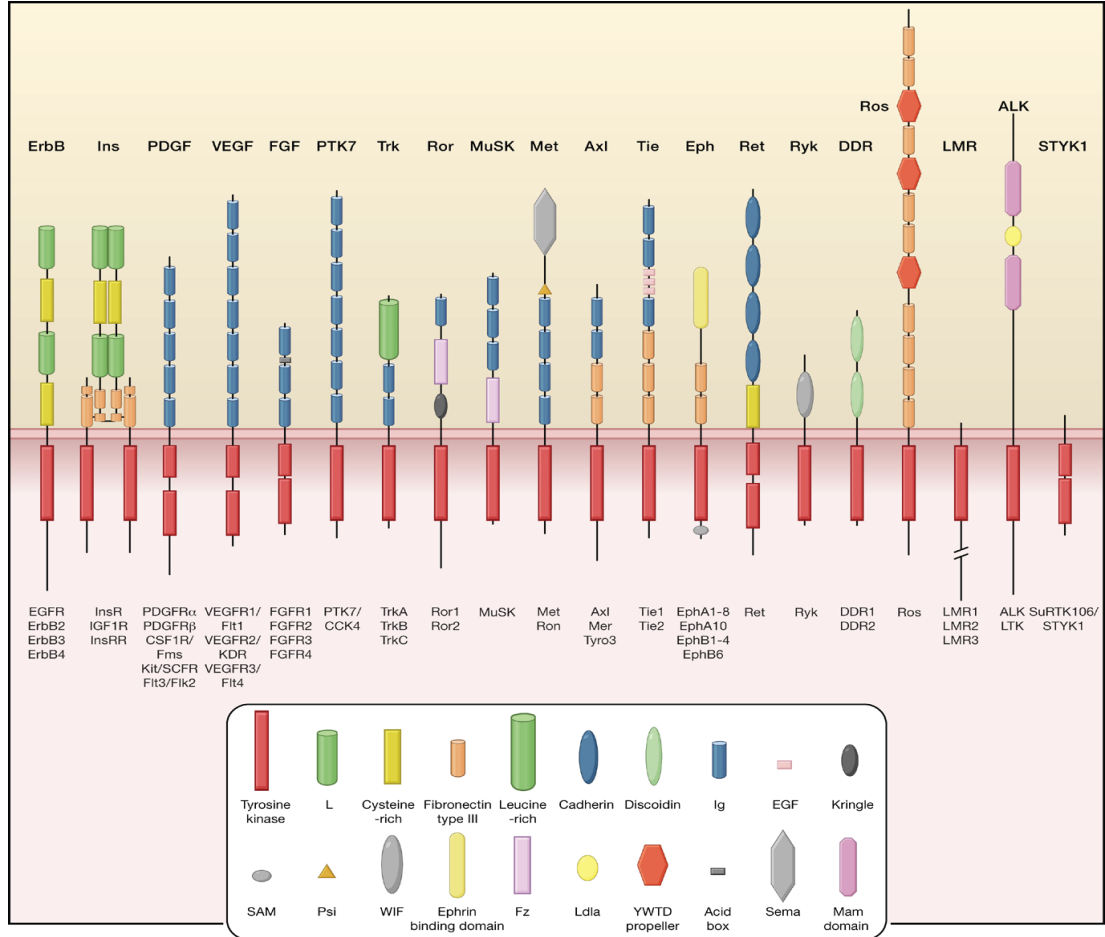
Reseptör tirozin kinazlar (RTK) büyüme faktörleri ve hormonlar gibi birçok polipeptit için yüksek afiniteye sahip hücre yüzey reseptörleridir. İnsan genomunda bulunan 58 adet reseptör tirozin kinaz amino asit sekanslarındaki benzerlikler, yapıları ve biyolojik fonksiyonları dikkate alınarak 20 gruba ayrılmıştır. Bu ailenin üyeleri proliferasyon, farklılaşma, sağkalım, metabolizma, hücre göçü, anjiyogenez, invazyon, metastaz, apoptoz ve hücre döngüsünün kontrolü gibi önemli hücresel süreçlerde görev almaktadır (1, 12).

2.1.1 Reseptör Tirozin Kinazların Yapısı

RTK'ların çoğu ortamda ligand olmadığı zaman hücre zarında monomerik ve inaktif halde bulunurlar. Bu reseptörlerden insülin reseptörü ise disülfid bağları aracılığı ile dimer oluşturarak hücre zarında multimerik kompleksler halinde yer almaktadır. Her bir monomer hücre dışı ligand bağlanma bölgesi, transmembran bölgesi ve hücre içi kinaz aktivitesine sahip katalitik kısımdan oluşmaktadır (1, 13).

Hücre dışı N-terminal bölgesi genellikle immünoglobulin benzeri veya EGF benzeri yapılar, fibronektin tip III tekrarları veya sistein amino asidi bakımından zengin olan bölgeler içerir. Bunlar RTK'ların her bir alt grubu için karakteristiktir. Transmembran bölgesi hidrofobik olup hücre zarına gömülü

olarak bulunur. Bu bölge 25-38 amino asitten oluşan α -heliks yapısındadır. Hücre içi C-terminal bölgesi reseptörün tirozin kinaz aktivitesinden sorumludur. Bu bölge, çok sayıda tirozin rezidüsü içeren katalitik kısımdan ve ATP bağlanma bölgesinden meydana gelmektedir (Şekil 2.1) (14, 15).



Şekil 2.1 Reseptör Tirozin Kinaz Ailesi

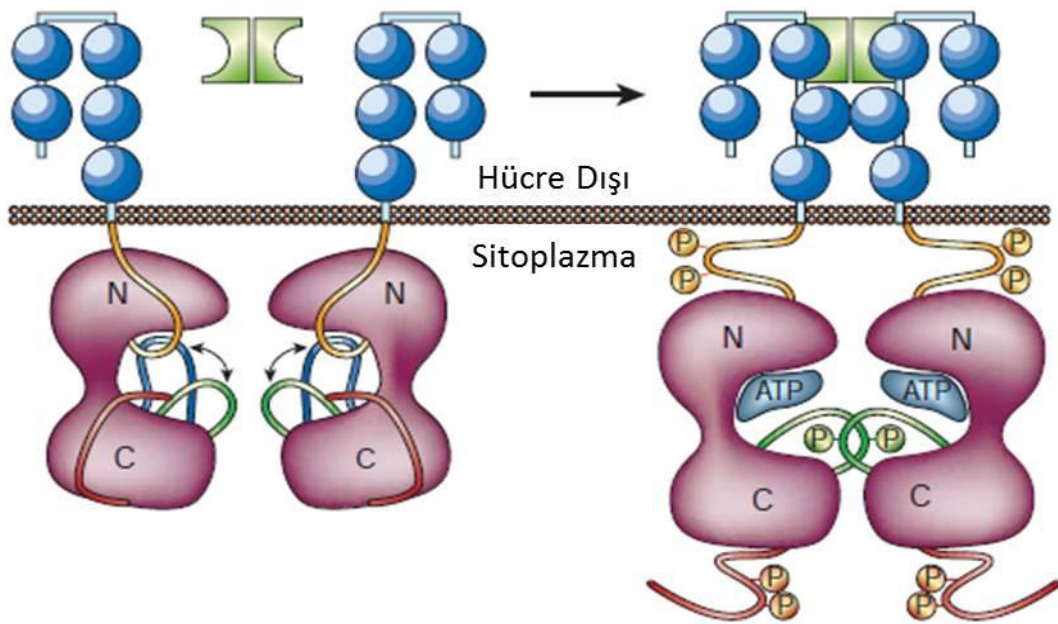
(Lemmon M.A., Schlessinger J., 2010'dan alınmıştır.)

2.1.2 Reseptör Tirozin Kinazların Aktivasyonu

Büyüme faktörlerinin yokluğunda hücre yüzeyinde monomerik halde bulunan reseptör tirozin kinazlar, hücre dışında kalan kısımlarının ligand ile etkileşiminden sonra konformasyonel değişikliğe uğrarlar. Bağlanan ligand iki reseptör molekülü arasında spesifik etkileşimler meydana getirerek

reseptörlerin dimerizasyonuna yol açar. Böylece hücre içi kinaz bölgelerinin aktivasyonu sağlanır (1, 2, 13).

İnaktif kinaz yapıları reseptörden reseptöre farklılık göstermektedir. Buna göre reseptörlerin aktivasyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmalarda çeşitlilik gösterirler. Reseptör tirozin kinazların, kinaz bölgesinde bulunan aktivasyon ilmeği, inaktif konformasyonda olan reseptörde, kinaz bölgesindeki aktif merkezin substratlar ve ATP ile etkileşimini önler. Reseptör tirozin kinazların juxtamembran bölgesi veya C-terminal bölgesi de inaktif konformasyonu sağlamak amacıyla kinaz bölgesinin aktif kısmı ile etkileşebilir. Ligandın reseptöre bağlanmasından sonra ise, aktivasyon ilmeğinde, juxtamembran bölgesinde ve C-terminal bölgesinde bulunan tirozin rezidülerinin transfosforilasyonu gerçekleşir ve inhibitör etkileşimler ortadan kalkar (Şekil 2.2) (1, 2).



Şekil 2.2 Reseptör tirozin kinazların aktivasyon mekanizması

(Blume-Jensen P., Hunter T., 2001'den alınmıştır.)

İki reseptör dimer oluşturduğunda allosterik etkilerinde artış meydana gelir. Bu etkiler ligand uyarısı ile aktifleşen kinaz bölgesinin diğer kinaz bölgesi ile etkileşimini artırır ve transfosforilasyon gerçekleşir. Bu olay üç fazda meydana gelir. Birinci faz, reseptör ilişkili ligandına bağlandığında kinazın katalitik aktivitesini arttırmak için; ikinci faz, sitoplazmik sinyal moleküllerinin fosfotirozin içeren bağlanma bölgeleri ile etkileşmesi için üçüncü faz ise sinyal yollarındaki hedef moleküllerin aktivitesini en üst düzeye çıkarmak için gerçekleşir (1, 2).

Kinaz domainlerinin otofosforilasyonu katalitik aktiviteyi artırır. Fosforile tirozinler hücre içi sinyal molekülleri için bağlanma bölgesi olarak görev yaparlar. Bu moleküller fosfotirozinlere spesifik olarak bağlanan SH2 (*Src Homology 2*) ve PTB (*Phosphotyrosine-binding*) bölgeleri içerirler. Bu proteinler, kinaz bölgesi ile doğrudan etkileşebilirler veya adaptör proteinlere bağlanarak dolaylı yoldan etkileşime girerler. Böylece proliferasyon, farklılaşma, sağkalım, hücre göçü, metabolizma, apoptoz gibi hücre fonksiyonlarda rol oynayan sinyal yollarını aktive ederler (16, 17).

2.2 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörlerinin Yapısı ve Fonksiyonları

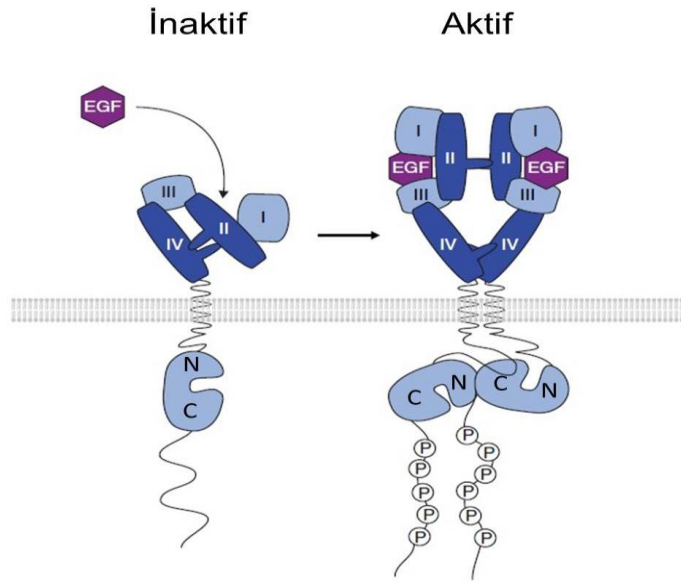
Reseptör tirozin kinaz ailesinin önemli alt gruplarından biri epidermal büyüme faktörü reseptörleridir (EGFR/HER/ErbB). Normal koşullarda bu reseptörlerin aktivasyonu EGF ilişkili büyüme faktörü ailesinin üyeleri aracılığı ile kontrol edilir (11).

Epidermal büyüme faktörü reseptörleri tek bir ligand-reseptör kombinasyonundan evrimleşmiştir. Nematod *Caenorhabditis elegans*'da EGF reseptörlerinin sadece bir homoloğu ve tek ligandı vardır. Bu reseptör ve ligandı nematodların gelişimi sırasında hücre kaderinin belirlenmesinde etkilidir. Meyve sineği *Drosophila melanogaster*'da EGF reseptörlerinin beş ligandı ve bir reseptörü vardır. Bu reseptör ve ligandları embriyogenez sırasında hücre proliferasyonu ve farklılaşmada etkilidir. Yüksek omurgalılarda ise dört EGF reseptörü ve çok sayıda ligandı bulunmaktadır.

Bu da yüksek derecede sinyal çeşitliliği sağlamaktadır. Gelişim boyunca çeşitli dokularda EGF reseptörlerinin ekspresyonu hücre proliferasyonu ve farklılaşmanın kontrolünde önemli rol oynamaktadır (11, 18, 19).

Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin dört üyesi vardır. Bunlar EGFR (ErbB1/HER1), HER2 (Neu/ErbB2), HER3 (ErbB3) ve HER4 (ErbB4)'tür. Bu reseptörlerin hücre dışında kalan kısımları dört bölgeden oluşmaktadır. I ve III nolu bölgelerin herbiri yaklaşık 160 amino asit uzunluğunda olup β -helix LRR (*Leucine-rich repeat*) benzeri solenoid yapılar içerirler. Bu kısımlar ligandın bağlandığı bölgelerdir. II ve IV nolu bölgeler ise, sistein amino asidi bakımından zengin bölgeler olup her biri yaklaşık 150 amino asit içermektedir. Bu bölgeler dimer oluşumunda rol alırlar. İnaktif HER yapısı dimerizasyondan sorumlu olan II ve IV nolu bölgeler arasındaki intramoleküler etkileşimler ile karakterize edilir. Böylece HER'in inaktif konformasyonu sağlanır. HER'in dimerizasyonu tamamen reseptör-reseptör etkileşimi aracılığı ile olmaktadır. Ligand monomer halde olan reseptörün iki farklı bölgesine (I ve III) bağlanır. Dimer yapısını oluşturan reseptörlerin her ikisinin de I ve III nolu bölgelerine ligandın bağlı olması gerekmektedir. Ligandın bağlanmasından sonra HER'in ekstrasellüler bölgesi konformasyonel değişime uğrar ve reseptörler II nolu bölgeleri aracılığı ile dimer yapısını meydana getirir. IV nolu bölge ise dimerleri maksimum aktivasyonu sağlayacak konfigürasyona yönlendirmektedir (1, 19, 20).

HER'in tirozin kinaz bölgesi, dimer oluşturan reseptörlerden birinin kinaz bölgesindeki C lobu ile diğerinin kinaz bölgesindeki N lobu arasında doğrudan meydana gelen etkileşimler ile allosterik olarak aktive olur. Bu etkileşimde C lobunu içeren kinaz bölgesi N lobunu içeren kinaz bölgesinin aktivasyon ilmeğindeki otoinhibitör etkileşimleri bozarak, dimerin kinaz aktivasyonunu uyarmaktadır (Şekil 2.3) (19, 21).

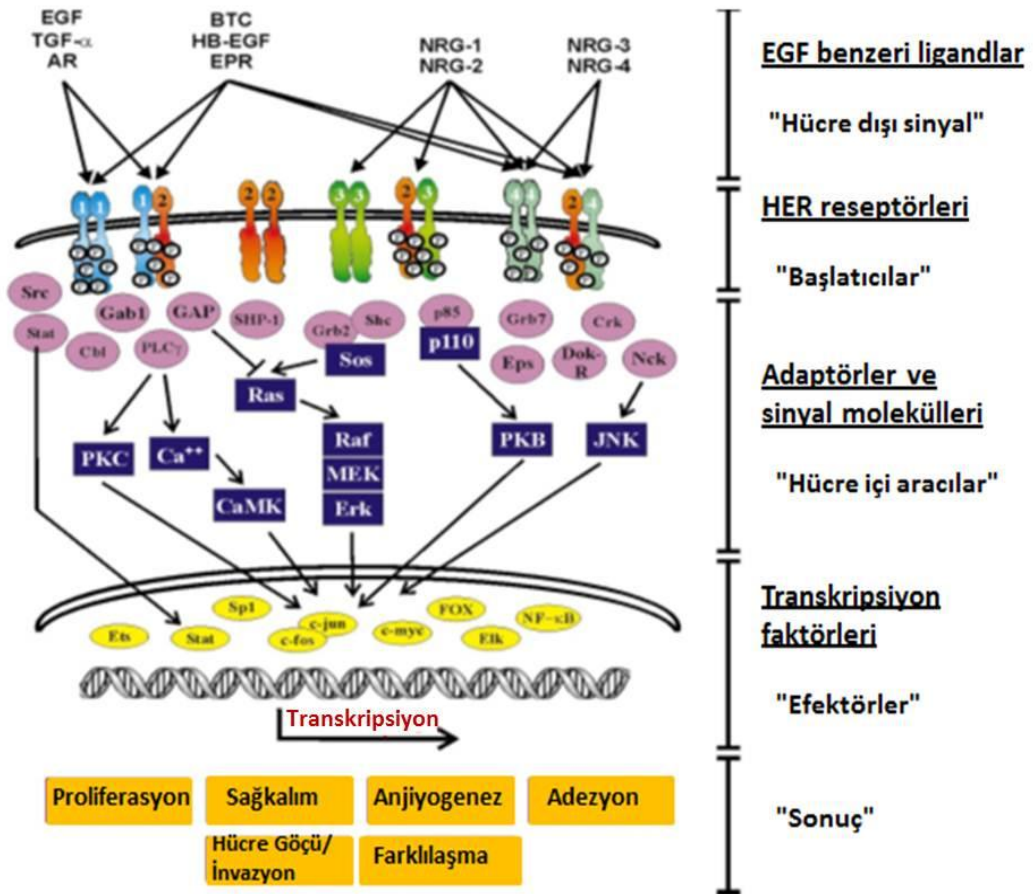


Şekil 2.3 Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyon mekanizması
(Huang L., De Baetselier P., Beyaert R., 2009'dan alınmıştır.)

HER reseptörlerinden HER2'nin ligand bağlama bölgesi yoktur. I ve III nolu bölgelerin birbirine çok yakın konumda bulunması bu bölgeye ligandın bağlanmasını imkansız hale getirmektedir. Bu nedenle HER2 reseptörü EGF ilişkili peptitler ile etkileşim kuramaz. HER2 reseptörü diğer HER reseptörleri ile heterodimer oluşturarak aktive olmaktadır. Diğer bir HER reseptörü olan HER3 ise kinaz aktivitesine sahip bölge içermemektedir. Bu nedenle HER3 de diğer HER reseptörleri ile heterodimer oluşturarak hücre içi sinyal iletiminde rol oynamaktadır (11, 20).

Memelilerde her bir HER ligandı bağlanma özgülüğü içeren EGF benzeri yapı bulundurur. Bu ligandlar bir ya da daha fazla HER reseptörüne olan afinitelerine göre sınıflandırılırlar. EGF, TGF- α ve amfiregulin (AR) EGFR reseptörüne spesifiktir. Betasellülin (BTC), heparin bağlayan EGF (HB-EGF) ve epiregulin (EPR) hem EGFR'e hem de HER4'e bağlanabilir. Nörogulinler (NRG1-4) ise hem HER3'e hem de HER4'e özgül olan ligandlardır (22, 23).

Ligandın ilişkili reseptöre bağlanması sonucu homo- veya heterodimer oluşumu meydana gelir. Böylece intrinsik kinaz bölgesi aktive olur ve reseptörün sitoplazmik kısmındaki spesifik tirozin rezidüleri fosforillenir. Bu fosforillenen tirozin rezidüleri hücre içi yolların aktivasyonuna yol açan ve SH2 veya PTB yapısı içeren çeşitli sinyal molekülleri için bağlanma bölgesi oluşturur. Böylece çeşitli hücre içi biyolojik olayları düzenleyen Ras/ MAPK (*Rat sarcoma - Mitogen activated protein kinases*), PKC (*Protein kinase C*), PI3K/Akt, JAK/STAT (*Janus kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription*) gibi sinyal yollarının aktivasyonu sağlanır. Bu aktivasyonlar birçok molekülün transkripsiyonel olarak düzenlenmesinden sorumludur (Şekil 2.4) (23-25).



Şekil 2.4 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörlerinin Sinyal Ağı

(Holbro T., Hynes N., 2004'ten alınmıştır.)

2.3 Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın olan kanser tipi 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 vakası tanımlanmış olup bu nedenle ölenlerin sayısı 465,000 olarak rapor edilmiştir. Batı ülkelerinde, son 25 yılda meme kanseri vakalarındaki artışın %30 civarında olduğu belirtilmiştir (26, 27).

Meme kanseri, klinik ve moleküler açıdan oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu karmaşık yapının ortaya çıkmasında yapısal heterojenite, gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar ve tümörün mikroçevre ile etkileşimi rol oynamaktadır. Böylece tümör gelişimi sırasında, normal biyolojik fonksiyonlarda bir takım bozukluklar meydana gelmektedir. Proliferatif sinyalin sürekliliği bu bozukluklardan biri olup tümör hücrelerinden büyüme faktörlerinin salgılanmasında etkili olmaktadır. Bu hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörler ise, büyüme faktörleri ile etkileşime girerek fonksiyon göstermektedir. Ancak, bu reseptörlerin ekspresyon düzeylerindeki artışlar veya yapısal bozulmalar tümör hücrelerinde proliferasyonda rol oynayan sinyal yollarının kontrolsüz şekilde aktivasyonuna yol açmaktadır (28, 29).

2.3.1 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri ve Meme Kanseri

Meme kanserinin oluşumunda çeşitli hücrel mekanizmalar ve genetik değişiklikler rol oynamaktadır. İnsanda görülen kanser türlerinin çoğunda olduğu gibi meme kanseri de reseptör tirozin kinazlarda meydana gelen değişimler ile ilişkilidir (30).

Reseptör tirozin kinaz ailesi içinde yer alan epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonu, mutasyonlar ve otokrin/parakrin uyarımlar aşırı aktivasyona yol açarak solid tümörlerin patogeneğinde önemli rol oynar ve tümörojenik davranışların temelinde yer alan kontrolsüz sinyal fonksiyonlarına doğrudan katkı sağlar (19, 31, 32).

Epidermal büyüme faktörü reseptörlerini etkileyen çeşitli mekanizmalar meme kanseri oluşumunda rol oynamaktadır. Bu ailenin ilk keşfedilen üyesi olan EGFR(HER1)'nin hücre dışı bölgesi ve hücre içi kinaz bölgesinde meydana gelen delesyonlar veya bu reseptörün aşırı ekspresyonuna yol açan gen amplifikasyonları meme kanseri oluşumunda etkili olmaktadır. EGFRvIII, meme karsinomlarında en sık görülen EGFR delesyonudur. Bu delesyon reseptörün kinaz bölgesinde meydana gelir ve reseptörün sürekli olarak aktivasyonuna yol açar. Böylece ligandan bağımsız olarak, çeşitli hücre içi sinyal yolları aracılığı ile hücre proliferasyonu uyarılır. Gen amplifikasyonları ve epigenetik mekanizmalar aracılığı ile reseptörün aşırı eksprese edilmesi, bu reseptörün diğer reseptörler ile etkileşimini artırarak hücre içi sinyal yollarının aşırı aktivasyonuna yol açar (23, 33-35).

HER2 reseptörü meme kanseri patogeneğinde önemli bir yere sahiptir. HER2, tümörojenik fonksiyonunu aşırı eksprese edilmesi ile gösterir. Bu aşırı ekspresyon meme epitel hücrelerine proliferatif avantaj sağlayarak ve anti-apoptotik değişikliklere yol açarak hücrel transformasyonu ve tümör gelişimini uyarmaktadır. HER2 proteininin aşırı ekspresyonu gen amplifikasyonları ve transkripsiyonel degradasyon ile ilişkili olup meme kanserlerinin %25-30'unda görülür ve kötü prognozla ilişkilidir. Meme kanseri hücreleri HER2 geninin 25-50 kopyasına sahiptir ve bu kanser türünde HER2 proteininin ekspresyonu normal meme dokusuna göre 40-100 kat daha fazladır. HER2 reseptörünün aşırı ekspresyonu meme kanserlerinin erken aşamalarında görülmekte olup invaziv ve metastatik gelişim sırasında bu ekspresyon devam etmektedir. HER2 proteininin aşırı ekspresyonu aynı zamanda HER ailesinin diğer üyeleri ile oluşturduğu dimerlerin kompozisyonunu değiştirir. HER2 içeren dimerler uzun süreli ve şiddetli sinyal aktivitesine sahip olup bu dimerlerin sayısındaki artış hücre polaritesinde ve hücre adezyonunda bozulmalara yol açar (34, 36).

HER2 reseptörünün aşırı ekspresyonu, bu reseptörün EGFR ve HER3 ile heterodimerizasyonunda da artışa neden olmaktadır. HER2'nin EGFR ile yaptığı heterodimer Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), Shc (*Src homology 2 domain containing*) ve Src (*Sarcoma*) proteinleri aracılığı ile

PI3K/Akt, Ras/MAPK ve PLC γ (*Phospholipase C*) sinyal yollarını uyarır ve böylece invaziv fenotipin oluşumuna katkı sağlar (37, 38). HER2, EGFR'nin hücre yüzeyindeki stabilizasyonunda da önemli rol oynar. EGFR reseptöründen ilişkili ligandın ayrılmasını azaltarak dimeri devamlı olarak aktif halde tutar. HER2 reseptörü içeren dimerler hücre yüzeyindeki diğer dimerlere göre daha stabildir ve endositoza uğrama oranları daha düşüktür. Bu dimerler internalize olduktan sonra endositoza uğramadan hücre yüzeyine geri dönerek reseptör kompleksinin tekrardan aktivasyonunu sağlarlar ve büyüme faktörü sinyalini uyarırlar (18, 36, 39).

HER2 reseptörünün HER3 reseptörü ile oluşturduğu heterodimer güçlü mitojenik sinyaller oluşturması bakımından meme kanseri patolojisinde önemlidir. Özellikle HER2'nin aşırı eksprese edildiği tümörlerde HER3, tümör gelişimi ve hücre proliferasyonu için gerekli bir reseptördür (40).

HER3, intrinsik kinaz aktivitesine sahip olmayan tek epidermal büyüme faktörü reseptörüdür. Bu nedenle diğer epidermal büyüme faktörü reseptörleri ile zorunlu olarak heterodimer oluşturmak suretiyle aktivite gösterir. HER3 amplifikasyonu veya mutasyonu içeren bir kanser türü bulunmamaktadır. Ancak diğer HER ailesi üyeleri tarafından aktive edilen HER3'ün sitoplazmik bölgesi çoğu kanserde kritik öneme sahiptir (31)

HER ailesi üyelerinden EGFR ve HER2, hücre proliferasyonu ve sağkalımda rol oynayan PI3K/Akt sinyal yolağındaki PI3K molekülünü doğrudan aktive edemez. HER3'ün meme kanseri gelişimindeki önemi, bu reseptörün PI3K molekülünü doğrudan aktive etmesidir. HER3, C-terminal kuyruğunda PI3K'nın düzenleyici alt ünitesi olan p85 proteinine bağlanan altı adet fosfotirozin rezidüsü içerir. Bu bağlanma bölgeleri ile doğrudan etkileşime giren p85 proteini PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonuna yol açar. Özellikle HER2 aracılı transformasyonda HER3, HER2'nin zorunlu partneri olarak rol oynamaktadır. Bu nedenle HER3'ün ekspresyonunda, fosforilasyonunda ve aktivasyonunda meydana gelen artışlar HER2'nin aşırı eksprese edildiği meme tümörlerinde sıklıkla görülür. HER3 aktivitesinin

artması bu tümörlerde PI3K/Akt sinyal yolağının aşırı aktivasyonuna yol açmaktadır (31).

Epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin son üyesi olan HER4 reseptörü, diğer reseptörlerden farklı olarak hem proliferatif hem de pro-apoptotik etkilere sahiptir. HER4, aktivitesini hücre içi bölgesi (4ICD) aracılığı ile gösterir. HER4'ün hücre içi bölgesi, TACE (*Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*) ve γ -sekretaz aktivitesi ile reseptörden ayrılarak sitoplazmada serbest hale geçer. 4ICD sitoplazmada kalabilir veya nükleusa geçebilir. Bu yapı meme epitel hücrelerinin farklılaşması, pro-apoptotik yolların aktivasyonu, hücre döngüsünün durması, transkripsiyonun modülasyonu, proliferasyon gibi çeşitli biyolojik aktivitelere ve hücre sel yanıtına yol açar. Bu hücre sel faaliyetler 4ICD'nin farklı hücre kompartımanlarındaki lokalizasyonu ile ilişkilidir. Nükleer 4ICD, ER α (*Estrogen receptor α*) ko-aktivatörü olarak fonksiyon gösterir ve ER α ligandları ile doğrudan etkileşerek ER α pozitif meme kanseri hücrelerinde proliferasyonu artırır. Sitozolik 4ICD mitokondride birikir ve BH3 (*B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) homology domain 3*) bölgesi aracılığı ile tümör hücrelerinde apoptozu uyarır. 4ICD'nin hücredeki lokalizasyonu dikkate alınarak meme kanseri hastalarının prognozu belirlenebilir. HER4'ün sitozolik ekspresyonu meme kanseri hastalarının sağkalımında artışa yol açar ve iyi prognoz ile ilişkilidir. Bu bölgenin nükleer ekspresyonu ise sağkalımı azaltır ve kötü prognozla ilişkilidir (41).

2.4 PI3K/Akt Sinyal Yolağı ve Kanser

PI3K/Akt sinyal yolağı hücre proliferasyonu, büyüme, sağkalım ve migrasyon gibi biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir yolaktır. Bu yolda yer alan proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar hücre sel transformasyona neden olmaktadır (7, 42, 43).

PI3K ailesi hücre dışından RTK'lar aracılığı ile alınan büyüme ve yaşam sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir. PI3K proteinleri dizi

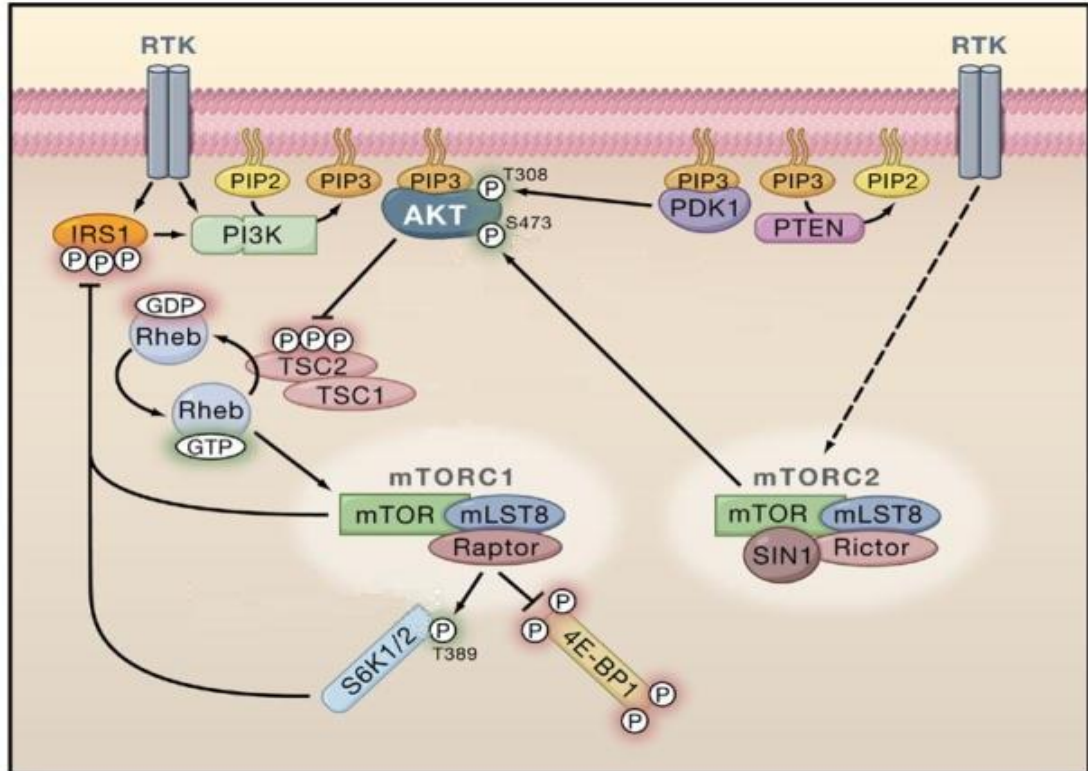
homolojileri, substrat tercihleri ve dokulardaki dağılımlarına göre üç sınıfa ayrılırlar. PI3K sınıf 1A tümör gelişiminde ve kanserde rol oynayan önemli proteinleri içermektedir. Sınıf 1A PI3K'lar p85 düzenleyici alt ünitesi ve p110 katalitik alt ünitesinden oluşan bir heterodimerdir (44-46).

PI3K'nın aktivasyonu, büyüme faktörü veya ligandın özgül olarak reseptör tirozin kinazlara bağlanması sonucu meydana gelir. Uyarılmamış hücrelerde, PI3K heterodimerinde yer alan p85 düzenleyici alt birimi, p110 katalitik alt birimine bağlı halde bulunur ve bu katalitik alt birimi inaktive eder. RTK aktivasyonu ile oluşan fosforile tirozin rezidüleri p85 için bağlanma bölgeleri oluşturur. Bu bağlanma p85'in p110 üzerindeki inhibitör etkisini sonlandırır. Böylece p110 katalitik alt ünitesi serbest kalır ve PI3K'nın aktivasyonunu sağlar. Aktive olan kinaz PIP2'nin (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) PIP3'e (*Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*) dönüşümünü sağlar. PIP3, Akt ve PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*) gibi PH (*Pleckstrin homology*) bölgesi içeren adaptör ve efektör proteinlerin hücre membranına birikimini sağlar. PH bölgelerinin PIP3 ile etkileşimi bu moleküllerin aktivasyonuna yol açar (44, 47, 48).

Akt, multifonksiyonel bir serin/treonin kinaz olup hücre döngüsü, sağkalım, hücre gelişimi, hücre metabolizma, anjiyogenez, migrasyon ve invazyon gibi faaliyetleri düzenlemektedir. Akt proteininin farklı genler tarafından kodlanan 3 izoformu vardır. Bu izoformların ekspresyonu doku tipine bağlı olarak değişmektedir. Akt'nin aktivasyonu PI3K tarafından düzenlenmektedir. Akt, PI3K aktivasyonu ile oluşan PIP3'e bağlanarak hücre membranı ile etkileşime girer ve burada PDK1 tarafından T308 ve mTORC2 kompleksi tarafından S473 rezidülerinden fosforillenerek aktive olur. Aktif Akt farklı hücre fonksiyonları gerçekleştiren hedef proteinleri fosforilleyerek onların aktivasyonuna ya da inaktivasyonuna yol açmaktadır. Pro-apoptotik proteinlerin fosforile edilmesi inaktivasyona yol açar ve sağkalımı uyarılır. Hücre döngüsünde yer alan inhibitörleri ve aktivatörleri modüle ederek hücre döngüsünün ilerleyişini ve proliferasyonu uyarır. Bunun yanında HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*) ve VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) ekspresyonları Akt uyarısı ile indüklenerek anjiyogenez uyarılır. Akt, FOXO

(*Forkhead Box Protein O*) transkripsiyon faktörlerinin lokalizasyonunu da düzenlemektedir. Akt, FOXO proteinlerini fosforile ederek nükleusta bulunan 14-3-3 proteini için bağlanma bölgesi oluşturur. Bu protein ise FOXO ailesi üyelerinin hedef genlere bağlanmasını engelleyerek nükleustan sitozole geçişini sağlamaktadır (Şekil 2.5) (42, 49-51).

mTORC1, Akt'nin modüle ettiği önemli bir protein kompleksidir. mTORC1 aktivasyonu besin ve büyüme faktörü sinyallerinin etkileşimi ile meydana gelir. Akt TSC2'yi (*Tuberous sclerosis protein 2*) fosforilleyerek inaktive eder böylece Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) proteini GTP (*Guanosine triphosphate*) ile etkileşerek aktive olur ve mTORC1 uyarır. mTORC1 de S6K ve eIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*) aracılığı ile protein sentezini ve hücre büyümesini uyarır. mTORC1 tarafından aktive edilen S6K proteini PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinde bir negatif geri bildirim yapmaktadır (52-54).



Şekil 2.5 PI3K/Akt Sinyal Yolağı

(Manning B.D., Cantley L.C., 2007'den alınmıştır.)

Kanser hücrelerinde kontrolsüz olarak aktive olan PI3K/Akt sinyal yolağı hücre proliferasyonundan sağkalıma, migrasyondan invazyona ve tümör büyümesinden anjiyogeneze kadar birçok işlevde rol oynamaktadır. Bu hücrelerde tümör baskılayıcı proteinlerin fonksiyonel kaybı veya bir onkoproteinin aktivasyonu da karsinogenezde önemlidir (7, 55).

PI3K/Akt yolağının birçok bileşeni kanserde genetik olarak değişime uğramıştır. Bu yolda tümör baskılayıcı protein olarak görev alan PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) dual lipid ve protein fosfatazdır. PI3K'nın ürünü olan PIP3'ün PIP2'ye dönüşümünü sağlar. Böylece Akt ve PDK1 gibi PH bölgesi içeren moleküllerin plazma membranına birikimini engelleyerek yolağı inaktive eder. Tümör hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar, delesyonlar ve promotor metilasyonları PTEN'in fonksiyonel kaybına yol açar. Bu da PI3K/Akt yolağının kontrolsüz aktivasyonunu tetikler (56-58).

2.4.1 PI3K/Akt Sinyal Yolağı ve Meme Kanseri

Hücrede, sinyal iletimi, hücre gelişimi, proliferasyon ve apoptozu düzenleyen yollarda meydana gelen değişimler meme kanserinde rol oynarlar. Bu nedenle PI3K/Akt sinyal yolağı meme kanseri çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. PI3K/Akt sinyal yolağının aberan aktivasyonu ile ilişkili genetik değişiklikler, PIK3CA ve Akt mutasyonları ve PTEN tümör baskılayıcı proteininde fonksiyon kaybına yol açan mutasyondur (59-61).

Meme kanserinde görülen PI3K/Akt yolağı mutasyonlarından en önemlisi p110 α katalitik alt ünitesini kodlayan PIK3CA geninde meydana gelen mutasyonlardır. Bu mutasyonlar üç amino asit rezidüsünün başka amino asit rezidüleriyle yer değiştirmesi sonucu meydana gelir. Bunlar helikal bölgede bulunan E542K, E545K ve kinaz bölgesinde bulunan H1047R rezidüleridir. Bu mutasyonlar p85 düzenleyici alt birimi ile p110 α katalitik alt birimi arasındaki etkileşimi inhibe ederek enzimatik fonksiyonun artışına yol açar. Ayrıca Akt'nin PH bölgesindeki 17. amino asit olan lizinin glutamik asit ile yer değiştirmesi (E17K), bu serin/treonin kinazın plazma membranına

sürekli lokalizasyonunu sağlar. Böylece Akt sinyal molekülünün aktivasyonu artar ve onkojenik transformasyona neden olur (62-64).

Hücre dışından sinyalin alınıp hücre içine aktarılmasını sağlayan reseptör tirozin kinazların, özellikle HER2, amplifikasyonu ve ekspresyonundaki artış meme kanseri patofizyolojisinde önemli bir yere sahiptir. Buna ek olarak, HER2/HER3 heterodimerinin aktivasyonu da PI3K/Akt sinyal yolağının anormal bir şekilde uyarılmasını sağlamaktadır (65, 66).

PI3K/Akt sinyal yolağı mutasyonları, meme kanserinde özellikle HER2 hedefli tedavilere direnç gelişiminde önemli rol oynarlar (66,67).

2.4.2 EGF Reseptör Ailesi İnhibitörleri

Tümör hücrelerinde oldukça aktif olan PI3K/Akt sinyal yolağının aktivitesini engellemek için reseptör tirozin kinazların inhibisyonunu hedefleyen stratejiler geliştirilmiştir. EGFR inhibitörleri iki gruba ayrılır: Monoklonal antikolar reseptörün hücre dışındaki kısmı ile etkileşir. Tirozin kinaz inhibitörü olan ajanlar ise hücre içindeki kinaz bölgesine bağlanırlar (68).

HER2 reseptörünün hücre dışı bölgesine bağlanan trastuzumab bu reseptörün endositozuna neden olarak HER2 aracılığı ile meydana gelen PI3K/Akt ve Ras/MAPK sinyal yollarının aktivasyonunu azaltmaktadır. Pertuzumab HER2 üzerinde etkili bir monoklonal antikor olup bu reseptörün homo- ve heterodimerizasyonunu engellemektedir. Bu antikor, reseptörün hücre dışı bölgesine bağlanarak HER2'nin heregulin ile uyarılmış aktivasyonunu önler ve hücre büyümesini inhibe eder (27, 40).

Tirozin kinaz inhibitörü olan gefitinib EGFR (HER1)'nin katalitik kısmında bulunan ATP bağlanma bölgesi ile etkileşime girerek reseptörün otofosforilasyonunu önler ve sinyal yollarının aktivasyonunu engeller. Böylece EGFR eksprese eden tümör hücrelerinin gelişimini inhibe eder (69,

70). EGFR'yi spesifik olarak hedefleyen inhibitör olan erlotinib reseptörün katalitik kısmındaki ATP bağlanma bölgesi ile etkileşime girer ve inaktif EGFR homodimerlerinin oluşumunu uyarır. EGFR ile uyarılan sinyal yollarının erlotinib tarafından inhibisyonu hücre proliferasyonunu ve tümör anjiyogenezini önleyerek ve apoptozu inhibe ederek anti-tümör atkivitesi gösterir (27, 71, 72).

Meme kanseri gibi solid tümörlerin tedavisinde kullanılan diğer bir tirozin kinaz inhibitörü olan lapanitib hem EGFR'nin hem de HER2'nin katalitik bölgesine bağlanarak bu reseptörlerin otoposforilasyonunu inhibe eder (27, 73, 74).

Bu inhibitörlerin tek başına uygulanması kanser hücrelerinde ilaç dirençliliğinin gelişimine neden olabilmektedir. Bu nedenle bu inhibitörlerin sinyal yollarının bileşenlerini etkileyen diğer inhibitörlerle kombine edilerek kanser hücrelerine uygulanması kanser tedavilerinde avantaj sağlamaktadır (27, 75).

2.4.3 PI3K/Akt İnhibitörleri

PI3K heterodimerinin p110 α katalitik alt ünitesini kodlayan PIK3CA genindeki somatik mutasyonlar başta meme kanseri olmak üzere birçok kanser türünde görülmektedir. Bu mutasyonlar kanser hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonunu ve tümör gelişimini uyarmaktadır. Bu sinyal yolağının inhibisyonu p110 katalitik alt ünitesini hedefleyen inhibitörler ile sağlanmaktadır. Bu inhibitörlerden Wortmannin p110 alt biriminin Lys802 rezidüsü ile kovalent bağlar kurarak geri dönüşümsüz şekilde PI3K'yı inhibe eder. LY294002 inhibitörü p110 katalitik alt ünitesinin ATP bağlanma bölgesi ile etkileşime girerek PI3K'yı inhibe eder. Böylece hücre büyümesini engelleyerek anti-tümör etkinlik gösterir (27, 76, 77).

Çeşitli inhibitörler bu yolağın önemli bir bileşeni olan Akt'yi hedefler. Bu inhibitörler Akt izoformlarının fosforilasyonunu ve aktivasyonunu inhibe ederek etkilerini gösterirler. Bazı Akt inhibitörleri bu serin/treonin kinazın PH

bölgesi ile etkileşerek hücre membranına birikimini önler. Böylece inaktive olan Akt hedef moleküllerini etkileyemez. Bu da apoptozun uyarılamasına yola açar (27, 78).

2.4.4 mTOR İnhibitörleri

Akt'ın önemli substratlarından biri olan mTOR, onkojenik transformasyona yol açan birçok genin translasyonundan sorumludur. Bu nedenle mTOR inhibitörleri kansere karşı çeşitli terapilerde kullanılmaktadır. Meme kanserinin bu inhibitörlere karşı duyarlı olduğu çeşitli pre-klinik çalışmalarda gösterilmiştir (27, 79).

mTOR inhibitörlerinden rapamisin ve analogları mTOR aracılığı ile meydana gelen tümör oluşumunu engelleyen anti-tümöral etkilere sahiptir. Rapamisin sitozolik bir protein olan FKBP12'ye bağlanarak kompleks oluşturur ve bu kompleks mTORC1'e doğrudan bağlanarak mTOR yolağının inhibisyonuna neden olur. Rapamisin dışında CCI-779 (temsirolimus) ve RAD001 (everolimus) inhibitörleri de mTOR kinazın aktivitesini inhibe ederek anti-tümöral etki gösterirler (80-82).

En fazla çalışılan mTOR inhibitörü olan rapamisin, etkisini sadece mTORC1 üzerinden göstermekte olup Akt'ın S473 rezidüsünü fosforilleyen mTORC2'ye etki etmemektedir. Bunun yanı sıra rapamisin tarafından mTOR'un inhibisyonu S6K'nın fosforilasyonunu ve aktivasyonunu önler. Böylece bu proteinin reseptör tirozin kinazlar üzerindeki negatif geri bildirim döngüsü ortadan kalkar ve reseptör tirozin kinazlar tekrar aktive olur. Bu da PI3K sinyalinin ve Akt aktivasyonunun artışına yol açar. Bu nedenle anti-mTOR ajanları meme kanserine karşı klinik etkinliğe sahip olmakla beraber geri bildirim döngüsünün inaktivasyonu nedeniyle etkilerinin azaldığına dikkat çekilmektedir (83-85).

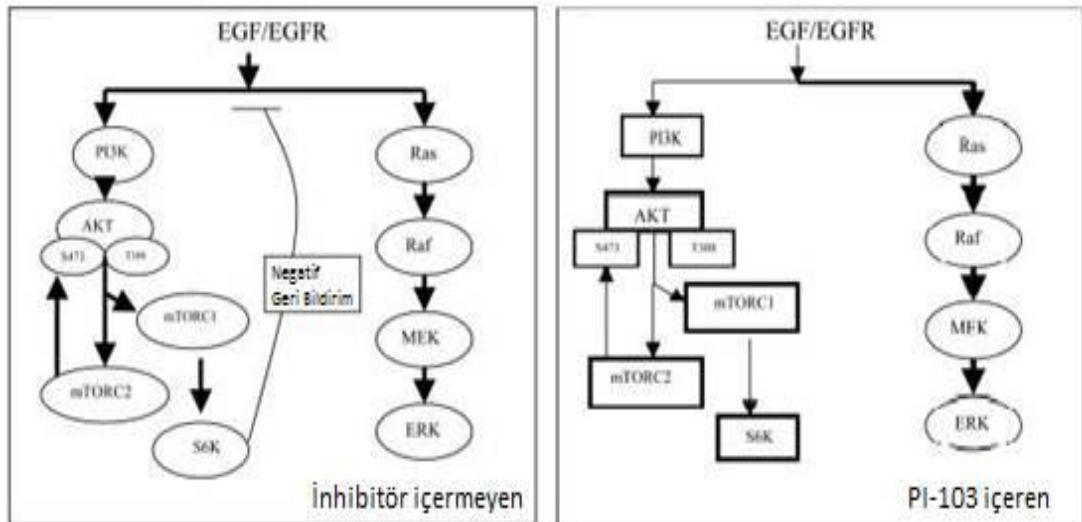
mTOR inhibitörlerinin tek başına uygulanması yerine diğer ajanlarla kombine edilmesi veya dual inhibitörlerin kullanılması kanser tedavilerinde daha etkili olabilmektedir (85).

2.5 PI-103 (Dual PI3K ve mTOR İnhibitörü)

PI-103, piridofuropirimidin yapısına sahip bir molekül olup sınıf 1A PI3K ve mTOR proteinlerinin etkili bir inhibitörüdür. PI3K'in katalitik alt ünitesini oluşturan p110'nun bütün izoformlarını (p110 α , p110 β , p110 γ ve p110 δ) kuvvetli bir şekilde ve kompetitif olarak inhibe eder. PI3K ve mTOR içeren kompleksler dışında yaklaşık 70 protein kinaza karşı etki gösterdiği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (27, 86).

PI-103 çeşitli konsantrasyonlarda, insan glioma hücre dizilerinde PI3K/Akt/mTOR yolacağını baskılayarak anti-proliferatif etki gösterdiği ve toksisite olmaksızın tümör gelişimini inhibe ettiği görülmüştür (10, 86).

Bu inhibitörün hepatoselüler karsinoma hücre dizisinde doza bağımlı şekilde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. PI-103'ün PI3K ve mTORC2'yi inhibe ederek Akt'nin fosforilasyonunu ve mTORC1'i inhibe ederek de S6K aktivasyonunu önlediği bilinmektedir. Bu yol ile PI3K/Akt/mTOR ve Ras/Raf/MAPK yolu üzerindeki negatif geri bildirim döngüsünü ortadan kaldırarak Ras/Raf/MAPK yolacağını aktive ettiği ve bu yolaktaki proteinlerin fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 2.6) (87).



Şekil 2.6 PI-103 inhibitörünün PI3K/Akt/mTOR ve Ras/Raf/MAPK sinyal yolları üzerine etkisi (Gedaly R. ve ark. 2010'dan alınmıştır.)

PI-103'ün, insan lösemik hücre dizilerinde PI3K ve mTOR komplekslerini inhibe ederek siklin D ve SCF^{skp2} (*Skp (S-phase kinase-associated protein), Cullin, F-box containing complex*) ekspresyonlarını azalttığı ve p27^{Kip1} proteininin birikimine yol açtığı belirtilmiştir. Böylece hücre döngüsünü G1 fazında durdurduğu ve proliferasyonu baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca Bcl-XL (*B-cell lymphoma-extra large*) ve Mcl-1 (*Myeloid leukemia cell differentiation protein-1*) anti-apoptotik proteinlerini baskılayarak blast hücrelerinde mitokondriyal apoptozu uyardığı görülmüştür (88).

PI-103'ün hem *in vivo* hem de *in vitro* yapılan çalışmalarda çeşitli kanser hücrelerinde invazyonu engellediği, endotelial hücre fonksiyonu ve vaskülarizasyonu önleyerek angiyojenezi inhibe ettiği vurgulanmaktadır (86).

2.6 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri ve Terapötik Yaklaşımlar

Kanser gelişiminde HER reseptör ailesinin rolü iyi bir şekilde tanımlanmış olup bu ailedeki onkoproteinlerin inaktivasyonunu hedefleyen terapilerin geliştirilmesi her geçen gün daha fazla önem kazanmaktadır. Bu terapilerde çeşitli terapötik ajanların kullanımı, klinik yararlar sağlamasının yanında bu terapilere karşı ilaç dirençliliğinin ortaya çıkmasında da etkili olmuştur (89).

EGFR ve HER2 kanser oluşumunun engellenmesi için terapötik olarak hedeflenen önemli reseptörlerdir. Bu reseptörlerden HER2'nin meme kanserinde aşırı ekspresyonu olması bu reseptöre yönelik terapilerin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu amaçla kullanılan anti-HER2 monoklonal antikoru olan trastuzumab bu terapilerde etkili olmuştur. Ancak bu ajanın tek başına uygulanması beklentinin altında sonuçlar vermektedir. Trastuzumaba karşı verilen yanıtların çoğu geçici olmakta ve direnç mekanizmalarının oluşumuna yol açmaktadır. HER2 pozitif meme kanserlerinde PTEN kaybı ve PIK3CA geninde meydana gelen mutasyonlar trastuzumaba dirençte etkilidir. Bu direnç mekanizmaları meme kanseri hastalarında trastuzumaba yanıtın azalmasına ve tümör gelişiminin hızlanmasına neden olmaktadır (90-92).

Farklı epitopları tanıyan anti-HER2 antikorlarının kombinasyon halinde kullanılması ligand aracılı aktivasyonun inhibe edilmesinde daha iyi sonuçlar vermektedir. Bu nedenle trastuzumab ve pertuzumabın kombine edildiği tedaviler bu ajanların tek başına uygulandıkları tedavilere göre daha etkili olmaktadır (93). ER pozitif tümörlerde trastuzumab anti-endokrin tedavisi ile kombine edildiğinde daha iyi sonuçlar vermektedir. Ayrıca trastuzumabın, anjiyogenezin önlenmesinde etkili bir ajan olan bevacizumab ile kombinasyonu da VEGF aktivitesinin inhibisyonunda önemli rol oynamaktadır. Etkili diğer terapi yöntemlerinden biri olan Hsp90 (*Heat shock protein 90*) inhibitörleri HER2'nin ekspresyonunda azalmaya ve proteozomal degradasyonunda artışa neden olur. Bu inhibitörler prelinik tümör modellerinde anti-tümöral ve anti-anjiyojenik etkilere sahiptir (35, 94).

HER proteinleri tarafından tetiklenen kanserlerdeki ilaç dirençliliği analizleri tedavinin başarısızlığında HER3 proteininin önemli rolü olduğunu göstermiştir. Bu reseptör ailesine yönelik hiçbir terapi HER3 reseptörünü doğrudan etkilemez. Bu nedenle diğer onkojenik HER proteinleri hedefe yönelik terapiler ile inhibe edildiğinde HER3 reseptörünün de fonksiyonunun sona ereceği çeşitli yayınlarda belirtilmiştir. Ancak HER3'ün diğer HER ailesi ile oluşturduğu dimerlerin ilaç tedavileri ile inhibisyonunun kısa süreli olduğu ve HER3'ün, önemli bir aktivatörü olduğu PI3K/Akt sinyal yolağının tekrar aktive ettiği çeşitli çalışmalarda gözlenmiştir. Böylece anti-tümör ajanlarının apoptoz ile sonuçlanan etkisi engellenmiştir (31).

Kinaz fonksiyonu EGFR ve HER2 ile tetiklenen tümör oluşumu için zorunludur ve katalitik kinaz aktivitesinin inhibisyonu anti-tümör ajanları için önemlidir. Tirozin kinaz inhibitörlerine dirençte PI3K/Akt sinyal yolağının aktivitesi önemli rol oynar. Azalan PI3K aktivitesi ve HER3 fosforilasyonu tirozin kinaz inhibitörlerine duyarlılığı artırır. Tirozin kinaz inhibitörleri ile Ras/MAPK sinyal yolağının inhibisyonu çeşitli adaptör proteinlerin (IRS-1 vb.) aktivasyonunda artışa yol açar. Bu artış da PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonunu artırır. EGFR ve HER2 amplifikasyonu içeren tümörlerin tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavisi HER3 ekspresyonunda kompanse artışa neden

olabilmektedir. Tirozin kinaz inhibitörlerinin, HER3 efektörlerinin PI3K inhibitörleri ile kombinasyonu tirozin kinaz inhibitörlerine karşı oluşturulan direncin üstesinden gelebilir (31).

EGFR ve HER2 reseptörlerinin kinaz aktivitesini bloke eden lapatinibin trastuzumab ile kombinasyonu tümör gelişiminde azalmaya yol açmaktadır (90, 95). Ayrıca EGFR'nin inhibisyonunda etkili olan gefitinib ve erlotinib tek başına kullanıldıklarında meme kanserindeki etkileri yeterli olmamaktadır ancak bu tirozin kinaz inhibitörleri diğer sitotoksik ve moleküler hedefli ajanlarla kullanıldıklarında apoptozun artışına neden olmaktadır (35, 96).

HER ailesinin oluşturduğu dimerler ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) proteazların aktivitesinde artışa neden olur. ADAM proteazlar transmembran EGF ligandlarının serbest hale getirilmesinde rol oynayan enzimler olup bu ligandların HER reseptörleri ile etkileşiminde rol oynarlar. Bu şekilde HER dimerlerini aktive eden ADAM proteazlar hücre içi sinyal yollarının uyarılmasını sağlayarak ilaç tedavilerine karşı direnç mekanizması oluştururlar. Bunun yanında HER ailesinin çeşitli anti-tümör ajanları ile tedavisi diğer reseptör tirozin kinazların ekspresyonunda artışa neden olmaktadır, böylece alternatif sinyal yollarının uyarılması hedefe yönelik terapiler için direnç mekanizmaları oluşturabilmektedir (24, 97).

Hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinde HER ailesinin önemi her geçen gün artmaktadır. HER ailesinin rolüne dayanarak bu reseptörler ile ilgili çeşitli yaklaşımların geliştirilmesi etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesine önemli katkılar sağlayacaktır (35, 90).

2.7 AMAÇ

Bu tez çalışmasında HER2 amplifikasyonu olan PTEN (+) SKBR-3 ve EGFR amplifikasyonu olan PTEN (-) MDA-MB-468 insan meme kanseri hücre dizilerinde PI-103 inhibitörünün EGFR, HER2 ve HER3 ekspresyonu üzerinde zamana bağlı etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

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

3.1 Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve tamponlar temin edildiği firmalara göre aşağıda sıralanmıştır.

Her3/ErbB3 Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology-ABD
Her2/ErbB2 XP™ Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology-ABD
EGF Receptor XP™ Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology-ABD
p-Akt (Ser473) XP™ Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology-ABD
p-Akt (Thr308) Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology-ABD
Total-Akt Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology-ABD
p-P70S6K (Thr389) Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology-ABD
β-actin Rabbit Anti-human primer antikor	Cell Signaling Technology-ABD
<i>Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins/HRP</i>	Dako-ABD
<i>Anti-rabbit IgG HRP linked antibody</i>	Cell Signaling Technology-ABD
<i>PI-103 (pidofuoprimidin)</i>	Cayman Chemical - ABD
Akrilamid (1.29 akrilamid-bisakrilamid)	Applichem-Almanya
Tris	Applichem-Almanya

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

Bütil alkol (Bütanol)	Sigma Aldrich-Almanya
Glisin	Sigma-ABD
Sodyum Florür	Merck-Almanya
Proteaz İnhibitör Kokteyli (PIC)	Roche Diagnostic-Almanya
Yağsız Süt Tozu	Pınar-Türkiye
Dimetil sülfoksit (DMSO)	WAK-Chemie Medical-Almanya
Tripan mavisi	Sigma-ABD
<i>Quick Start Bradford Dye Reagent</i> 1X Protein Kantitasyon Kiti	Biorad-ABD
<i>Coomassie Plus Protein Assay</i> <i>Reagent Kiti</i>	Thermo Scientific-ABD
Bovine Serum Albumin Standart Seti	Biorad-ABD
Bovine Serum Albumin Standart Seti	Thermo Scientific-ABD
Metanol	Merck-Almanya
<i>PVDF-Plus Transfer Membran</i> <i>0.45 micron</i>	Thermo Scientific-ABD
<i>Extra Thick Western Blotting Paper</i>	Thermo Scientific-ABD
<i>Full Range Rainbow</i> <i>Molecular Weight Marker</i>	GE Healthcare-ABD
Sodyum pirofosfat	Sigma-ABD
<i>Calyculin</i>	Cell Signaling Technology-ABD
Tripsin %0.05 (1X)	Thermo Scientific-ABD
Etilen glikol tetra asetik asit (EGTA)	Ambresco-ABD
İzopropanol	Sigma-ABD

3.2 Aletler ve Cihazlar

Kodak Gel Logic 1500 Görüntüleme Sistemi	Carestream Healty Inc.-ABD
Inverted Mikroskop	Olympus-İngiltere
Etüv	Heraeus-Almanya
Otomatik Çalkalayıcı	Heidolph-Almanya
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Eppendorf-Almanya
Pierce Semi-dry Western Blot Cihazı	Thermo Scientific-ABD
Spektrofotometre	Spectramax-ABD
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo Electron-ABD
Santrifüj	Heraeus-Almanya
Buz makinası	Scotsman AF200-İngiltere
Elektroforez Güç Kaynağı	Elite 300 Plus Wealtec-ABD
Hassas Terazi	Denver Instrument-ABD
Vorteks	Clofton Cycline-İngiltere
Jel Yürütme Tankı	Biorad-ABD
Distile Su Cihazı	GFL-Almanya
Çalkalayıcı	GFL-Almanya

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

3.3 Hücre Kültürü

İnsan meme kanseri hücre dizilerinden MDA-MB-468, Dr Işık Yuluğ, Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara, Türkiye'den, SKBR-3 hücre dizisi ise ATCC'den (*American Type Culture Collection*) sağlandı. İki hücre dizisi de 25 cm² flask içinde, %10 FBS, 2 mmol/L L-glutamin, 100 IU penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) tam besiyeri ortamında 37°C'de % 5 CO₂ içeren etüvde çoğaltıldı. Bu hücrelere serumsuz besiyeri ortamında, çeşitli zaman aralıklarında ilaç ile inkübasyon işlemi uygulandı. Hücreler ATCC talimatlarına uygun olarak çoğaltıldı ve 3. ile 11. pasajlar arasındaki hücreler kullanılarak deneyler yürütüldü. Hücreler tripan mavisini ile boyandıktan sonra Thoma lamı kullanılarak sayıldı ve ilaç ile inkübasyon öncesinde % 90'ın üzerinde canlılık olmasına dikkat edildi. İlaç ile inkübasyon deneyleri için, proliferatif fazda olan hücreler 2 x 10⁶ hücre/kuyu olacak

şekilde 6 kuyulu plaklara ekildi ve ‰ 1 DMSO veya 1 µM PI-103 ile belirli periyotlarda inkübe edildi. Her deney koşulu için birbirinden bağımsız üç tekrar yapılarak sonuçların aritmetik ortalamaları alındı (Şekil 3.1).

3.4 Tripsinizasyon

Tripsinizasyon yöntemi ile aderan meme kanseri hücre dizilerinin flasktan ayrılması sağlandı. Bu işlem için T-25 cm² flask içindeki besiyeri steril bir kaba boşaltıldı, flask 5 ml PBS (*phosphate buffered saline*) ile yıkandı ve daha sonra PBS uzaklaştırıldı. Böylece hücreler yıkanarak besiyeri artıkları ve FBS (*fetal bovine serum*) ortamdan uzaklaştırıldı. Flask içine 500 µl tripsin/EDTA koyuldu. Trpsin/EDTA bileşiğinin hücreler üzerinde homojen olarak yayılması sağlandı ve 37 °C'de % 5 CO₂ içeren etüvde birkaç dakika inkübe edildi. Flaskın tabanından ayrılan hücreler *inverted* mikroskopta kontrol edildikten sonra flaskın içine 5 ml tam besiyeri eklenerek tripsin/EDTA'nın aktivitesi sonlandırıldı. Flask içinde süspansiyon halinde bulunan hücreler 50 ml'lik falkon tüp içine alınıp üzerine 5ml daha tam besiyeri eklenerek +4°C'de 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 10 ml tam besiyeri eklendi. Pipetaj işlemi yapılarak hücreler süspansiyon haline getirildi. Süspansiyondan 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisini ile karıştırıldı. Bu karışımı Thoma lamı üzerine yaymak suretiyle hücre sayımı yapıldı. Her sayım için Thoma lamı üzerinden 5 alan seçildi ve bu alanlarda sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması alındı. Kullanılan Thoma lamının ölçüleri 0.1 mm x 0.1 mm olup lam ile lamel arasındaki uzaklık 0.1 mm'dir. Bu nedenle hücrelerin sayıldığı her alan 0.001mm³'e (0.0001 ml'ye) karşılık geldiğinden sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması 10.000 ile çarpıldı. Elde edilen değer, hücre süspansiyonu tripan mavisini ile boyandığında 1:1 oranında seyreltiğinden, 2 ile çarpılarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı. Bu sayıya göre, ilaç inkübasyonları için 6 kuyulu plaklara, kuyu başına 2 x 10⁶ hücre ve 2 ml tam besiyeri gelecek şekilde ekim yapıldı.

3.5 İlaç Uygulamaları

Tripsinizasyon işleminden sonra 6 kuyulu plaklara ekilen hücreler 37°C'de % 5 CO₂ içeren etüvde 1 gece inkübe edilerek aderan meme kanseri hücrelerinin plağın zeminine yapışması sağlandı. Ertesi gün tam besiyeri uzaklaştırılarak yerine 2 ml serumsuz besiyeri (DMEM) eklendi ve 24 saat inkübe edildi. Bu işlem ile hücrelerin aynı proliferasyon fazında yakalanması ve tam besiyerinde bulunan serumun, kullandığımız ajanla olası etkileşiminin ortadan kaldırılması amaçlandı. Hücrelere, %1 DMSO ve 1 µM PI-103 belirlenen sürelerde muamele edildi.

3.5.1 PI-103 Stok Çözelti Hazırlanışı

PI-103, dikey havalandırılmalı kabin içerisinde steril koşullar altında hazırlandı. Kristalize kuru toz halinde bulunan 25 mg PI-103, dimetilsüfoksit içerisinde vortekslenerek final konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde çözüldü. İlaç stoğu 500 µl hacimlerde alikotlara bölünerek -20°C'de muhafaza edildi.

3.5.2 PI-103'ün Hücre Dizilerine Uygulanması

6 kuyulu plaklarda 24 saatlik serum starvasyonundan sonra kuyulardan serumsuz besiyeri uzaklaştırıldı. Her kuyuya 2 µM PI-103 içeren tam besiyerinden 1 ml koyuldu ve üzerine 1 ml tam besiyeri eklenerek kuyu başına final konsantrasyonunun 1 µM olması sağlandı. MDA-MB-468 ve SKBR-3 hücre dizileri PI-103 ile 1,3,6,12 ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyulardan besiyeri uzaklaştırıldı ve lizat hazırlama aşamasına geçildi.



Şekil 3.1 Hücre Kültürü Uygulamaları

3.6 Lizat Hazırlama

Western blot deneyleri için lizis tamponu hazırlandı. Bu tampon çözelti, içeriği % 0.5 NP-40, 120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH: 7.4), 1 mM Sodyum pirofosfat, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA olacak şekilde distile su içerisinde çözüldü ve 0.20 nm'lik filtreden geçirilerek +4°C'de muhafaza edildi. Lizat hazırlama aşamasından hemen önce tampon çözeltiye proteaz inhibitör kokteyli (PIC), 50 nM *Calyculin* ve 20 mM Sodyum florür eklendi. Tablet halindeki PIC, 1 ml distile su içerisinde çözüldü ve aktivite kaybını önlemek amacıyla -20°C muhafaza edildi. Lizat hazırlama aşamasından önce her 1 ml lizis tampon çözeltisi 100 µl PIC solusyonu içerecek şekilde hazırlandı.

Lizat hazırlama işleminin tüm aşamaları buz üzerinde ve +4°C'de gerçekleştirildi. Tüm ilaç uygulama deneylerinin sonlandırma aşamasında 6 kuyulu plaklar +4°C 5 dakika bekletildi ve besiyerleri uzaklaştırılıp üç kez PBS ile yıkandı. Kuyu başına 400 µl lizis tampon çözeltisi eklendi ve plaklar çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde 5 dakika inkübe edildi. Aderan hücreler, scraper ile 1 dakika süreyle kazınarak plak zemininden kaldırıldı. Kazıma işleminden sonra plaklar çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyulara scraper ile kazıma işlemi yapıldı ve plaklar tekrar çalkalayıcı üzerinde 100 rpm devirde 5 dk inkübe edildi. Bu inkübasyondan sonra kuyular son kez 5'er saniye daha scraper ile kazındı ve kuyulardaki örnekler daha önce -20°C'de soğutulan eppendorf tüplerine aktarıldı. Örnekleri içeren eppendorf tüpleri +4°C'ye soğutulan santrifüjde 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücre ve çözelti atıklarının dibine çökmesi sağlandı. Bu süre sonunda proteinlerimizi içeren supernatant +4°C daha önce -20°C'de soğutulan eppendorf tüplerine alınarak -80°C'de muhafaza edildi (Şekil 3.2).

3.7 Protein Kantitasyonu

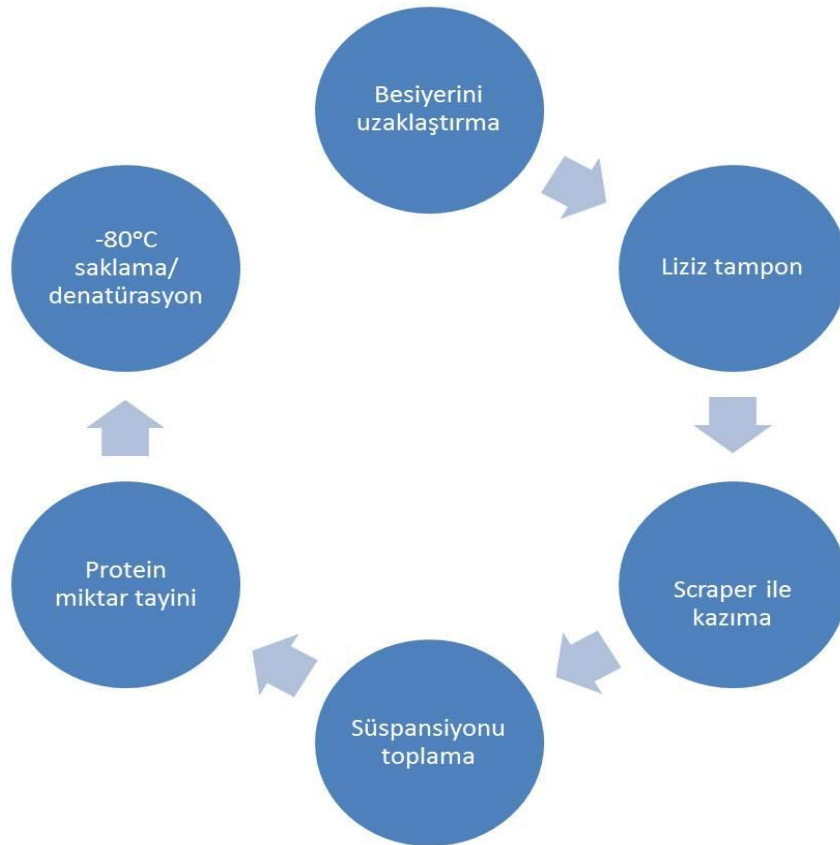
Western blot deneyleri için gerekli protein miktarını belirlemek amacıyla elde edilen lizatlardaki protein konsantrasyonları Bradford yöntemiyle hesaplandı. MDA-MB-468 meme kanseri hücre dizilerinden elde edilen lizatların protein kantitasyonu *Quick Start 1X Dye Bradford Reagent* Kiti ile yapıldı. Düz tabanlı 96 kuyulu plaklardaki her kuyuya 190 µl *Dye Reagent* solüsyonu konuldu. Standartlar için 7 kuyu, her lizat için bir kuyu ve kontrol için de bir kuyu kullanıldı. *Bovine Serum Albumin* standart örneklerinden 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarındaki tüpler ayrı ayrı vorteksenerek 190 µl *Dye Reagent* solüsyonu koyulan kuyuların üzerine 10 µl ilave edildi. Daha önce hazırlanan protein lizatları ayrı ayrı vorteksenerek Western blot yapacağımız örnek sayısı kadar *Dye Reagent* solüsyonu içeren kuyuların üzerine 10 µl ilave edildi. Kontrol amaçlı olarak bir kuyuya 190 µl *Dye*

Reagent solüsyonu üzerine 10 µl lizis tampon çözeltisi ilave edildi. SKBR-3 meme kanseri hücre dizilerinden elde edilen lizatların protein kantitasyonu *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* Kiti ile yapıldı. Düz tabanlı 96 kuyulu plaklarda standartlar için 7 kuyu, her lizat için bir kuyu ve kontrol için de bir kuyu kullanıldı. *Bovine Serum Albumin* standart örneklerinden 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml ve 0,125 mg/ml konsantrasyonlarındaki tüpler ayrı ayrı vortekslenerek kuyulara 10 µl koyuldu. Daha önce hazırlanan protein lizatları ayrı ayrı vortekslenerek Western blot yapacağımız örnek sayısı kadar kuyuya 10 µl koyuldu. Kontrol amaçlı olarak bir kuyuya 10 µl lizis tampon çözeltisi koyuldu ve kullanılan bütün kuyulara 300 µl *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* solüsyonu eklendi. Örneklerin homojen olarak karışabilmesi için kuyulara hafifçe pipetleme işlemi uygulandı. Spektrofotometrik olarak hatalı ölçüme neden olacağından kuyucuklarda baloncuk oluşmamasına özen gösterildi, oluşan baloncuklar iğne yardımıyla ortadan kaldırıldı. Düz tabanlı 96 kuyulu plaklar çalkalayıcıda 30 saniye karıştırıldı ve karanlıkta 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plakların 595 nm'de spektrofotometrik ölçümleri yapıldı. Protein lizatlarının konsantrasyonları, standartların OD (optik dansite) değerlerine göre çıkartılan standart grafikleri kullanılarak hesaplandı.

Western blot deneylerimiz, tam protein ekstraksiyonu yapılarak aşağıdaki hesaplamaya göre 50 µg protein lizat yüklenerek gerçekleştirildi.

- Bradford analizinden elde edilen sonuç, örnekler *Quick Start 1X Dye Reagent* solüsyonu ile 1:20 oranında seyreltildiğinden 20 ile, *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* solüsyonu ile 1:30 oranında seyreltildiğinden 30 ile çarpıldı.
- Bu işlemde elde edilen sonuç Bradford analizinde kullanılan standartlar mg/ml cinsinden olduğu için 1ml lizat içerisinde bulunan protein miktarının mg olarak karşılığıdır. Bu da bize 1 µl lizat içerisinde bulunan protein miktarının µg cinsinden karşılığını verir.

- $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cinsinden hesaplanan protein miktarından, doğru orantı kullanılarak kuyu başına 50 μg protein yükleyebilmek için gereken lizat miktarı hesaplandı. Örnekler Western blot için yüklenmeden önce SDS-jel yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırılacağından kullanılacak miktar iki ile çarpıldı.



Şekil 3.2 Lizat Hazırlama İşlemi

3.8 Western Blot

Western blot için yüklenecek miktarların hesaplanmasının ardından örneklerin SDS-jel yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırılması işlemi, SDS-jel yükleme tamponunun içeriğinde bulunan β -merkaptetanolden

dolayı çeker ocak içerisinde yapıldı. Daha sonra örnekler ısı bloğu içerisinde 95°C'de 5 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Bu işlemden sonra örnekler buzda 1 dakika bekletildi ve %10'luk poliakrilamid jele yüklenerek (90 volt) 1 saat 30 dakika yürütüldü.

3.8.1 Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Western blot için %10'luk poliakrilamid jel hazırlandı. Bu jelin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler ve miktarları aşağıda belirtilmiştir.

Yürütme Jeli	1 jel için	2 jel için	3 jel için	4 jel için
dH ₂ O	4 ml	5,9 ml	8 ml	11,8 ml
Akrilamid/Bis (1:29)	3 ml	5 ml	6 ml	10 ml
Tris 1,5M (pH: 8.8)	2,5 ml	3,8 ml	5 ml	7,6 ml
SDS (%10)	0,1 ml	0,15 ml	0,2 ml	0,3 ml
APS (%10)	0,1 ml	0,15 ml	0,2 ml	0,3 ml
TEMED	0,004 ml	0,006 ml	0,008 ml	0,012 ml

Yükleme Jeli	1 jel için	2 jel için	3 jel için	4 jel için
dH ₂ O	2,1 ml	4,2 ml	5,4 ml	10,8 ml
Akrilamid/Bis (1:29)	0,5 ml	1 ml	1,34 ml	1,68 ml
Tris 0,5M (pH: 6.8)	0,38 ml	0,76 ml	1 ml	2 ml
SDS (%10)	0,03 ml	0,06 ml	0,08 ml	0,16 ml
APS (%10)	0,03 ml	0,06 ml	0,08 ml	0,16 ml
TEMED	0,003 ml	0,006 ml	0,008 ml	0,016 ml

Amonyum persülfat (APS) akrilamidin polimerizasyonunu başlatırken *tetrametiletildiamine* (TEMED) polimerizasyonu hızlandırır. Bu nedenle APS ve TEMED jel dökülmeden önce karışıma eklendi. *Biorad Western* tankına ilk önce yürütme jeli yüklendi. Havayla temas, akrilamidin polimerizasyonunu engellediği için bu jelin üzerine yaklaşık 100 µl bütanol (veya izopropanol) eklenerek jelin hava ile teması kesildi. Bu işlem ile aynı zamanda jele düzgün bir yüzey alanı sağlandı. Yürütme jeli tamamen polimerize olduktan sonra jel üzerindeki bütanol (veya izopropanol) dH₂O ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Yürütme jeli üzerine yükleme jeli döküldü ve taraklar yerleştirildi.

Yükleme jelinin polimerizasyonunun ardından örnekler ve marker kuyucuklara yüklenerek jel 90 voltta 1 saat 30 dakika elektroforez tankında yürütüldü. Bu süre sonunda jel elektroforez tankından çıkarıldı ve iki cam arasından alındı. Bu işlem, jel kurumadan yapılması gerektiğinden dH₂O içerisinde, ıslatılmış bir spatül yardımıyla gerçekleştirildi. Örnek içermeyen

kısımlar spatül ile kesilerek uzaklaştırıldı ve jel dH₂O içerisine alındı. Çalkalayıcıda 100 rpm devirde 10 dakika boyunca dengelendi.

3.8.2 Semi-dry Transfer ve Blotlama

Elektroforez işleminden sonra örnekler Pierce Semi-dry Western Blot cihazı kullanılarak *polivinildiflorid* (PVDF) membran üzerine transfer edildi. Bu işlem için PVDF membran ve filtre kağıtları belirli ölçülerde kesildi. PVDF membran % 100 metanol içerisinde birkaç saniye bekletildi. Böylece membranın polarize olması sağlandı. PVDF membran ve filtre kağıtları 1X transfer tamponu içerisine alınarak çalkalayıcıda 100 rpm devirde 15 dakika dengelendi. Transfer tamponu, 125 mM Tris, 50 mM Glisin içerecek şekilde (5X) stok halinde hazırlandı ve +4°C muhafaza edildi. Transfer tamponunun 1X konsantrasyona seyreltilmesi için 1:1:3 oranında sırasıyla 5X tampon çözelti, % 100 metanol ve dH₂O karıştırıldı. Her membran için 100 ml 1X transfer tamponu kullanıldı. Suda dengelenen jel 1X transfer tamponuna alınarak burada 15 dakika dengelenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra *Pierce Semi-dry Western Blot* cihazı ile transfer işlemi gerçekleştirildi.

Semi-dry Western Blot cihazının zemini anot, tavanı ise katot olacak şekilde güç kaynağına bağlandı. Zemine bir kat filtre kağıdı, üzerine PVDF membran, membranın üzerine jel ve en üste de bir kat daha filtre kağıdı uygun biçimde yerleştirildi. Hava kabarcığı kalmayacak şekilde cihaz sıkıştırıldıktan sonra 25 voltta 30 dakika transfer yapıldı. Transfer işleminden sonra PVDF membran, PBS-T (% 0,1 PBS-Tween 20) içinde çözülerek hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu içerisine alındı ve çalkalayıcıda, 100 rpm devirde, 1 saat blokasyon işlemine tabi tutuldu. Blokasyon işleminden sonra süt tozu solüsyonu döküldü ve membran birkaç kere dH₂O ile yıkanarak üzerindeki süttozu kalıntıları uzaklaştırıldı. Daha sonra yapılacak deneye bağlı olarak primer antikor ile inkübasyon işlemine geçildi.

HER3/ErbB3 proteini için, HER3/ErbB3 rabbit anti-human monoklonal antikor (1:1000 ; *Cell Signaling*, ABD), HER2/ErbB2 proteini için, HER2/ErbB2 XP™ rabbit anti-human monoklonal antikor (1:1000 ; *Cell Signaling*, ABD), EGFR/HER1/ErbB1 proteini için, EGRF Receptor XP™ rabbit anti-human monoklonal antikor (1: 1000 ; *Cell Signaling*, ABD), p-Akt proteini için, p-Akt (Ser473) XP™ ve (Thr308) rabbit anti-human monoklonal antikorları (1:1000 ; *Cell Signaling*, ABD), p-P70S6K proteini için, p-P70S6K (Thr389) rabbit anti-human monoklonal antikor kullanıldı. Primer antikor eklendikten sonra membran +4°C soğuk odada çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde, bir gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra membrandan primer antikor uzaklaştırıldı ve membran PBS-T ile oda sıcaklığında, üç kez 10 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kullanılan primer antikorun üretildiği kaynağa göre membran sekonder antikorla oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde, 1 saat boyunca inkübe edildi. Sekonder antikorlar olarak kaynağı rabbit olan primer antikorlar için *Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins/HRP* (1:2500 ; *Dako*, ABD) veya *Anti-rabbit IgG HRP linked antibody* (1:2500 ; *Cell Signaling*, ABD) kullanıldı. Sekonder antikor ile inkübasyondan sonra, membran PBS-T ile oda sıcaklığında, üç kez 10 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde yıkandı ve kemolüminesans görüntüleme için hazır hale getirildi.

Her PVDF membran için yükleme miktarlarını normalize etmek amacıyla membranlara β -aktin ile reblot yapıldı. Reblot yapılmadan önce membran PBS-T ile oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde, 15 dakika yıkandı. Bu işlemde sonra membran PBS-T içinde çözülerek hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu içerisine alındı ve çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde, 1 saat bloklandı. Blokasyon işleminden sonra süt tozu solüsyonu döküldü ve membran birkaç defa dH₂O ile yıkanarak üzerindeki süt tozu kalıntıları uzaklaştırıldı. β -aktin için, β -aktin rabbit anti-human monoklonal antikor (1: 2500 ; *Cell Signaling*, ABD) kullanıldı. Membran, oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde, 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sonunda membran, PBS-T ile oda sıcaklığında, üç kez 10

dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde yıkandı. Yıkama işleminden sonra, membran *Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins/HRP* (1:2500 ; *Dako*, ABD) veya *Anti-rabbit IgG HRP linked antibody* (1:2500 ; *Cell Signaling*, ABD) ile oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde, 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikorla inkübasyondan sonra, membran PBS-T ile oda sıcaklığında, üç kez 10 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde, 100 rpm devirde yıkandı ve kemolüminesans görüntüleme için hazır hale getirildi.

3.9 Kemolüminesans Görüntüleme

Yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra membran kurumadan *Super Signal West-femto Maximum Sensitivity Substrate* (*Thermo Scientific*, ABD) Kiti kullanılarak boyama işlemi gerçekleştirildi. *West-femto* kullanım protokolüne uygun olarak hazırlanan substrat solüsyonu membranın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde eklenerek, 5 dakika süre ile karanlıkta inkübe edildi. *Kodak Gel Logic 1500* (*Carestream Healty Inc.* , ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak protein bantları görüntülendi.

3.10 Dansitometrik Analiz

Kodak Gel Logic 1500 görüntüleme sisteminde bulunan moleküler görüntüleme analiz yazılımı kullanılarak dansitometrik analizler gerçekleştirildi. Her bağımsız deneyde, protein bantları ve β -aktin yükleme kontrolleri için dansitometrik analizler yapıldı ve protein bant yoğunluklarının β -aktin bant yoğunluklarına olan oranları ayrı ayrı hesaplanarak elde edilen verilerin ortalaması alındı.

3.11 İstatistiksel Analiz

MDA-MB-468 ve SKBR-3 hücre dizilerinde protein ekspresyonu değişiklikleri *Student's t* testi ile analiz edildi, İstatistiksel analiz için *Microsoft Excel 2010* yazılımı kullanıldı ve testin sonucunda $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

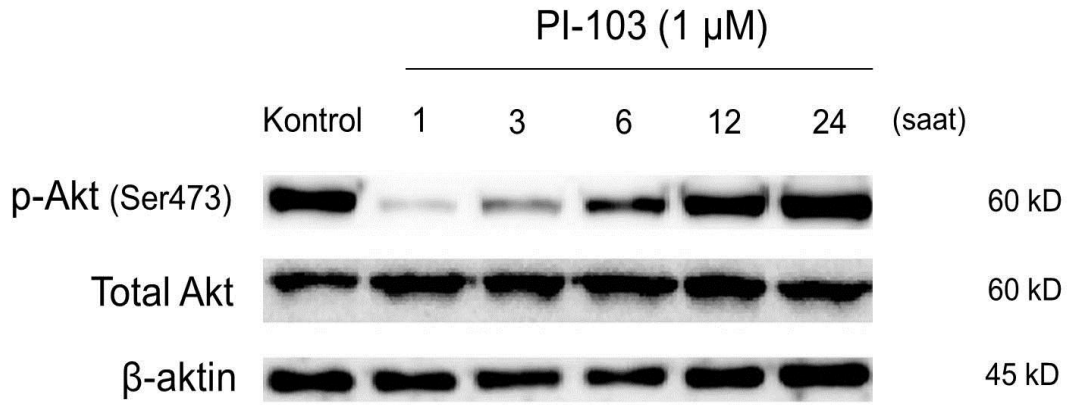
4. BULGULAR

4.1 MDA-MB-468 Hücre Dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu

MDA-MB-468 hücreleri 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle 1 μ M PI-103 ile inkübe edilerek bu inhibitörün PI3K/Akt sinyal yolağı üzerindeki etkisi incelendi. p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308) ve p-p70S6K ekspresyon düzeyleri Western blot yöntemi ile değerlendirildi. PI-103 uygulanmayan hücreler sinyal yolağının bazal aktivitesini gözlemlemek için kontrol olarak kullanıldı.

4.1.1 PI-103'ün MDA-MB-468 Hücre Dizisinde p-Akt (Ser473) Ekspresyon Düzeyine Etkisi

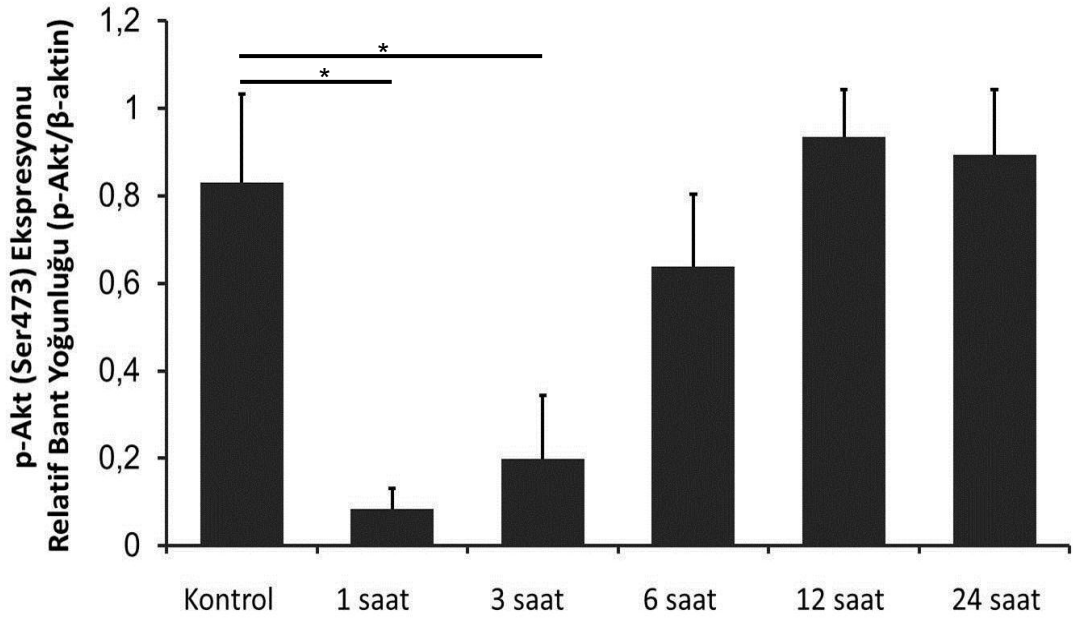
MDA-MB-468 hücrelerinde, PI-103'ün p-Akt (Ser473) ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.1, Tablo 4.1). p-Akt (Ser473) ekspresyonunda, bir saatlik inkübasyonun sonunda % 90 oranında , üçüncü saatin sonunda ise % 77 oranında azalma olduğu saptandı. Bu inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). 6. saatin sonunda ise PI-103'e bağlı inhibisyonun kısmen ortadan kalktığı ve p-Akt düzeyindeki azalmanın (%28) anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$). 12. saatten itibaren p-Akt (Ser473) ekspresyonunun tekrar kontrol hücrelerindeki ekspresyon düzeyine ulaştığı ve 24. saatin sonunda da anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi ($p>0,05$). (Şekil 4.2-4.3). Tüm koşullarda total Akt düzeyinin ise değişmediği gözlemlendi.



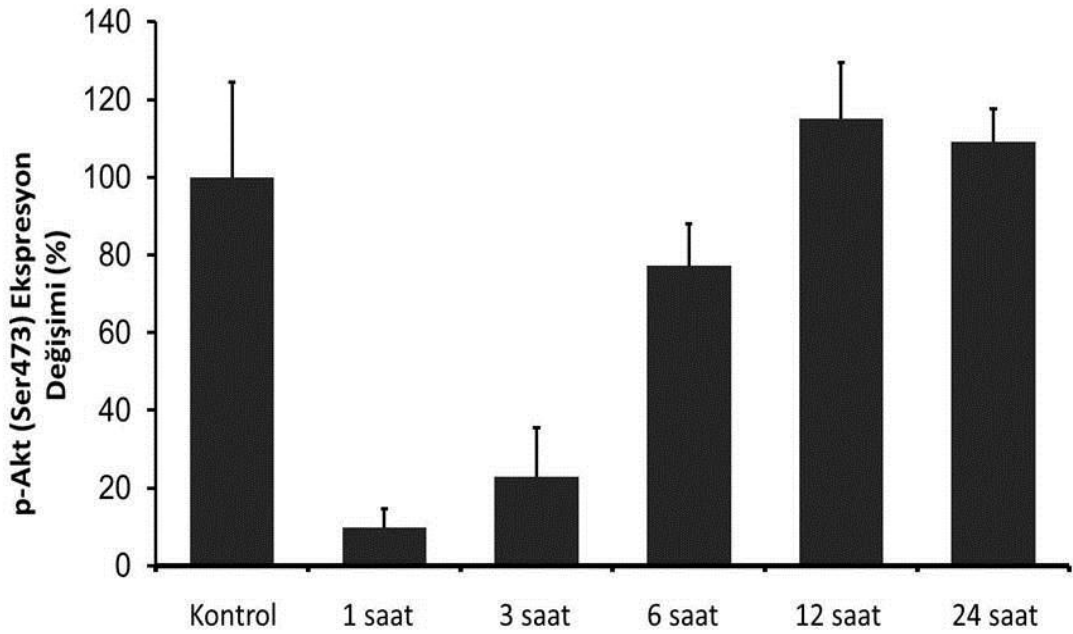
Şekil 4.1 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.1 MDA-MB-468 hücre dizisinde p-Akt (Ser473) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (p-Akt (Ser473) / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	0,83 \pm 0,203
PI-103 (1 saat)	0,08 \pm 0,048
PI-103 (3 saat)	0,19 \pm 0,145
PI-103 (6 saat)	0,63 \pm 0,165
PI-103 (12 saat)	0,93 \pm 0,107
PI-103 (24 saat)	0,89 \pm 0,149



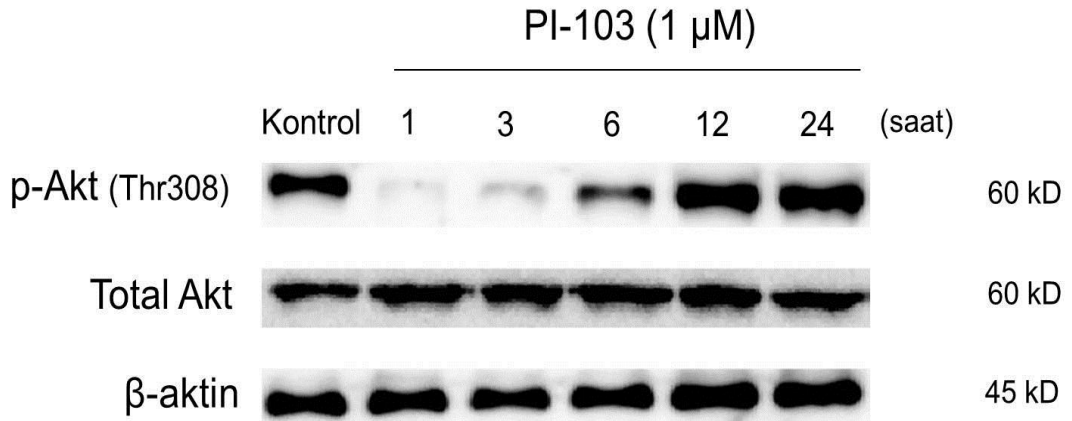
Şekil 4.2 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik Analiz, * $p < 0,05$, $n = 3$)



Şekil 4.3 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)

4.1.2 PI-103'ün MDA-MB-468 Hücre Dizisinde p-Akt (Thr308) Ekspresyon Düzeyine Etkisi

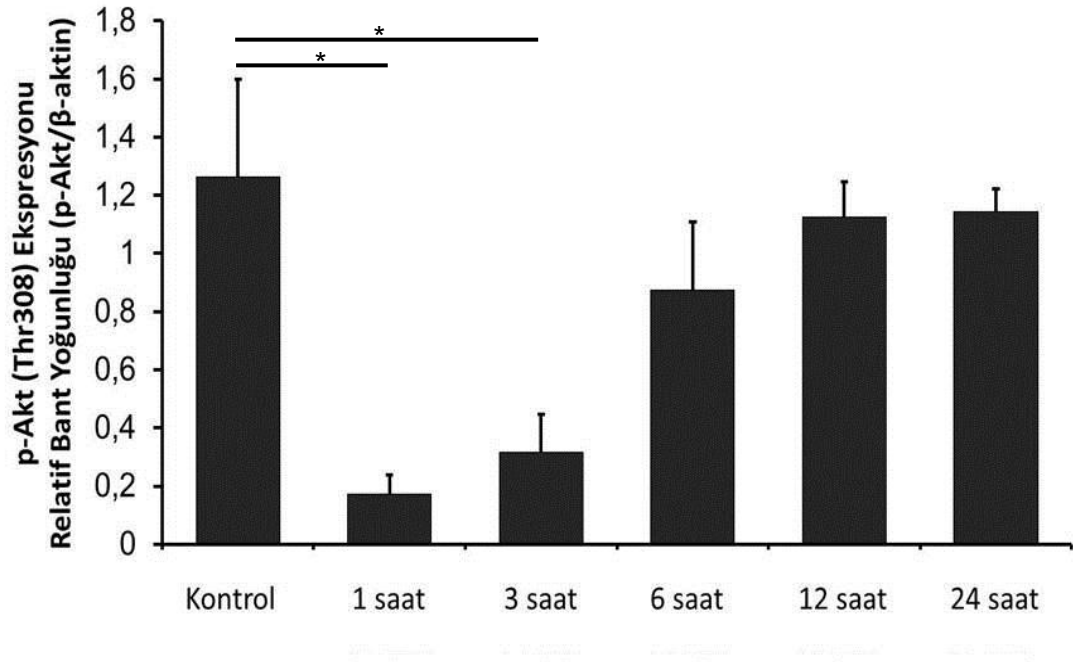
MDA-MB-468 hücrelerinde, PI-103'ün p-Akt (Thr308) ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.4, Tablo 4.2). p-Akt (Thr308) ekspresyonunda bir saatlik inkübasyonun sonunda % 87 oranında, üç saatin sonunda ise % 75 oranında azalma olduğu tespit edildi. Bu inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). 6 saatlik inkübasyon sonrasında ise inhibisyonun azaldığı (% 31) gözlemlendi ve bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0,05$). 12 ve 24 saatlik inkübasyondan sonra ise, p-Akt (Thr308) ekspresyonunda kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı bir değişim saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 4.5-4.6). Tüm koşullarda total Akt düzeyinin ise değişmediği gözlemlendi.



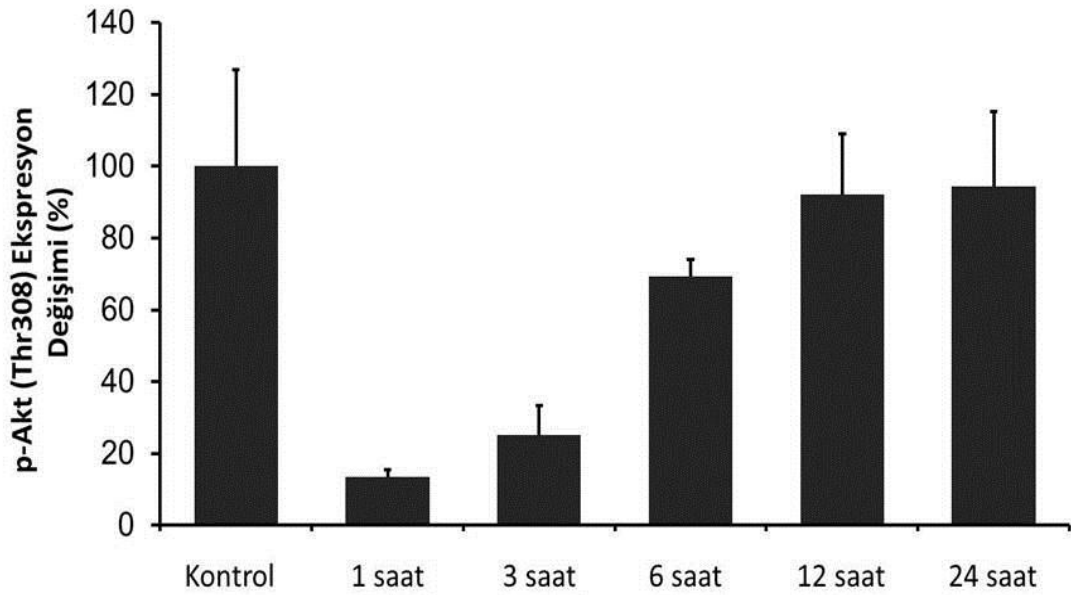
Şekil 4.4 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.2 MDA-MB-468 hücre dizisinde p-Akt (Thr308) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (p-Akt (Thr308) / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	1,26 \pm 0,337
PI-103 (1 saat)	0,17 \pm 0,065
PI-103 (3 saat)	0,31 \pm 0,131
PI-103 (6 saat)	0,87 \pm 0,235
PI-103 (12 saat)	1,12 \pm 0,120
PI-103 (24 saat)	1,14 \pm 0,080



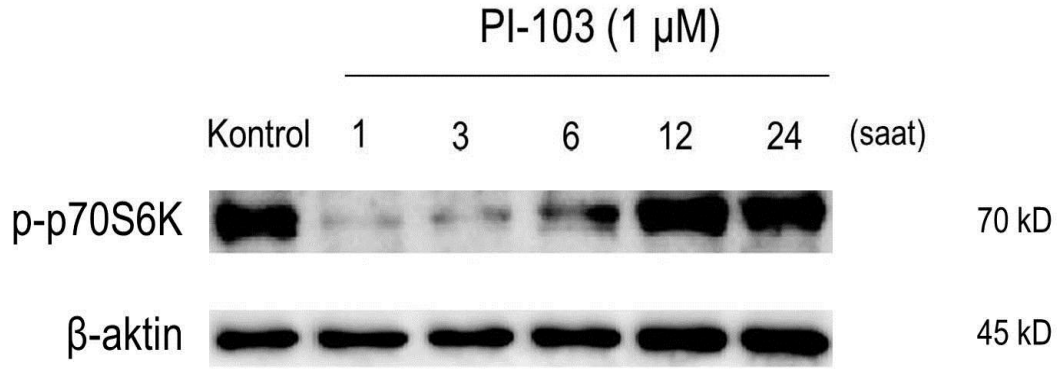
Şekil 4.5 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik Analiz, *p<0,05 , n=3)



Şekil 4.6 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)

4.1.3 PI-103'ün MDA-MB-468 Hücre Dizisinde p-p70S6K Ekspresyon Düzeyine Etkisi

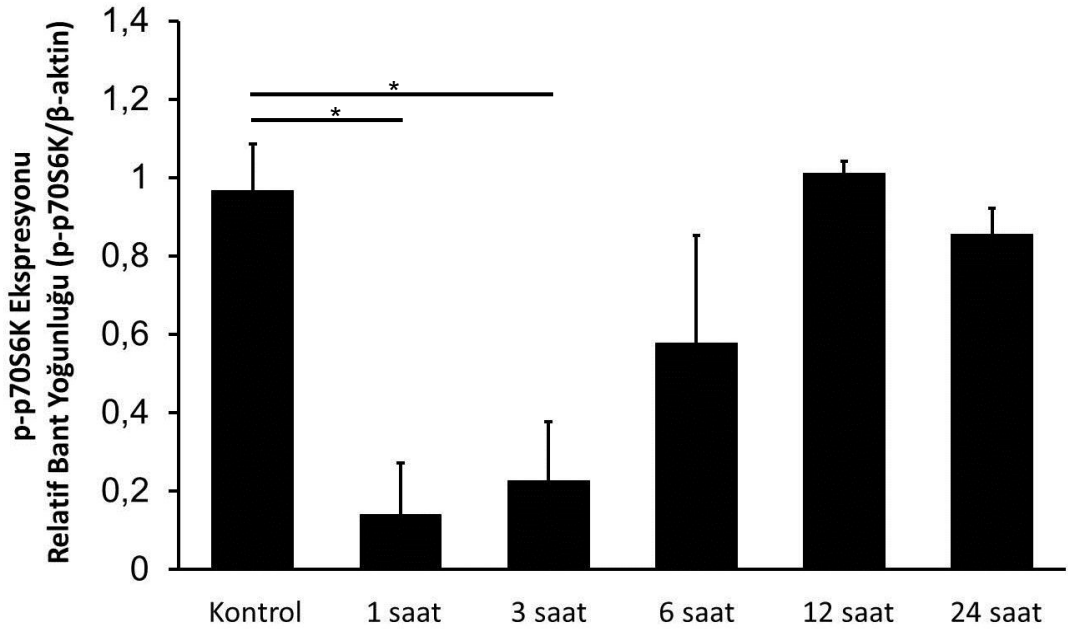
MDA-MB-468 hücrelerinde, PI-103'ün p-p70S6K ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.7, Tablo 4.3). p-p70S6K ekspresyonunda, bir saatlik inkübasyonun sonunda % 85 oranında, üç saatin sonunda ise % 75 oranında azalma olduğu saptandı. Bu inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,01$). 6. saatin sonunda ise PI-103'e bağlı inhibisyonun kısmen ortadan kalktığı ve p-p70S6K düzeyindeki azalmanın (%38) anlamlı olmadığı saptandı ($p > 0,05$). 12 ve 24 saatlik inkübasyondan sonra ise, p-p70S6K ekspresyonunda kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı bir değişim saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 4.8-4.9).



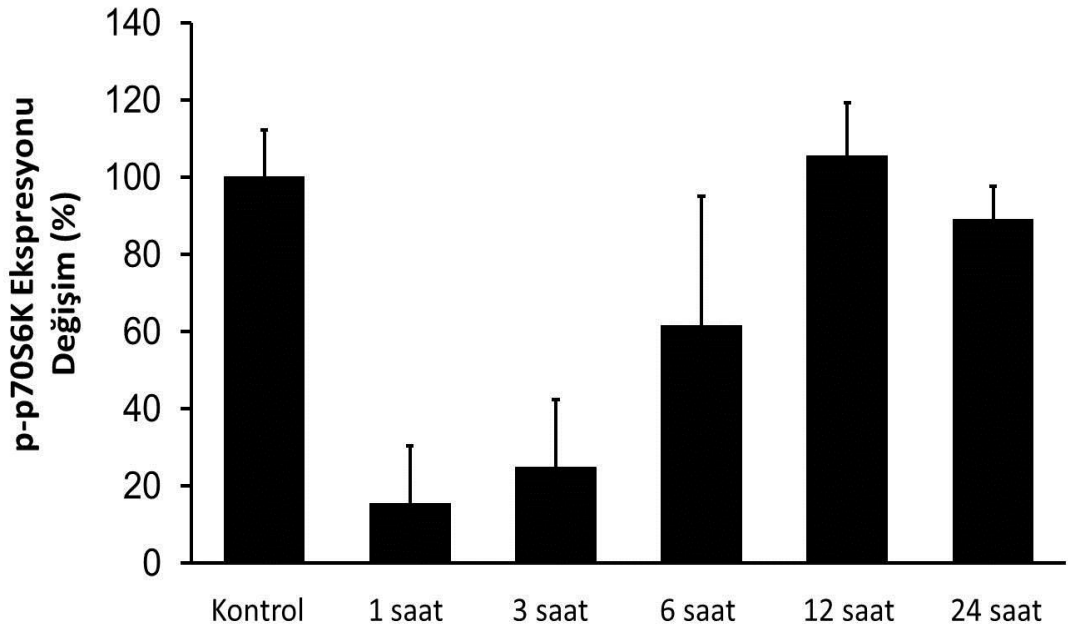
Şekil 4.7 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.3 MDA-MB-468 hücre dizisinde p-p70S6K ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (p-p70S6K / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	0,96 \pm 0,118
PI-103 (1 saat)	0,14 \pm 0,132
PI-103 (3 saat)	0,23 \pm 0,151
PI-103 (6 saat)	0,58 \pm 0,274
PI-103 (12 saat)	1,01 \pm 0,030
PI-103 (24 saat)	0,86 \pm 0,065



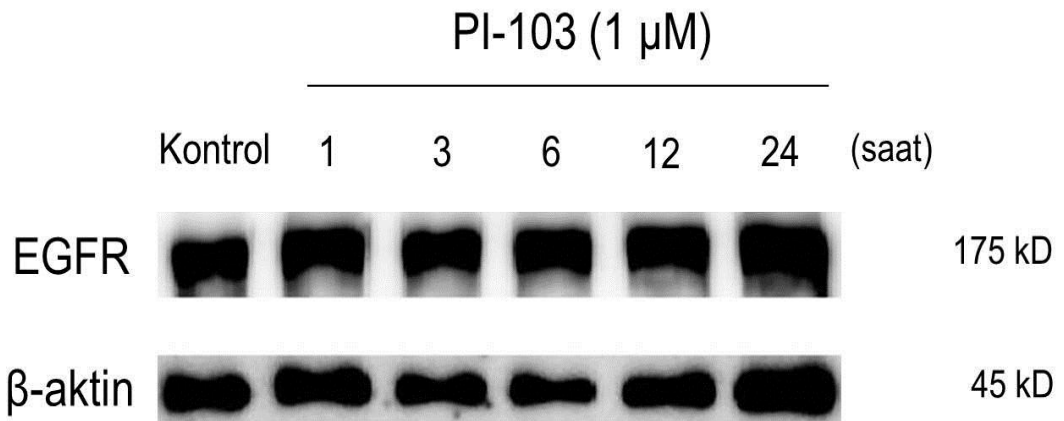
Şekil 4.8 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi (Dansimetrik Analiz, * $p < 0,01$, $n=3$)



Şekil 4.9 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi (% Değişim)

4.2 MDA-MB-468 Hücre Dizisinde PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu ve EGFR Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

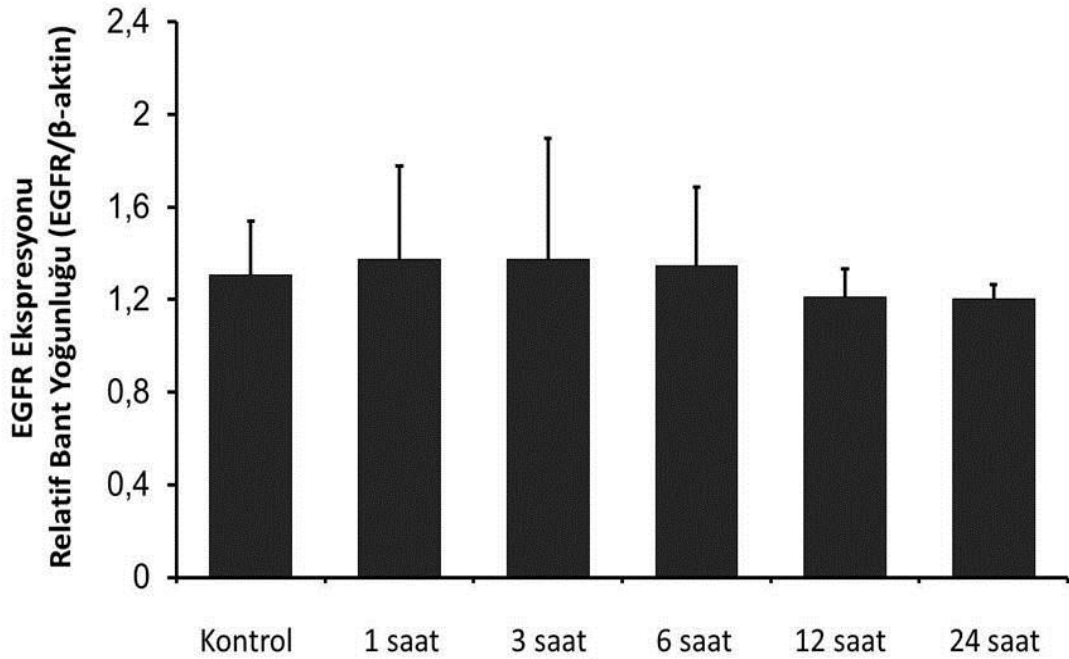
MDA-MB-468 hücrelerinde PI-103 inhibitörünün, EGFR ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.10, Tablo 4.4). Aynı koşullarda PI-103 uygulanmadan inkübe edilen tümör hücreleri kontrol olarak kullanıldı. PI-103 ile 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle inkübe edilen hücrelerde EGFR ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.11). Bu hücre dizisinde PI-103 ile oluşan geçici sinyal yolağı inhibisyonu sonucunda p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308) ve p-p70S6K ekspresyonlarında meydana gelen zamana bağlı değişimlerin EGFR ekspresyonu üzerine doğrudan etkisinin olmadığı saptandı (Şekil 4.12).



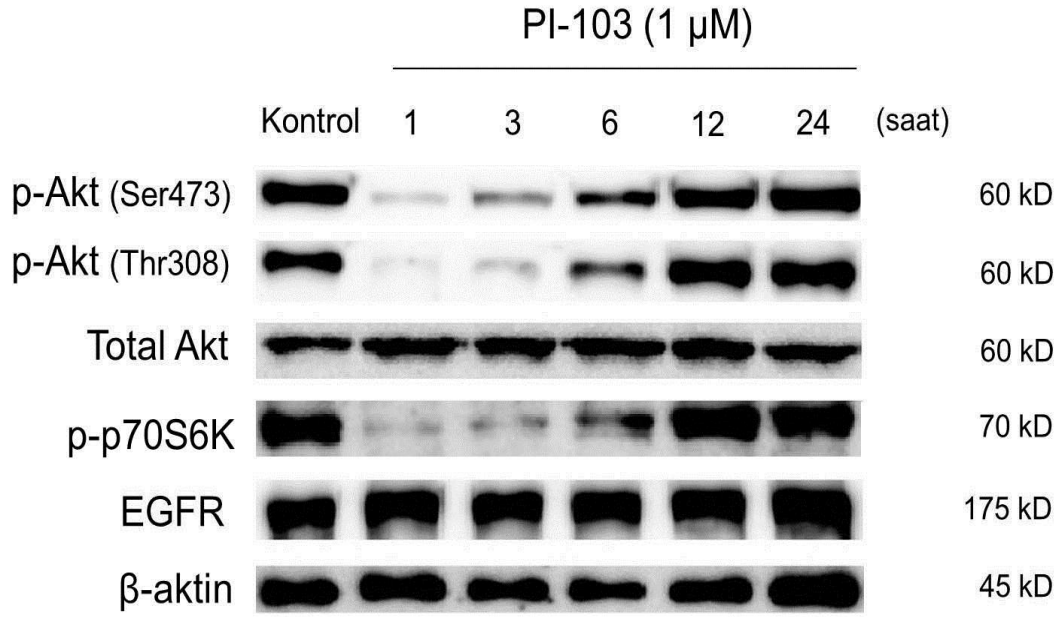
Şekil 4.10 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.4 MDA-MB-468 hücre dizisinde EGFR ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (EGFR / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	1,30 \pm 0,294
PI-103 (1 saat)	1,37 \pm 0,402
PI-103 (3 saat)	1,37 \pm 0,520
PI-103 (6 saat)	1,34 \pm 0,341
PI-103 (12 saat)	1,21 \pm 0,123
PI-103 (24 saat)	1,20 \pm 0,060



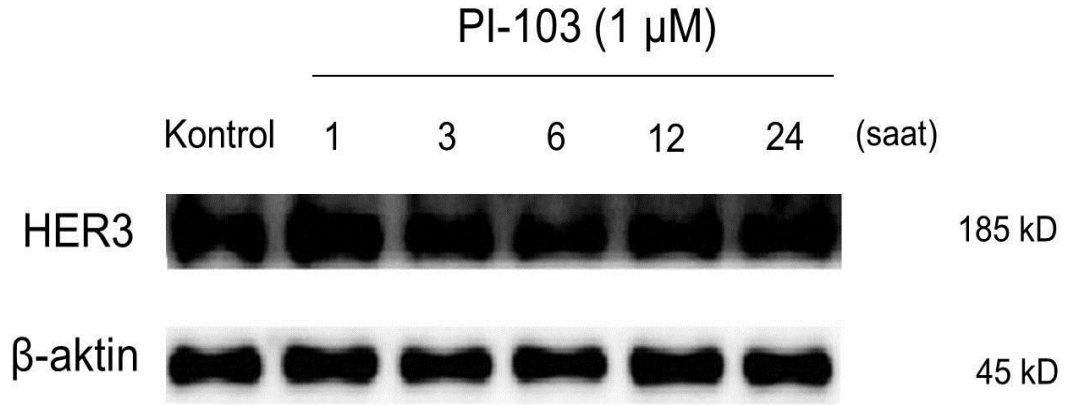
Şekil 4.11 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak EGFR ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik Analiz, n=3)



Şekil 4.12 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu ve EGFR ekspresyonu üzerine etkisi

4.3 MDA-MB-468 Hücre Dizisinde PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu ve HER3 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

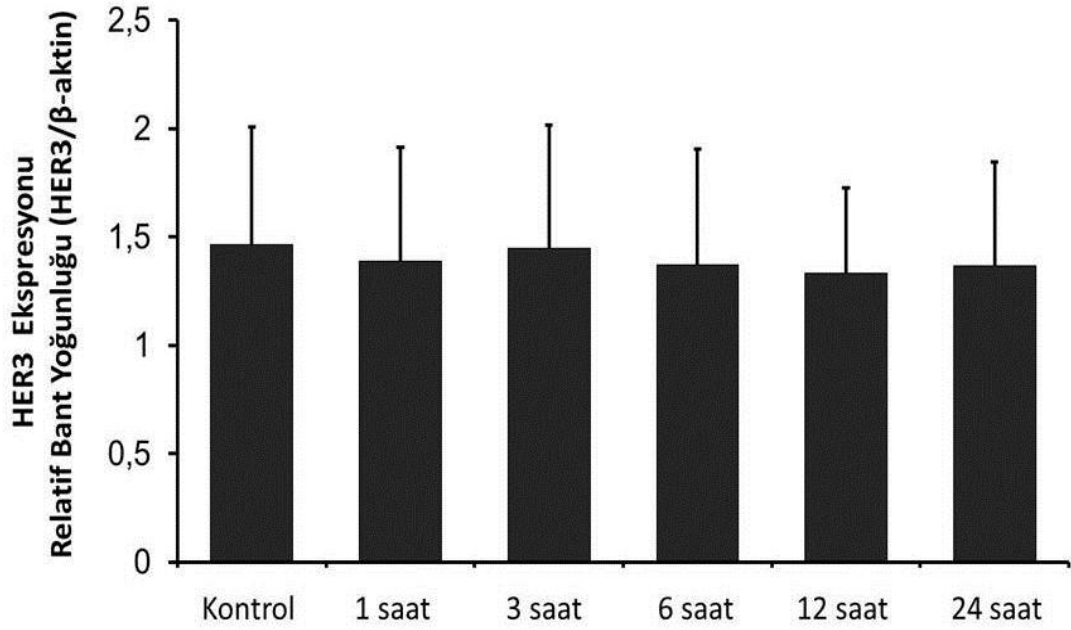
MDA-MB-468 hücrelerinde PI-103 inhibitörünün, HER3 ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.13, Tablo 4.5). PI-103 uygulanmadan inkübe edilen hücreler reseptörün bazal ekspresyon düzeyini gözlemlemek için kontrol olarak kullanıldı. 1, 3, 6, 12 ve 24 saat PI-103 ile inkübe edilen hücrelerde HER3 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe rastlanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.14). Bu hücre dizisinde PI-103 ile oluşan geçici sinyal yolağı inhibisyonu sonucunda p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308) ve p-p70S6K ekspresyonlarında meydana gelen zamana bağlı değişimlerin HER3 ekspresyonu üzerine doğrudan etkisinin olmadığı belirlendi (Şekil 4.15).



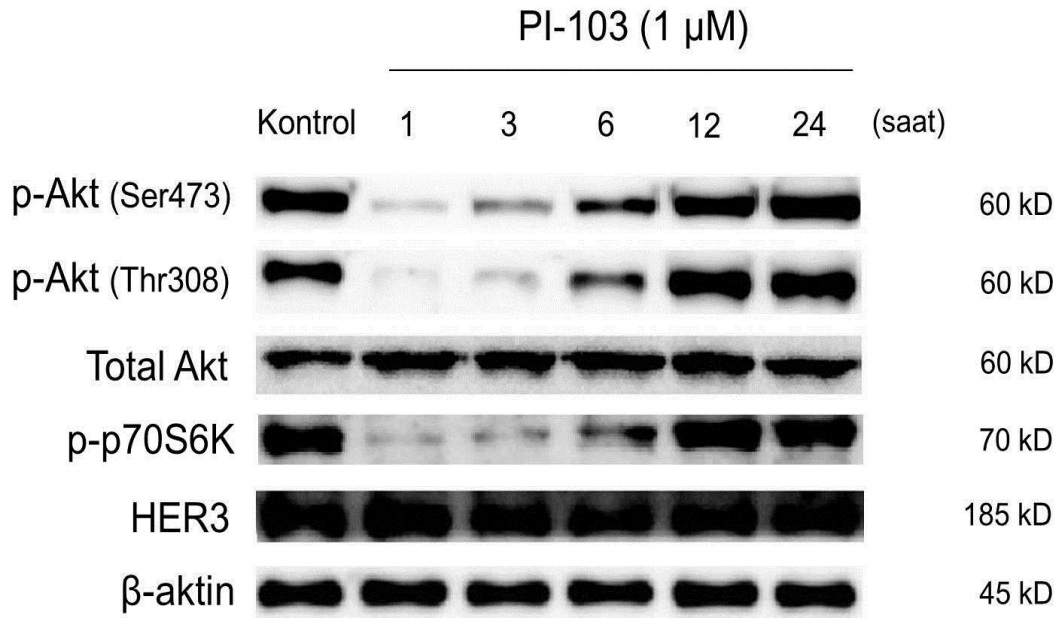
Şekil 4.13 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER3 ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.5 MDA-MB-468 hücre dizisinde HER3 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (HER3 / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	1,46 \pm 0,542
PI-103 (1 saat)	1,38 \pm 0,527
PI-103 (3 saat)	1,44 \pm 0,564
PI-103 (6 saat)	1,37 \pm 0,533
PI-103 (12 saat)	1,33 \pm 0,394
PI-103 (24 saat)	1,36 \pm 0,478



Şekil 4.14 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER3 ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik Analiz, n=3)



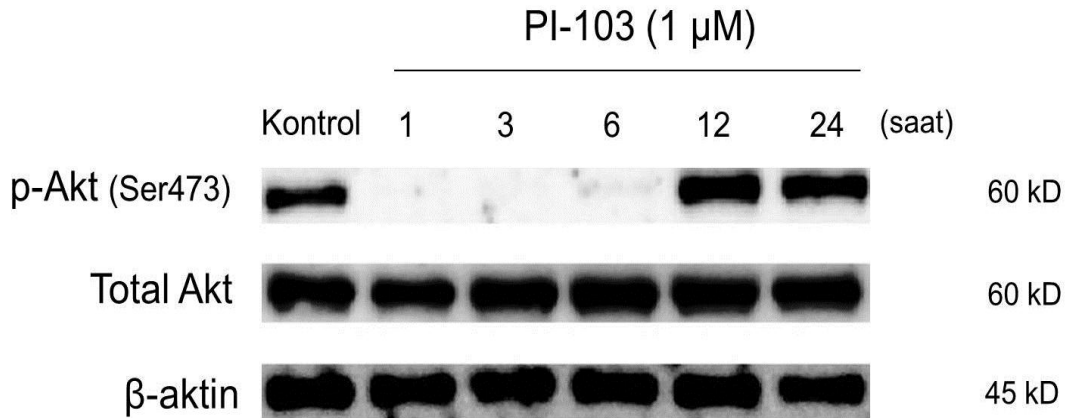
Şekil 4.15 MDA-MB-468 hücre dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu ve HER3 ekspresyonu üzerine etkisi

4.4 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu

SKBR-3 hücrelerine 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle 1 μ M PI-103 uygulanarak bu inhibitörün PI3K/Akt sinyal yolağının üzerine etkisi incelendi. p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308) ve p-p70S6K ekspresyon düzeyleri Western blot yöntemi ile değerlendirildi. PI-103 uygulanmayan hücreler sinyal yolağının bazal aktivitesini gözlemlemek için kontrol olarak kullanıldı.

4.4.1 PI-103'ün SKBR-3 Hücre Dizisinde p-Akt (Ser473) Ekspresyon Düzeyine Etkisi

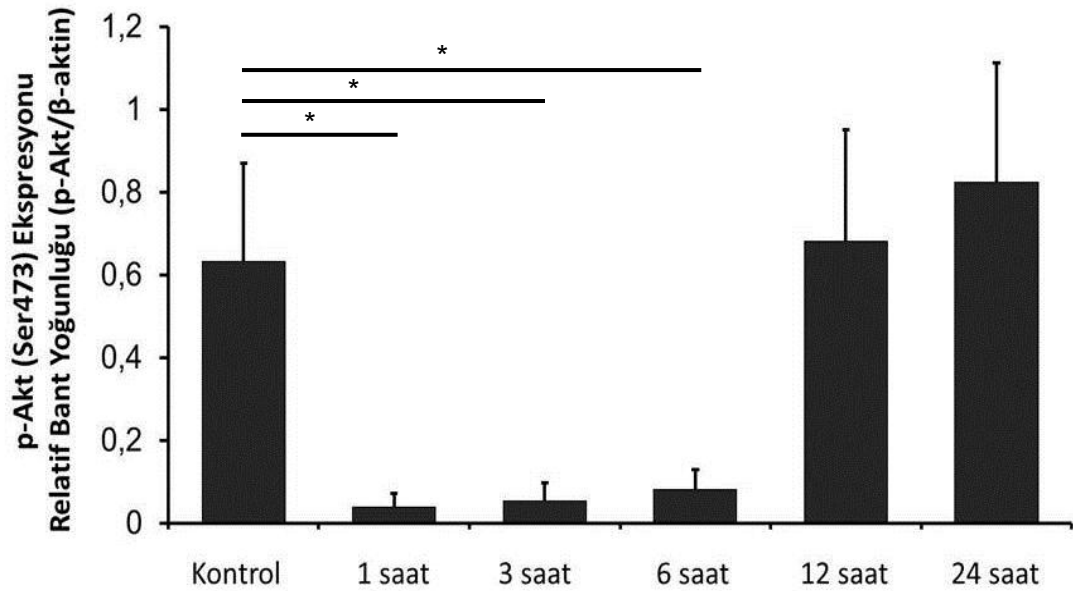
SKBR-3 hücrelerinde, PI-103'ün p-Akt (Ser473) ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.16, Tablo 4.6). p-Akt (Ser473) ekspresyonunda, bir saatlik inkübasyonun sonunda % 92 oranında, üç saatlik inkübasyon sonunda da % 90 oranında azalma saptandı. Bu inhibisyonun 6. saatin sonunda da idame ettiği (% 85) belirlendi ve bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). 12. saatten itibaren ise, PI-103 etkisinin tamamen ortadan kalktığı saptandı. Buna göre, 12 ve 24 saatlik inkübasyonlardan sonra p-Akt ekspresyon düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmedi ($p > 0,05$) (Şekil 4.17-4.18). Tüm koşullarda total Akt düzeyinin değişmediği gözlemlendi.



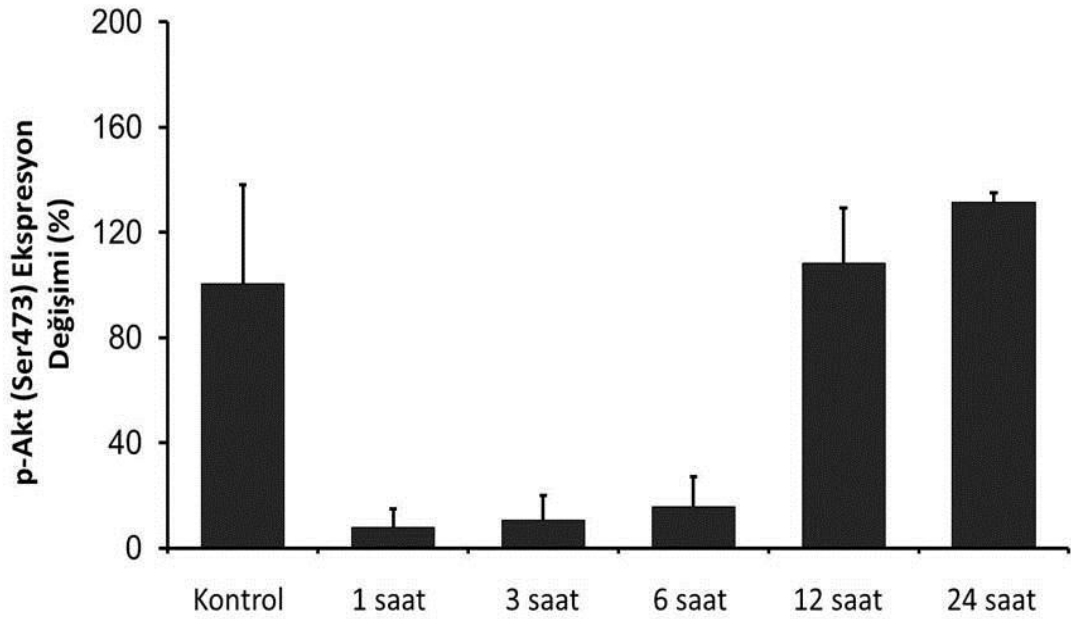
Şekil 4.16 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.6 SKBR-3 hücre dizisinde p-Akt (Ser473) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (p-Akt (Ser473) / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	0,63 \pm 0,235
PI-103 (1 saat)	0,04 \pm 0,033
PI-103 (3 saat)	0,05 \pm 0,043
PI-103 (6 saat)	0,08 \pm 0,048
PI-103 (12 saat)	0,68 \pm 0,269
PI-103 (24 saat)	0,82 \pm 0,287



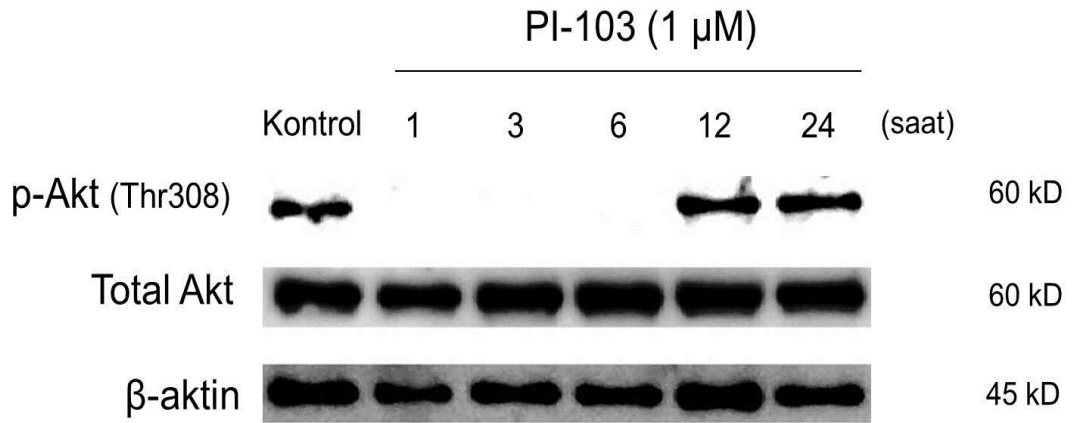
Şekil 4.17 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik Analiz, *p<0,05 , n=3)



Şekil 4.18 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Ser473) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)

4.4.2 PI-103'ün SKBR-3 Hücre Dizisinde p-Akt (Thr308) Ekspresyon Düzeyine Etkisi

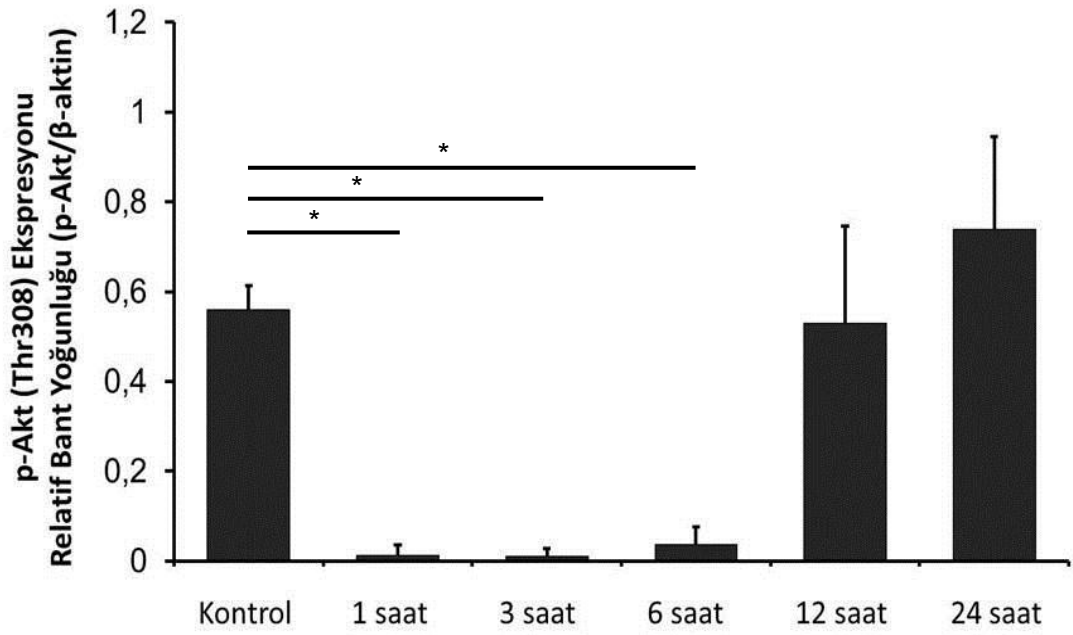
SKBR-3 hücrelerinde, PI-103'ün p-Akt (Thr308) ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.19, Tablo 4.7). PI-103 ile bir ve üç saatlik inkübasyondan sonra, p-Akt (Thr308) ekspresyonunda tam inhibisyon (% 98) saptandı. Bu etki 6. saat sonunda da devamlılık (% 94 inhibisyon) gösterdi ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,01$). 12 ve 24 saatlik inkübasyondan sonra ise p-Akt (Thr308) ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 4.20-4.21). Tüm koşullarda total Akt düzeyinin değişmediği gözlemlendi.



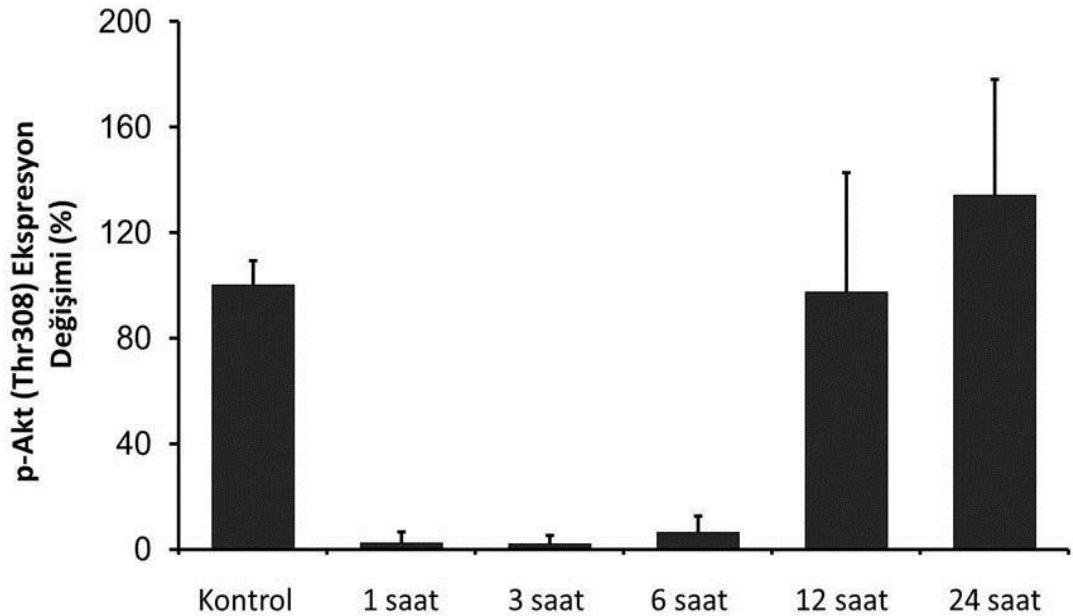
Şekil 4.19 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.7 SKBR-3 hücre dizisinde p-Akt (Thr308) ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (p-Akt (Thr308) / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	0,56 \pm 0,052
PI-103 (1 saat)	0,01 \pm 0,021
PI-103 (3 saat)	0,01 \pm 0,016
PI-103 (6 saat)	0,04 \pm 0,039
PI-103 (12 saat)	0,53 \pm 0,215
PI-103 (24 saat)	0,74 \pm 0,204



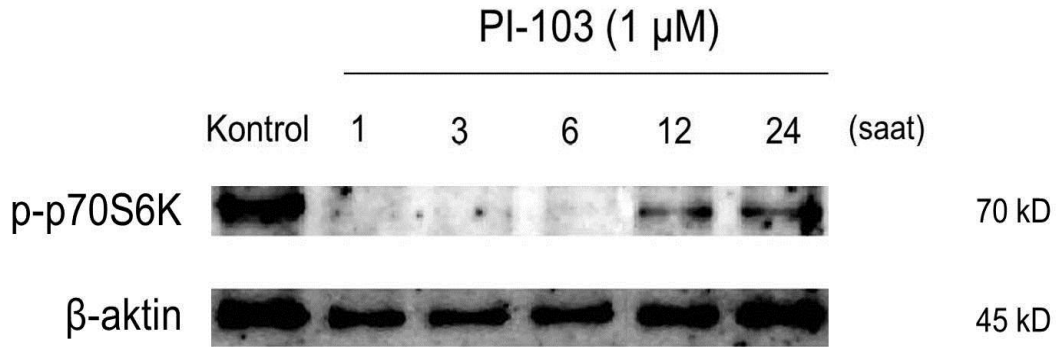
Şekil 4.20 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik Analiz, * $p < 0,01$, $n=3$)



Şekil 4.21 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-Akt (Thr308) ekspresyonuna etkisi (% Değişim)

4.4.3 PI-103'ün SKBR-3 Hücre Dizisinde p-p70S6K Ekspresyon Düzeyine Etkisi

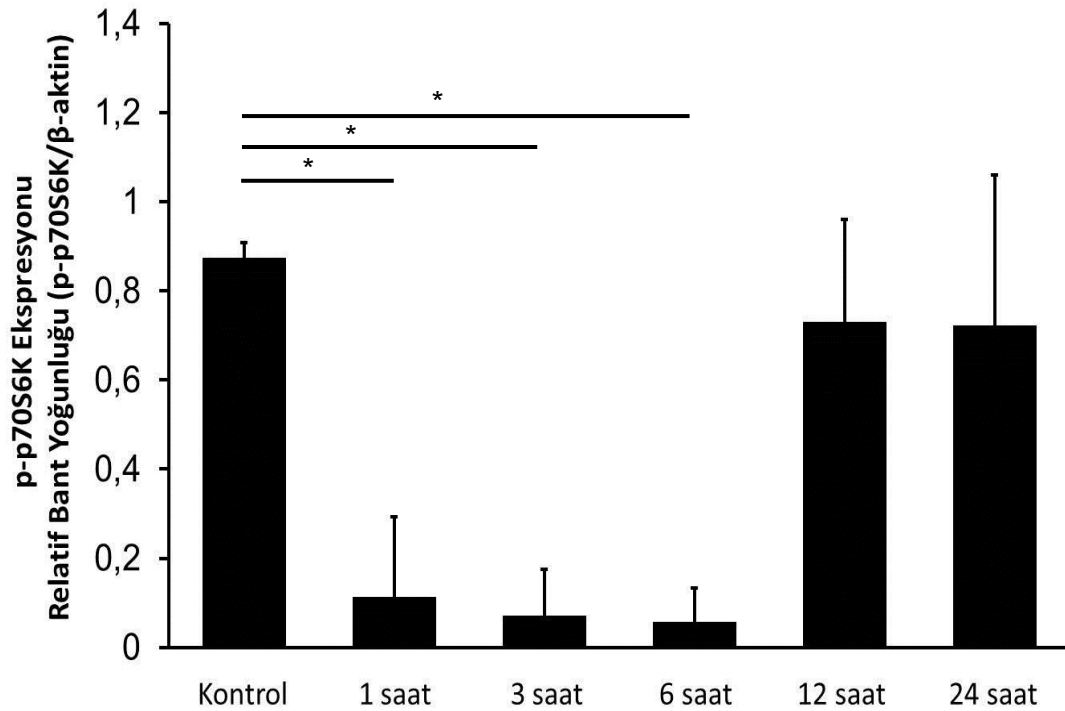
SKBR-3 hücrelerinde, PI-103'ün p-p70S6K ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.22, Tablo 4.8). p-p70S6K ekspresyonunda, bir saatlik inkübasyonun sonunda % 87 oranında, üç saatlik inkübasyon sonunda da % 92 oranında azalma saptandı. Bu inhibisyonun 6. saatin sonunda da idame ettiği (% 96) belirlendi ve bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,01$). 12 ve 24 saatlik inkübasyondan sonra ise p-p70S6K ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 4.23-4.24).



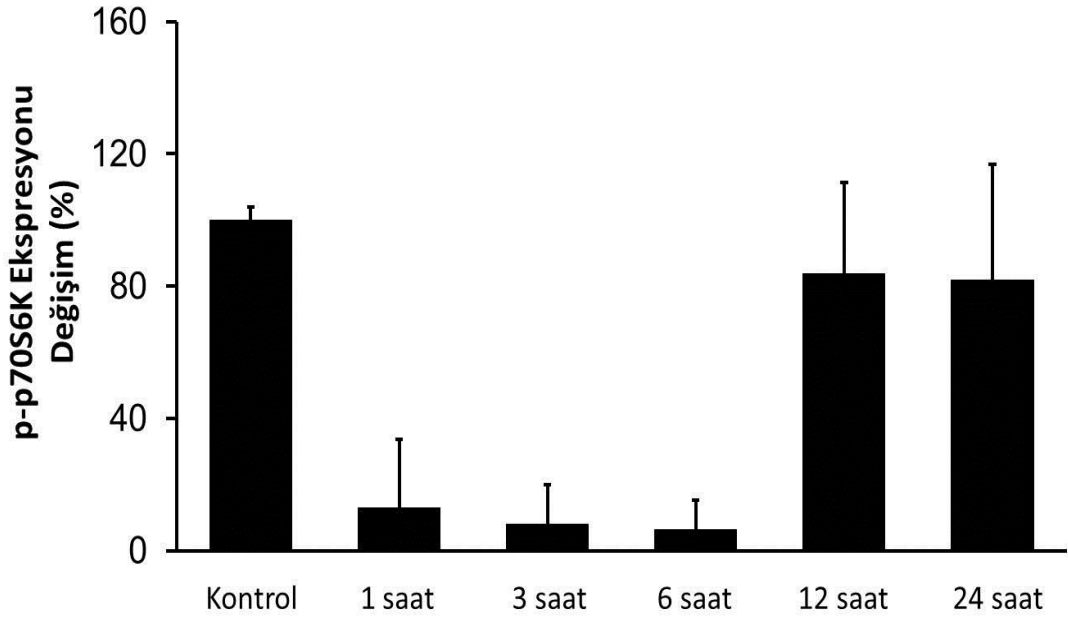
Şekil 4.22 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.8 SKBR-3 hücre dizisinde p-p70S6K ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (p-p70S6K / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	0,87 \pm 0,034
PI-103 (1 saat)	0,11 \pm 0,180
PI-103 (3 saat)	0,06 \pm 0,104
PI-103 (6 saat)	0,05 \pm 0,077
PI-103 (12 saat)	0,73 \pm 0,231
PI-103 (24 saat)	0,72 \pm 0,338



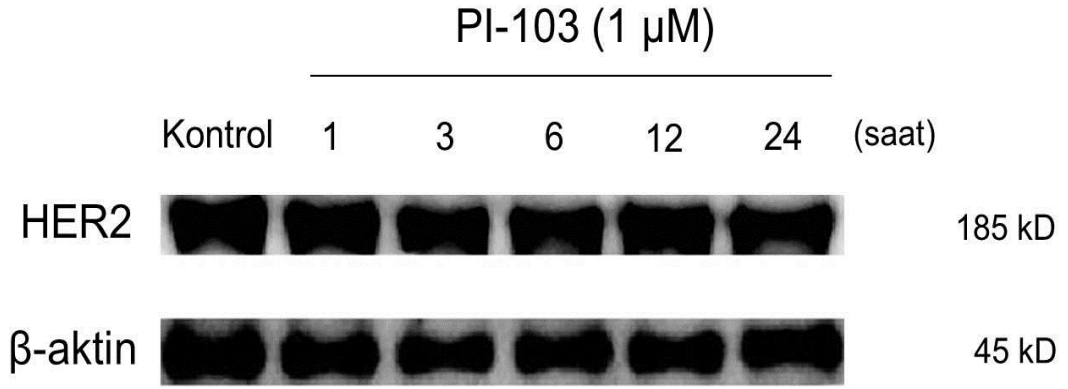
Şekil 4.23 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi
(Densitometrik Analiz, *p<0,01 , n=3)



Şekil 4.24 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak p-p70S6K ekspresyonuna etkisi (% Değişim)

4.5 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu ve HER2 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

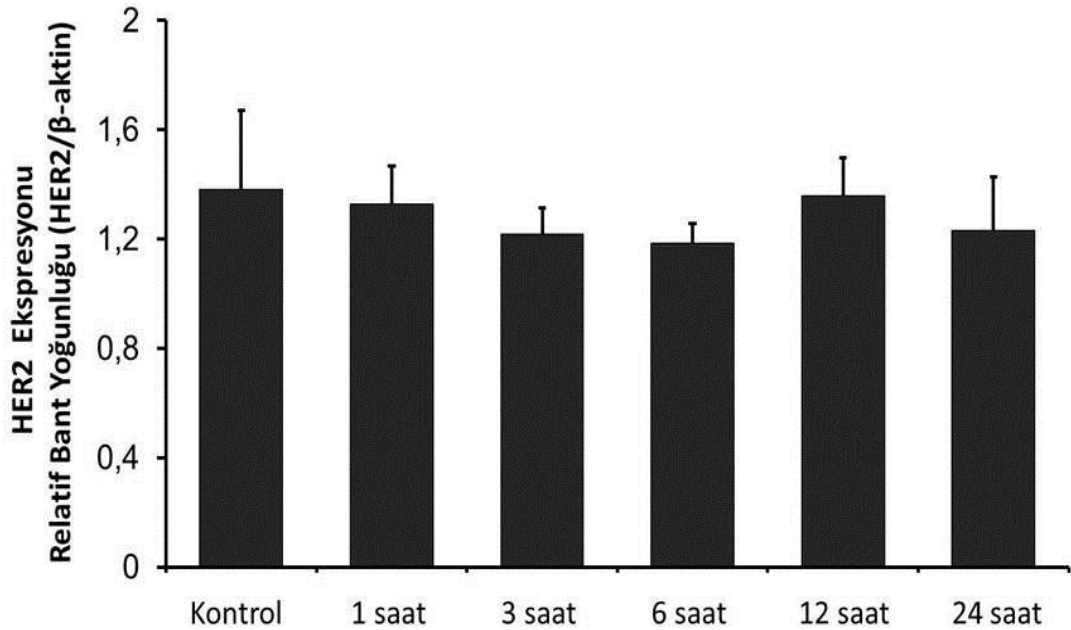
SKBR-3 hücrelerinde PI-103 inhibitörünün, HER2 ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.25, Tablo 4.9). Aynı koşullarda PI-103 uygulanmadan inkübe edilen tümör hücreleri kontrol olarak kullanıldı. PI-103 ile 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle inkübe edilen hücrelerde HER2 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 4.26). Bu hücre dizisinde PI-103 ile oluşan geçici sinyal yolağı inhibisyonu sonucunda p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308) ve p-p70S6K ekspresyonlarında meydana gelen zamana bağlı değişimlerin HER2 ekspresyonu üzerine doğrudan etkisinin olmadığı saptandı (Şekil 4.27).



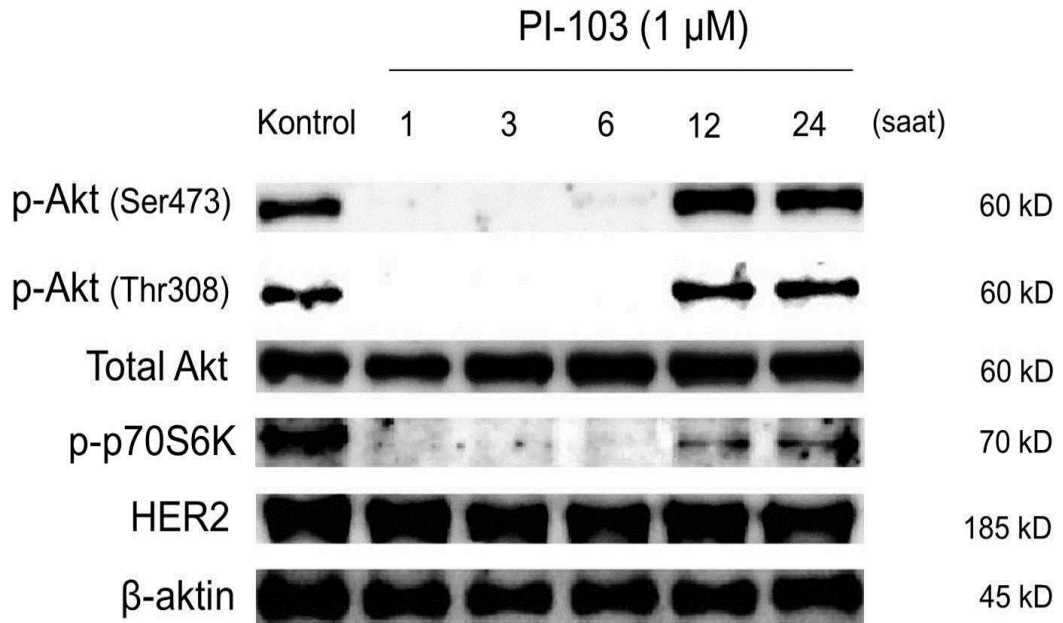
Şekil 4.25 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER2 ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.9 SKBR-3 hücre dizisinde HER2 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (HER2 / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	1,38 \pm 0,288
PI-103 (1 saat)	1,33 \pm 0,140
PI-103 (3 saat)	1,22 \pm 0,097
PI-103 (6 saat)	1,18 \pm 0,073
PI-103 (12 saat)	1,36 \pm 0,137
PI-103 (24 saat)	1,23 \pm 0,195



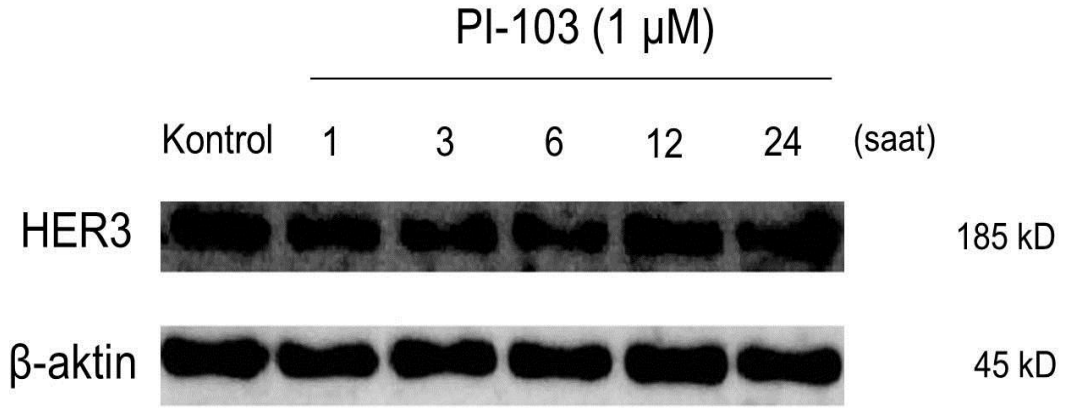
Şekil 4.26 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER2 ekspresyonuna etkisi (Dansitometrik Analiz, n=3)



Şekil 4.27 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu ve HER2 ekspresyonu üzerine etkisi

4.6 SKBR-3 Hücre Dizisinde PI3K/Akt Sinyal Yolağının İnhibisyonu ve HER3 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

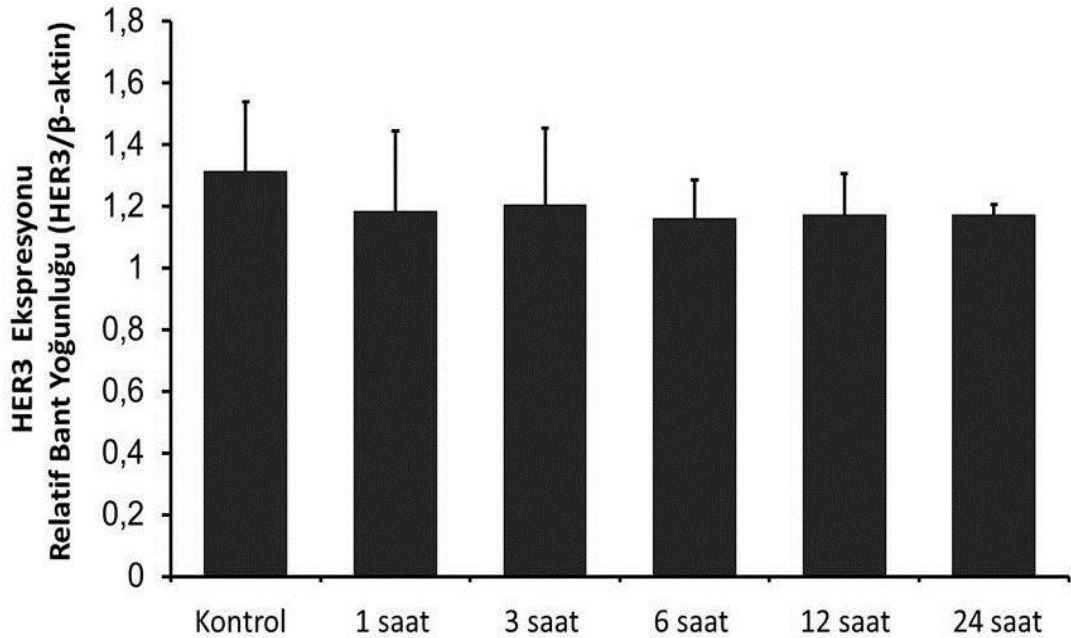
SKBR-3 hücrelerinde PI-103'ün, HER3 ekspresyonu üzerine zamana bağlı etkisi incelendi (Şekil 4.28, Tablo 4.10). PI-103 uygulanmadan inkübe edilen hücreler reseptörün bazal ekspresyonunu gözlemlemek için kontrol olarak kullanıldı. PI-103 ile 1, 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle inkübe edilen hücrelerde HER3 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.29). Bu hücre dizisinde PI-103 ile oluşan geçici sinyal yolağı inhibisyonu sonucunda p-Akt (Ser473), p-Akt (Thr308) ve p-p70S6K ekspresyonlarında meydana gelen zamana bağlı değişimlerin HER3 ekspresyonu üzerine doğrudan etkisinin olmadığı saptandı (Şekil 4.30).



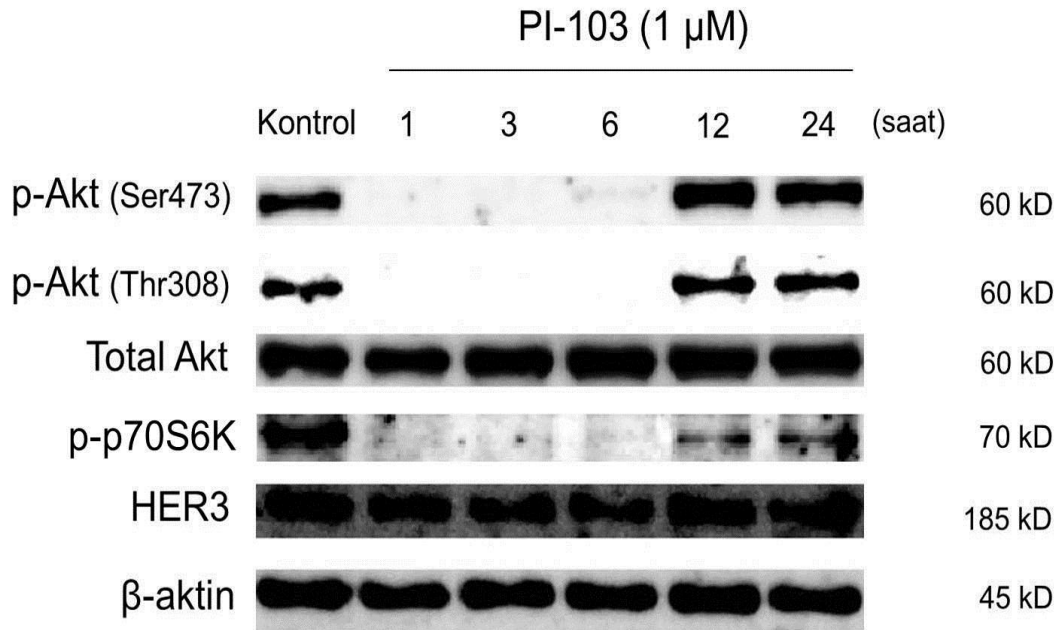
Şekil 4.28 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER3 ekspresyonuna etkisi

Tablo 4.10 SKBR-3 hücre dizisinde HER3 ekspresyonuna ait ortalama relatif bant yoğunluğu (n=3) (HER3 / β -Aktin)

	Ortalama Relatif Bant Yoğunluğu \pm SD
Kontrol	1,31 \pm 0,225
PI-103 (1 saat)	1,18 \pm 0,262
PI-103 (3 saat)	1,20 \pm 0,250
PI-103 (6 saat)	1,16 \pm 0,126
PI-103 (12 saat)	1,17 \pm 0,134
PI-103 (24 saat)	1,17 \pm 0,035



Şekil 4.29 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103'ün zamana bağlı olarak HER3 ekspresyonuna etkisi (Densitometrik Analiz, n=3)



Şekil 4.30 SKBR-3 hücre dizisinde PI-103 ile PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu ve HER3 ekspresyonu üzerine etkisi

5. TARTIŞMA

Meme kanseri oluşumunda önemli mekanizmalarından biri olan PI3K/Akt sinyal yolağının onkojenik aktivasyonuna yol açan değişiklikler reseptör tirozin kinazların ekspresyonunda artış (EGFR,HER2, HER3), PI3K'nın katalitik alt birimini kodlayan PIK3CA geninde mutasyon, PTEN'in fonksiyonel kaybı, Akt ve mTOR ekspresyonunda ve/veya aktivitesinde artış olarak sıralanmaktadır (49, 60, 64).

Meme epitel hücrelerinde HER2 aracılı transformasyon büyük ölçüde PI3K/Akt yolağı aktivasyonuna bağlanmaktadır. HER2/HER3 heterodimeri de transformasyon potansiyeli en yüksek olan reseptör etkileşimidir (98). Özellikle, EGFR ve HER2'nin aşırı ekspresyonu, bu reseptörlerin PI3K/Akt sinyal yolağını doğrudan aktive edebilme yeteneğine sahip olan HER3 ile dimerizasyonunda artışa yol açmakta ve böylece PI3K/Akt sinyal yolağının kontrolsüz bir şekilde uyarılmasına neden olmaktadır (31).

Çalışmamızda, PTEN aktivasyonu bakımından farklılık gösteren ve invaziv karaktere sahip meme kanseri hücre dizilerinde PI3K/Akt sinyal yolağı inhibisyonunun epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin ekspresyonu üzerinde zamana bağlı etkisi karşılaştırıldı. Bu meme kanseri hücre dizilerinden MDA-MB-468 hücrelerinde, EGFR amplifikasyonu mevcut olup PTEN mutasyonu taşımaktadır. SKBR-3 hücrelerinde ise HER2 reseptör ekspresyonu artmış olup PTEN mutasyonu içermemektedir. Çalışmamızda kullandığımız PI-103 inhibitörü tersinir etkili olup PI3K ve mTOR kompleksleri üzerinde dual etkiye sahiptir ve 1 µM ilaç dozunda subtoksik etki gösterdiği bilinmektedir (86).

MDA-MB-468 hücrelerinde, ilk olarak, PI-103'ün PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı üzerinde zamana bağlı etkisi incelendi. İnhibisyonun gösterilmesi için Akt'ın iki farklı aktif formunun ekspresyon düzeylerindeki değişimler değerlendirildi. Akt'ın PI3K aracılığı ile Thr308 rezidüsünden fosforile edilmesi bu kinazın aktivasyonu için zorunludur. Akt'ın mTORC2 aracılı olarak Ser473 rezidüsünden fosforilasyonu ise kinazın aktif

konformasyonunu stabilize etmektedir (99, 100). Bizim deneylerimizde, p-Akt (Ser473) ve p-Akt (Thr308) ekspresyonlarındaki azalma, PI-103'ün MDA-MB-468 hücrelerinde Akt aktivasyonunu ilk üç saatte güçlü bir şekilde baskıladığını ortaya koymaktadır. Bu etki istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 4.2 ve Şekil 4.5). İnhibitörün etkisi 6. saatten itibaren kaybolmakta ve Akt aktivasyonunun yeniden kazanıldığı dikkat çekmektedir. 24. saatin sonunda ise p-Akt (Ser473) ve p-Akt (Thr308) ekspresyon düzeyleri kontrol seviyelerine ulaşmaktadır. Torbett ve arkadaşlarının çalışmasında da PI-103'ün bu meme kanseri hücre dizisindeki tersinir etkisi doğrulanmaktadır (101).

Tümör hücrelerinde inhibitörün geçici etkisi iki nedene atfedilebilir. Bunlardan birincisi, zamana bağlı olarak PI-103'ün hücre içinde etkisinin azalması olabilir. Rodrik-Outmetziguine ve arkadaşlarının çalışması bu noktaya açıklık getirmektedir (9). Bu çalışmada, MDA-MB-468 hücrelerinde bir başka mTOR kinaz inhibitörü olan AZD8055 ile yapılan deneylerde, 8. saatten sonra hücrelerin ilave süreler ile (1-4-16 saat) tekrar aynı ajanla inkübasyonu, p-Akt (Thr308) aktivasyonunun korunması ile sonuçlanmıştır. Dolayısıyla, 8. saatten itibaren geri kazanılan ve idame ettirilen bu aktivasyonun, ilacın etkisizleşmesiyle ortaya çıkan bir durum olmadığı açıklığa kavuşturulmuştur. Diğer bir mTOR kinaz inhibitörü olan PP242 de bu hücrelerde geçici p-Akt (Thr308) inhibisyonu yapmaktadır (9). Bu bulgular, mTOR kinaz inhibitörlerinin geçici p-Akt inhibisyonu yapmalarının genel bir özellikleri olduğuna işaret etmektedir. Buna göre, bizim deneylerimizde PI-103 ile izlenen geçici inhibisyonu da hücre içinde ilaç düzeyinin azalmasına bağlamamak gerekir. Tümör hücrelerinde inhibitörün geçici etkisine neden olabilecek ikinci neden ise, PI3K/Akt sinyal yolağının yeniden aktivasyonudur. Bu re-aktivasyonu sağlayan unsurun, reseptör tirozin kinaz seviyesinde kazanılacak bir uyarı olması beklenebilir. Bu uyarı, RTK ekspresyonunun ve/veya aktivasyonunun artması yönünde olabilir. Bu nedenle, çalışmamızın ikinci etabında, tümör hücrelerinde, PI-103 aracılı inhibisyon paterni ile RTK ekspresyonu arasındaki ilişki incelenmiştir.

Akt molekülünün önemli hedef proteinlerinden biri olan mTOR, hücrenin besin ve enerji kaynaklarının elverişli olması halinde hücre çoğalması, hücre büyüklüğü ve metabolizması, protein sentezi gibi faaliyetleri düzenlemektedir. mTOR proteini sitoplazmada fonksiyonel olarak iki farklı protein kompleksi içinde yer alır. Bu komplekslerden biri mTORC1 (*mTOR Complex1*) olup, p70S6K ve 4E-BP1 aracılığı ile hücre büyüklüğünün kontrolü ve protein translasyonunda rol almaktadır. mTORC2 (*mTOR Complex2*) ise Akt seviyesinde etkilidir. Bu kompleks içindeki mTOR ise, p-Akt (Ser473) oluşumunu katalizleyerek hücre gelişimi ve sağkalımı düzenler.

PI3K/Akt sinyal yolağında kritik bir kontrol basamağı, mTORC1'in aktivasyonunun PI3K seviyesinde negatif geri bildirim yol açmasıdır (52). mTORC1 inhibisyonunda etkili olan rapamisin ve analogları p70S6K aktivasyonunu engellerken, mTORC2 üzerine etki etmezler (84, 85). PI-103 gibi dual PI3K-mTOR inhibitörleri ise hem PI3K'nın p110 katalitik alt ünitesinin tüm izoformlarının (α, β, δ) hem de mTORC1 ve mTORC2 protein komplekslerinin inhibisyonunda etkilidir (27, 86, 87). Buna göre, sadece mTORC1 etkili bir şekilde inhibe olduğunda, negatif geri-bildirim mekanizması da ortadan kalkacak ve re-aktivasyon olacaktır. Dual etkili PI3K/ mTOR inhibitörlerinin önemli bir avantajı ise, bu istenmeyen yeniden aktivasyonu bertaraf etme potansiyeline sahip olmalarıdır (52).

Çalışmamızda, MDA-MB-468 hücrelerinde, PI-103'ün mTOR seviyesinde oluşturduğu inhibisyon paterni de, Akt seviyesinde görülen geçici inhibisyon ile uyumlu bulunmuştur. Buna göre, p-p70S6K ekspresyonu üzerindeki inhibisyon yine 6. saatten itibaren ortadan kalkmaktadır (Şekil 4.8). Bu bulgular, PI3K/Akt yolağının PI3K ve mTOR seviyesinde inhibisyondan kısa bir süre sonra, mutlaka yeniden aktivasyon gösterdiğine işaret etmektedir ve bu aktivasyonun tetikleyici noktası RTK düzeyinde değişiklikler olabilir.

Çalışmamızda, inhibisyon paterni ile RTK ekspresyonu arasındaki ilişkiyi anlamak için, MDA-MB-468 hücrelerinde PI-103'ün EGFR ve HER3 ekspresyonu üzerinde zaman bağlı etkisini inceledik. Bizim sonuçlarımıza göre, tümör hücrelerinde 1 μ M PI-103, PI3K ve mTOR seviyesinde geçici inhibisyon sağlamakla beraber, bu inhibisyon EGFR ve HER3 ekspresyon düzeylerine belirgin bir etki oluşturmadi. (Şekil 4.11-4.14).

Akt'nin RTK'lar üzerinde düzenleyici etkisinin olduğu bilinmektedir. Akt, FOXO transkripsiyon faktörünü inhibe ederek, bu faktör aracılığıyla tetiklenen RTK ekspresyonunu düzenlemektedir (8). Dual etki içermeyen PI3K ve mTOR inhibitörleri ve Akt'ı doğrudan inhibe eden ajanlar ile yapılan çalışmalarda, meme kanseri hücrelerinde bu mekanizmaya bağlı olarak RTK'ların ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (8, 9, 102). mTOR inhibitörlerinden AZD8055'in mTORC1 ve mTORC2'yi etkili bir şekilde inhibe ederek negatif geri bildirim ortadan kaldırdığı ve ardından Akt'nin PI3K aracılığı ile Thr308 rezidüsünden fosforillenerek yeniden aktive olduğu bildirilmektedir (9). Bu çalışmada, BT474 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde inhibitörün etkisi sonucu dördüncü saatten itibaren HER3 ve/veya HER2 ekspresyonlarının ve kinaz aktivitelerinin de arttığı vurgulanmaktadır. Bu çalışmada dikkat çeken nokta, ilaç ile inkübe edilmeyen hücrelerde RTK ekspresyonlarının oldukça düşük düzeyde tayin edilmesidir. Oysa, bizim çalışmamızda, MDA-MB-468 hücrelerinde, kontrol örneklerindeki EGFR ekspresyonu oldukça yüksek bulunmuş olup bu durum EGFR amplifikasyonu ile uyumludur. She QB ve arkadaşlarının ekspresyon paterni de bizim bulgularımıza benzer niteliktedir (66). Buna ilave olarak, bizim deneylerimizde kontrol hücrelerinin HER3 ekspresyonları da yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla, PI-103'ün Akt aktivasyonu üzerindeki zamana bağlı geçici inhibitör etkisine cevaben, RTK ekspresyonlarında olası bir değişim gözlememek ve anlamlı ekspresyon artışı görmeyişimiz belirttiğimiz yüksek ekspresyon profiline bağlı olabilir.

PI-103'ün RTK düzeyindeki etkisine ışık tutmak için, inhibitörün mRNA düzeyinde değişim yapıp yapmadığına da bakmak yararlı olacaktır. Zira, mTOR inhibitörlerinden BEZ235'in BT474 ve SKBR3 hücrelerinde,

HER3 mRNA düzeyini artırdığı gösterilmiştir. Bu artışın HER2 inhibitörü lapatinib ile çok daha güçlü olduğu da dikkat çekmektedir (98). Ayrıca RTK ekspresyonu ile birlikte kinaz aktivite değişikliklerinin de değerlendirilmesi reaktivasyon mekanizmasına açıklık getirebilir. MDA-MB-468 hücrelerinde bazal HER2 ekspresyonu yoktur. PI-103'ün, bu reseptörün ekspresyonunu etkileyip etkilemediğini incelemek de bütüncü bir yaklaşım olacaktır.

Akt'ın PH bölgesine etki ederek inhibitör etki gösteren Akti ajanı ile yapılan çalışmalarda p-Akt (Thr308) ve p-Akt (Ser473) inhibisyonuna bağlı olarak EGFR ve HER3 ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (8). Bu sonuç, Akt seviyesinde inhibisyonun, FOXO üzerindeki baskıyı ortadan kaldırarak, RTK 'ların transkripsiyonunu hızlandırdığını doğrulamaktadır. PI3K inhibitörü olan XL147 ile inkübe edilen hücrelerde de HER3 düzeylerinde artış olduğu gözlenmiştir. Benzer etkiler allosterik Akt inhibitörleri (5J8) ve diğer PI3K inhibitörleri (LY294002) ile de gösterilmiştir. Ancak mTORC1'i inhibe eden Rapamisin'in HER3 ekspresyonuna etki etmediği belirtilmektedir (102). Çalışmamızda kullandığımız dual PI3K/mTOR inhibitörü PI-103 ile, bazal EGFR ve HER3 düzeyleri oldukça yüksek bulunan MDA-MB-468 hücrelerinde, zamana bağlı ekspresyon değişikliği olmamaktadır.

Çalışmamızda, SKBR-3 hücrelerinde de, ilk olarak, PI-103'ün PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı üzerinde zamana bağlı etkisi incelendi. SKBR-3 hücrelerinde de p-Akt (Ser473) ekspresyonunun 6 saat süreyle %80'in üzerinde inhibe olduğu saptandı ve bu inhibisyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). 12. saatten itibaren bu protein ekspresyonunun kontrol düzeylerine ulaştığı görüldü (Şekil 4.17). Bu hücrelerde yapılan çalışmalarda, PI-103'ün Akt seviyesinde geçici inhibitör etki yaptığı teyit edilmektedir (101). PI-103'ün, PI3K aracılığı ile meydana gelen Akt (Thr308) fosforilasyonu üzerinde zamana bağlı etkisi incelendiğinde p-Akt (Thr308) ekspresyonunun da 6 saat boyunca tamamen inhibe olduğu saptandı. Bu inhibisyonun 12. saatten itibaren ortadan kalktığı ve p-Akt (Thr308) ekspresyon düzeylerinin kontrol seviyelerine ulaştığı gözlemlendi (Şekil 4.20). HER2 amplifikasyonu taşıyan bir diğer dizi olan BT474 meme kanseri hücrelerinde, AZD8055 ile

yapılan çalışmalar, Akt seviyesindeki bu re-aktivasyonun ilacın hücre içinde zamana bağlı olarak etkisinin azalması ile ilişkili olmadığını göstermiştir (9). Bizim deneylerimiz de, PI-103'ün geçici inhibitör etkisini takiben, Akt düzeyinde re-aktivasyonu tetikleyen bir mekanizmaya işaret etmektedir. Zira, HER2 ekspresyonu yüksek olan BT474 hücrelerinde lapatinib ile HER2 kinaz aktivitesi inhibe edildiğinde, mRNA düzeyinde ve protein düzeyinde HER3 artışına yol açmaktadır (98). HER3 aktivasyonu da PI3K/Akt sinyalini yeniden harekete geçirerek hedeflenmiş tedavinin etkinliğini azaltmaktadır. Dolayısıyla, PI3K/Akt yolağının inhibitörlere cevaben yeniden aktive olması önemli bir ayrıntı olarak dikkat çekmektedir. PI-103 gibi dual inhibitörler ile alınan parsiyel inhibisyonun doğurabileceği etkiler de bu çerçevede akılda tutulmalıdır.

Çalışmamızda, PTEN mutasyonu içermeyen SKBR-3 hücrelerinin, MDA-MB-468 hücreleri ile kıyaslandığında, PI-103 inhibitörüne karşı daha duyarlı olduğu görülmüştür. MDA-MB-468 hücrelerinin PTEN mutasyonu taşıması ve PI3K/Akt yolağının kontrolsüz aktivasyonu dikkate alındığında, bu hücrelerde sinyal yolağının yeniden aktivasyonu ve p-Akt ekspresyonlarındaki artışın SKBR-3 hücrelerine göre daha güçlü ve hızlı olması olağan karşılanabilir.

Deneylerimizde, SKBR-3 hücrelerinde de, mTOR seviyesinde geçici inhibisyon izlendi. Bu hücrelerde, p-p70S6K ekspresyonunun 6 saat boyunca tamamen inhibe olduğu saptandı ve bu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$). Ancak 12. saatten sonra bu proteinin ekspresyon düzeylerinin kontrol seviyelerine ulaştığı tespit edildi (Şekil 4.23). Bizim sonuçlarımıza göre PI-103 uygulanan SKBR-3 hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının 12. saatten sonra yeniden aktive olduğu saptanmıştır ve bu geçici inhibisyon literatürde yer alan diğer çalışmalar ile uyum göstermektedir (101). Ancak, bu geçici inhibisyonun bu hücrelerdeki HER2 ve HER3 ekspresyonu üzerinde anlamlı bir etki göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.26-4.29). Bu noktada, SKBR-3 hücrelerinde bazal reseptör ekspresyonlarını oldukça yüksek bulmamız yine dikkat çeken bir unsurdur. Dolayısıyla, PI-103'ün etkisi hakkında kesin kanaate varmak için bu reseptörlerin kinaz aktivitelerinde

değişim olup olmadığını da test etmemiz gerekir. Buna ek olarak, RTK'ların mRNA düzeylerine bakılarak transkripsiyonel düzeyde regülasyonu da kontrol etmemiz uygun olacaktır.

HER2 amplifikasyonu görülen meme kanseri hücrelerinde HER2/HER3 dimerlerinin aktivasyonunun önemi bilinmektedir. HER2 reseptörünün tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) hedeflenmiş tedavilerde kritik değer taşımaktadır. Garrett J.T. ve ark. yaptığı çalışmada, HER2 'nin kinaz aktivitesini inhibe eden lapatinib'in Akt ve mTOR aktivitesini baskılamakla beraber HER3 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (98). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise PI3K/Akt ve Ras/MAPK yolaklarının birbirlerini kompanse ettiği, bu yolaklar üzerinde etkili olan inhibitörler aracılığı ile gösterilmiştir. PI3K ve mTOR kompleksleri üzerinde dual etkiye sahip olan BEZ235 inhibitörü ile inkübe edilen meme kanseri hücrelerinde Ras/MAPK yolağının aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (85, 103, 104). Bizim çalışmamızda kullandığımız PI-103 inhibitörü de PI3K ve mTOR üzerinde dual etkiye sahip olduğundan tümör hücrelerinde Ras/MAPK yolağını aktive ederek RTK ekspresyonları üzerinde düzenleyici etkiye sahip olabilir. Dolayısıyla, sinyal yolağını inhibe etmenin, tümör hücreleri tarafından kompanse edilebileceğini daima akılda tutmamız gerekir.

Sonuç olarak, çalışmamızda MDA-MB-468 ve SKBR-3 meme kanseri hücre dizilerinde PI-103'ün reseptör tirozin kinaz ekspresyonları üzerindeki zamana bağlı etkisi ilk kez incelenmiştir;

1. Tersinir bir PI3K ve mTOR dual inhibitörü olan PI-103'ün MDA-MB-468 ve SKBR-3 hücrelerinde p-Akt ve p-p70S6K oluşumunu geçici olarak inhibe ettiği saptanmıştır.
2. MDA-MB-468 hücrelerinde bazal EGFR ve HER3, SKBR-3 hücrelerinde ise bazal HER2 ve HER3 ekspresyonları oldukça yüksek düzeyde bulunmuştur.

3. Tümör hücrelerinde Akt ve mTOR seviyesinde gözlenen kısmi inhibisyonu takip eden sinyal yolağı re-aktivasyonu, EGFR, HER2 ve HER3 ekspresyon düzeylerini etkilememiştir.
4. Dolayısıyla, PI-103'ün RTK ekspresyonu üzerinde zamana bağılı değişim yapmadığı gözlenmiştir.

PI3K/Akt sinyal yolağı özgül inhibitörlerinin tedavi stratejilerinde önemli bir yeri vardır. Bu inhibitörlerin, sinyal yolağı regülasyonunu bozarken, diğer taraftan sinyal yolaklarının re-aktivasyonunu tetiklemesi tümör hücrelerinde direnç oluşumuna katkı sağlamaktadır. Bunu önlemek amacıyla, bu sinyal yolakları üzerindeki etkileri birbirinden farklı olan inhibitörlerin kombinasyon şeklinde uygulanmasının, kanser tedavilerinde daha etkili sonuçlara yol açacağı vurgulanmaktadır.

Son yıllarda, RTK'lar ile ilgili çalışmalar HER ailesi üyelerinin ekspresyonları ve gen amplifikasyonları üzerine yoğunlaşmaktadır. HER reseptörleri arasındaki dimerizasyon ve aktivasyon mekanizmalarının karsinogenez sürecine etkileri bu reseptörlerin oluşturduğu karmaşık sinyal ağına bağılıdır. Bu çerçevede, HER reseptörleri ile ilişkili sinyal yolaklarının inhibisyonunun, bu reseptörlerin ekspresyonu ve kinaz aktiviteleri üzerinde kompensasyon yaratan etkilerinin anlaşılması hedeflenmiş tedavilerdeki direnç mekanizmalarına da ışık tutacaktır.

Bu tez çalışmasında, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının PI-103 ile inhibisyonu sağlanarak bu inhibisyonun EGFR amplifikasyonu olan PTEN (-) MDA-MB-468 hücre dizisinde EGFR ve HER3, HER2 amplifikasyonu olan PTEN (+) SKBR-3 hücre dizisinde HER2 ve HER3 ekspresyonları üzerine zamana bağılı etkisi ilk kez incelendi. Bu hücre dizilerinde, PI-103 ajanının sinyal yolağı inhibisyonunda etkili olduğu ancak, PI3K/Akt yolağının re-aktivasyon gösterdiği saptandı. Bu re-aktivasyon sürecinde ise, EGFR, HER2 ve HER3 reseptörlerinin protein düzeylerinin anlamlı olarak değişmediği gözlemlendi.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada;

1. İnvaziv karakterli MDA-MB-468 ve SKBR-3 meme kanseri hücre dizilerinde reseptör tirozin kinazların ekspresyonları Western Blot yöntemi ile incelendi ve bu analizlerin optimizasyonu sağlandı.
2. MDA-MB-468 ve SKBR-3 hücre dizilerinde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının inhibisyonunun reseptör tirozin kinazlar üzerinde zamana bağlı etkisi incelendi:
 - PI3K/mTOR dual inhibitörü olan PI-103'ün, her iki hücre dizisinde de sinyal yolağını geçici süreyle inhibe ettiği ve daha sonra yolağın re-aktivasyon gösterdiği saptandı.
 - MDA-MB-468 hücrelerinde, sinyal yolağında meydana gelen geçici inhibisyonun EGFR ve HER3 ekspresyonu üzerinde düzenleyici etkiye sahip olmadığı tespit edildi.
 - Sinyal yolağındaki geçici inhibisyonun, SKBR-3 hücrelerinde HER2 ve HER3 ekspresyon düzeylerini de anlamlı düzeyde etkilemediği saptandı.
3. Çalışmamızdaki hücre dizilerinin PTEN ekspresyonu yönünden farklılık taşıması, EGFR, HER2 ve HER3 ekspresyonunun regülasyonuna ilişkin sonuçları etkilemedi.
4. Meme kanseri hücrelerinde sinyal yolağının etkili inhibisyonunu sağlayarak amacıyla, re-aktivasyonu önlemek gerekir. Bu noktada, HER reseptörlerine etkili kinaz inhibitörleri ve yolak inhibitörlerinin beraber kullanılması gibi kombinasyon uygulamalarını denemek bütüncü bir yaklaşım olabilir.

5. Meme kanseri hücre dizilerinde PI-103 inhibitörünün RTK'ların ekspresyonu üzerindeki zamana bağlı etkisi incelenirken bu RTK'ların mRNA düzeylerine bakılarak inhibitörün transkripsiyonel düzeyde düzenleyici etkinliği araştırılabilir.
6. Meme kanseri hücrelerinde RTK'ların ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen FOXO transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları ve nükleer lokalizasyonları incelenebilir.
7. Diğer sinyal yollarının (örneğin MAPK yolağı) düzenlenmesini sağlayan özgül inhibitörler kullanılarak RTK ekspresyonu üzerinde düzenleyici ve/veya kompanse edici etkilerinin olup olmadığı araştırılabilir.
8. Meme kanseri hücrelerinde sinyal yolağı inhibitörlerinin RTK'ların re-aktivasyonları üzerindeki etkisi tedavi stratejileri açısından dikkate değer bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141, 1117–1134.
2. Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411, 355–365.
3. Easty, D.J., Gray, S.G., O’Byrne, K.J., O’Donnell, D., and Bennett, D.C. (2011). Receptor tyrosine kinases and their activation in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Research.*, 24, 446–461.
4. Bennisroune, A., Gardin, A., Aunis, D., Cremel, G., and Hubert, P. (2004). Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol Hematol.*, 50, 23–38.
5. Takeuchi, K., and Ito, F. (2011) Receptor tyrosine kinases and targeted cancer therapeutics. *Biol Pharm Bull.*, 43 (12), 1774-1780.
6. Porter, A.C., and Vaillancourt, R.R. (1998) Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene*, 16, 1343 – 1352.
7. Cantley L.C., (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, Vol. 296 no. 5573 pp. 1655-1657.
8. Chandarlapaty, S., Sawai, A., Scaltriti, M., Rodrik-Outmezguine, V., Grbovic-Huezo, O., Serra, V. (2011) AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell*, 19, 58 – 71 .
9. Rodrik-Outmezguine, V., Chandarlapaty, S., Pagano, N., Poulikakos, P.I., Scaltriti, M., Moskatel, E. (2011) mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer Discovery*, 3, 248 – 59

10. Fan, Q.W., Knight, Z.A., Goldenberg, D.D., Yu, W., Mostov, K.E., Stokoe, D., Shokat, K.M., Weiss, W.A. (2006) A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell*, 9 (5), 341-349.
11. Holbro, T., and Hynes N.E. (2004) ErbB Receptors: Directing key signaling networks throughout life. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 195-217.
12. Bae, J.H., and Schlessinger, J. (2010) Asymmetric tyrosine kinase arrangements in activation or autophosphorylation of receptor tyrosine kinases. *Mol. Cells*, 29, 443-448.
13. Choura, M., and Rebai, A. (2011) Receptor tyrosine kinases: from biology to pathology. *J Recept Signal Transduct Res.*, 31 (6), 387-394.
14. Lodish, H. (2003) *Molecular cell biology* (5th ed.)
15. Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A. (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocrine-Related Cancer*, 8 (3), 161–173.
16. Schlessinger, J., and Lemmon, M.A. (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE*, 191, re12.
17. Pawson, T. (2002) Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*, 38 Supple 5, 3-10.
18. Yarden, Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer*, 37, 3-8.
19. Bublil, E.M., and Yarden Y. (2007) The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Current Opinion in Cell Biology*, 19, 124-134.
20. Citri, A., and Yarden Y. (2006) EGF-ERBB signalling: towards the system level. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7 (7), 505-516.

21. Huang, L., De Baetselier, P., Beyaert, R. (2009) Targeting the EGF receptor ectodomain in the context of cancer. *Expert Opin Ther Targets.*, 13 (11), 1347-1361.
22. Holbro, T., Civenni, G., Hynes, N.E. (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research*, 284, 99-110.
23. Hynes, N.E., and MacDonald G. (2009) ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 177-184.
24. Marmor, M.D., Skaria, K.B., Yarden, Y. (2003) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 58 (3), 903-913.
25. Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., Hynes, N.E. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.*, 19, 3159–3167.
26. Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, A., Lluch, A. (2012) Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.*, 38 (6), 698-707.
27. Ghayad, S.E., and Cohen P.A. (2010) Inhibitors of PI3K/Akt/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients. *Anti-Cancer Drug Discovery*, 5, 29-57.
28. Bertos, N.R., and Park, M. (2011) Breast cancer - one term, many entities? *J Clin Invest.*, 121 (10), 3789-3796.
29. Miller, T.W., Balko, J.M., Arteaga, C.L. (2011) Phosphatidylinositol 3-kinase and antiestrogen resistance in breast cancer. *J Clin Oncol.*, 29 (33), 4452-4461.
30. Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Salomon D.S., (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, 366 (1), 2-16.

31. Amin, D.N., Campbell, M.R., Moasser, M.M. (2010) The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. *Semin Cell Dev Biol.*, 21 (9), 944-950.
32. Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A. (2002) Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med.*, 8 (1), 17-23.
33. Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S., Ullrich, A. (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer*, 8 (1), 11-31.
34. Eccles, S.A. (2011) The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int. J. Dev. Biol.*, 55, 685-696.
35. Han, W., and Lo, H.W. (2012) Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. *Cancer Lett.*, 318 (2), 124-134.
36. Moasser, M.M. (2007) The oncogene HER2; its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26 (45), 6469-6487.
37. Scaltriti, M. and Baselga, J. (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res.*, 12 (18), 5268-5272.
38. Barros, F.F.T., Powe, D.G., Ellis, I.O., Green, A.R. (2010) Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments. *Histopathology*, 56, 560-572.
39. Wiley, H.S., and Burke, P.M. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic.*, 2 (1), 12-18.
40. Baselga, J. and Swain, S.M. (2009) Novel anticancer targets: Revisiting ErbB2 and discovering ErbB3. *Nat Rev Cancer*, 9, 463-475.

41. Koutras, A.K., Fountzilas, G., Kalogeras, K.T., Starakis, I., Iconomou, G., Kalofonos, H.P. (2010) The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74, 73-78.
42. Carnero, A. (2010) The PKB/Akt pathway in cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 16, 34-44.
43. Fruman, D.A., Meyers, R.E., Cantley, L.C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*, 67, 481–507.
44. Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L., Vogt, P.K. (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*, 5 (12), 921-929.
45. Vogt, P.K., Hart, J.R., Gymnopoulos, M., Jiang, H., Kang, S., Bader, A.G., Zhao, L., Denley, A. (2011) Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K): The Oncoprotein. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 347, 79-104.
46. Hunter, T. (2000) Signaling—2000 and beyond. *Cell*, 100, 113–27.
47. Yu, J., Wjasow, C., Backer, J.M. (1998) Regulation of the p85/p110 α phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem*, 273 (46), 30199-30203.
48. Pawson, T. and Nash, P. (2000) Protein–protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev.*, 14, 1027–47.
49. Hernandez-Aya, L.F., and Gonzalez-Angulo, A.M. (2011) Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway in Breast Cancer. *The Oncologist*;16:404 – 414.
50. Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007) Akt/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell*, 129 (7), 1261-1274.

51. Vara, J.A.F., Casado, E., De Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M. (2004) PI3K/Akt signaling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 30, 193-204.
52. Zoncu, R., Efeyan, A., Sabatini D.M. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 12, 21-35.
53. Huang, J., and Manning B.D. (2009) A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.*, 37, 217-222.
54. Laplante, M., and Sabatini, D. (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149 (2), 274-293.
55. Chen, Y., Wang, B.C., Xiao, Y. (2011) PI3K: a potential therapeutic target for cancer. *J Cell Physiol.*, 227 (7), 2818-2821.
56. Jiang, B.H., and Liu, L.Z. (2009) PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1784 (1),150-158.
57. Song, M.S., Salmena, L., Pandolfi P.P. (2012) The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 13 (5), 283-296.
58. Pfeiler, G., Horn, F., Lattrich, C., Klappenberger, S., Ortmann, O., Treeck, O. (2007) Apoptotic effects of signal transduction inhibitors on human tumor cells with different PTEN expression. *Oncol Rep*, 18 (5), 1305-1309.
59. Dillon, R.L., White, D.E., Muller, W.J. (2007) The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene*, 26 (9), 1338-1345.
60. Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27 (41), 5497-5510.

61. Vivanco, I., Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2 (7), 489-501.
62. Engelman, J.A. (2009) Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*, 9 (8), 550-562.
63. Castaneda, C.A., Cortes-Funes, H., Gomez, H.L., Ciruelos, E.M. (2010) The phosphatidyl inositol 3-kinase/Akt signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 29, 751-759.
64. Adams, J.R. (2011) Elevated PI3K signaling drives multiple breast cancer subtypes. *Oncotarget*, 2 (6), 435-47.
65. Hynes, N.E., and Dey, J.H. (2009) PI3K inhibition overcomes trastuzumab resistance: blockade of ErbB2/ErbB3 is not always enough. *Cancer cell*, 15, 353-355
66. She, Q.B., Chandarlapaty, S., Ye, Q., Lobo, J., Haskell, K.M., Leander, K.R., DeFeo-Jones, D., Huber, H.E., Rosen, N. (2008) Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One*, 3 (8), e3065.
67. Baselga, J. (2011) Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *The Oncologist*, 16 (1), 12-19.
68. Hynes, N.E., and Lane, H.A. (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5 (5), 341-354.
69. Albanell, J., Rojo, F., Baselga, J. (2001) Pharmacodynamic studies with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839. *Semin Oncol.*, 28, 56-66.
70. Ciardiello, F., and Tortora, G. (2001) A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res.*, 7, 2958-2970.

71. Arteaga, C.L., Ramsey, T.T., Shawver, L.K., Guyer, C.A. (1997) Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site. *J Biol Chem.*, 272, 23247-23254.
72. Arteaga, C.L. (2003) ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res.*, 284, 122-130.
73. Rusnak, D.W., Affleck, K., Cockerill, S.G. (2001) The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: Potential therapy for cancer. *Cancer Res.*, 61, 7196-7203.
74. Bouchalova, K., Cizkova, M., Cwiertka, K., Trojanec, R., Friedecky, D., Hajduch, M. (2010) Lapatinib in breast cancer – the predictive significance of HER1 (EGFR), HER2, PTEN and PIK3CA genes and lapatinib plasma level assessment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 154 (4), 281-288.
75. Higgins, M.J., and Baselga, J. (2011) Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest.*, 121 (10), 3797-3803.
76. Wymann, M.P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M.J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M.D., Panayotou, G. (1996) Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell. Biol.*, 16 (4), 1722-1733.
77. Hu, L., Zaloudek, C., Mills, G.B., Gray, J., Jaffe, R.B. (2000) In Vivo and in Vitro Ovarian Carcinoma Growth Inhibition by a Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor (LY294002). *Clinical Cancer Research*, 6, 880-886.
78. Gills, J.J, Holbeck, S., Hollingshead, M., Hewitt, S.M., Kozikowski, A.P., Dennis, P.A. (2006) Spectrum of activity and molecular correlates of response to phosphatidylinositol ether lipid analogues, novel lipid-based inhibitors of Akt. *Mol Cancer Ther.*, 5, 713-722.

79. Zaytseva, Y.Y., Valentino, J.D., Gulhati, P., Evers, B.M. (2012) mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett.*, 319 (1), 1-7.
80. Del Bufalo, D., Ciuffreda, L., Trisciuglio, D., Desideri, M., Cognetti, F., Zupi, G., Milella, M. (2006) Antiangiogenic potential of the Mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer Res*, 66 (11), 5549-5554.
81. Coutte, L. (2011) PI3K-AKT-mTOR pathway and cancer. *Bull Cancer*, 99 (2), 173-180.
82. Milano, A., De Rosa, V., Iaffaioli, R.V., Caponigro, F. (2007) Downstream intracellular effectors of epidermal growth factor receptor as targets for anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 11 (6), 771-782.
83. Keniry, M., and Parsons, R. (2011) mTOR Inhibition, the Second Generation: ATP- Competitive mTOR Inhibitor Initiates Unexpected Receptor Tyrosine Kinase-Driven Feedback Loop. *Cancer Discovery*, 1, 203-204.
84. Miller, T.W., Rexer, B.N., Garrett, J.T., Arteaga, C.L. (2011) Mutations in the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role in tumor progression and therapeutic implications in breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 13 (6), 224.
85. Chandralapaty, S. (2012) Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer. *Cancer Discovery*, 2 (4), 311-319.
86. Raynaud, F.I., Eccles, S., Clarke, P.A., Hayes, A., Workman, P. (2007) Pharmacologic characterization of a potent inhibitor of class I phosphatidylinositide 3-kinases. *Cancer Res.*, 67 (12), 5840-5850.
87. Gedaly, R., Angulo, P., Hundley, J., Daily, M.F., Chen, C., Koch, A., Evers, B.M. (2010) PI-103 and sorafenib inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation by blocking Ras/Raf/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Anticancer Res.*, 30 (12), 4951-4958.

88. Park, S., Chapuis, N., Bardet, V., Tamburini, J., Bouscary, D. (2008) PI-103, a dual inhibitor of class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia*, 22 (9), 1698-1706.
89. Saxena, R., and Dwivedi, A. (2012) ErbB family receptor inhibitors as therapeutic agents in breast cancer: current status and future clinical perspective. *Med Res Rev.*, 32 (1), 166-215.
90. Callahan, R., and Hurvitz, S. (2011) Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: Current management of early, advanced, and recurrent disease. *Curr Opin Obstet Gynecol.*, 23 (1), 37-43.
91. Gallardo, A., Lerma, E., Escuin, D., Tibau, A., Munoz, J., Peiro, G. (2012) Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *British Journal of Cancer*, 106, 1367-1373.
92. Rosenzweig, S.A. (2012) Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases. *Biochem Pharmacol.*, 83 (8), 1041-1048.
93. Diermeier-Daucher, S., Breindl, S., Buchholz, S., Ortmann, O., Brockhoff, G. (2011) Modular anti-EGFR and anti-HER2 targeting of SK-BR-3 and BT474 breast cancer cell lines in the presence of ErbB receptor-specific growth factors. *Cytometry Part A*, 79A, 684-693.
94. Tsang, R.Y. and Finn, R.S. (2012) Beyond trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer*, 106 (1), 6-13.
95. Reid, A., Vidal, L., Shaw, D., De Bono, J. (2007) Dual inhibition of ErbB1 (EGFR/HER1) and ErbB2 (HER2/neu). *Eur J Cancer*, 43 (3), 481-489.

96. D'Alessio, A., De Luca, A., Maiello, M.R., Lamura, L., Normanno, N. (2010) Effects of the combined blockade of EGFR and ErbB-2 on signal transduction and regulation of cell cycle regulatory proteins in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 123 (2), 387-396.
97. Zhou, B.B., Fridman, J.S., Liu, X., Fridman, S.M., Newton, R.C., Scherle, P.A. (2005) ADAM proteases, ErbB pathways and cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 14 (6), 591-606.
98. Garrett, J.T., Olivares, M.G., Rinehart, C., Granja-Ingram, N.D., Sanchez, V., Chakrabarty, A., Cook, R.S., Manning, H.C., Arteaga, C.L. ve diğerleri (2011) Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase. *PNAS*, 108 (12), 5021-5026.
99. Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Cohen, P. (1997) Characterization of a 3 phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B/alpha. *Curr Biol*, 7 (4), 261-269.
100. Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V.M., Hess, D., Hemmings, B.A., Barford, D. (2002) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol. Cell*, 9 (6), 1227-1240
101. Torbett, N.E., Luna-Moran, A., Knight, Z.A., Houk, A., Moasser, M., Weiss, W., Shokat, K.M., Stokoe, D. (2008) A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. *Biochem. J.*, 415 (1), 97-110.
102. Chakrabarty, A., Sanchez, V., Kuba, M.G., Rinehart, C., Arteaga, C.L. (2012) Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors. *PNAS*, 109 (8), 2718-2723.

103. Turke, A.B., Song, Y., Costa, C., Cook, R., Arteaga, C.L., Asara, J.M., Engelman, J.A. (2012) MEK inhibition leads to PI3K/Akt activation by relieving a negative feedback on ErbB receptors. *Cancer Research*, 72 (13), 3228-3237.
104. Serra, V., Scaltriti, M., Prudkin, L., Eichhorn, P.J.A., Ibrahim, Y.H., Chandarlapaty, S., Baselga, J. ve diğeri (2011) PI3K inhibition results in enhanced HER signaling and acquired ERK dependency in HER2-overexpressing breast cancer. *Oncogene*, 30, 2547-2557.