

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA IP3
KİNAZ SİNYAL YOLAĞININ ÖNEMİ**

İMGE KUNTER

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA IP3
KİNAZ SİNYAL YOLAĞININ ÖNEMİ**

İMGE KUNTER

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

2007

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA IP3 KİNAZ
SİNYAL YOLAĞININ ÖNEMİ**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İMGE KUNTER

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. ESRA ERDAL

Bu araştırma Tübitak SBAG tarafından 102S092 numaralı proje ile ve
Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından DEU
2005.KB.SAG.8 sayı ile desteklenmiştir.

“**Hepatoselüler Karsinomada IP3 Kinaz Sinyal Yolağının Önemi**” isimli bu tez 01.24.2007 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Esra ERDAL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Meral SAKIZLI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Neşe ATABEY

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Özgül SAĞOL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sedat KARADEMİR

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Yedek Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

Yedek Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Zeynep SERCAN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa no |
|----------------------------|-----------------|
| Teşekkür..... | v |
| Tablo Listesi..... | vi |
| Şekil Listesi..... | viii |
| Kısaltmalar..... | ix |
| ÖZET | x |
| ABSTRACT | xi |
| GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |

BÖLÜM 1.GENEL BİLGİLER.....3

| | |
|--|-----------|
| 1.1. Hepatosellüler Karsinoma | 3 |
| 1.1.1.Hepatokarsinogenezin Aşamaları ve Genetik Mekanizması | 4 |
| 1.1.2 HCC'deki Genetik ve Epigenetik Değişiklikler..... | 6 |
| 1.1.3.Genetik ve Epigenetik Değişikliklerden Etkilenen Sinyal Yolakları ve Karsinogenez Sürecindeki Rollerini..... | 8 |
| 1.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağı | 10 |
| 1.2.1. IP3K/Akt Sinyal Yolağı | 10 |
| 1.2.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağı Aktivasyonu..... | 12 |
| 1.2.3. PI3K/Akt Sinyal Yolağı Aktivasyonunun Hücre Davranışlarındaki Rolü..... | 13 |
| 1.2.4. PI3K-Akt Sinyal Yolağı ve Kanser..... | 15 |
| 1.2.5. PI3K/Akt İnhibisyonunun Kanser Tedavisinde Kullanımı..... | 16 |

| | |
|---|-----------|
| BÖLÜM 2. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 19 |
| 2.1. HCC Hücre Dizileri..... | 19 |
| 2.2. Hücre Kültürü..... | 19 |
| 2.2.1. Hücrelerin İdame Ettirilmesi..... | 19 |
| 2.2.2. Büyüme Faktörü Uyarımı..... | 20 |
| 2.2.3. Hücrelerin Dondurulup- Çözülmesi..... | 20 |
| 2.3. Western Blotlama | 21 |
| 2.3.1. Kültür Hücrelerinden Total Protein İzolasyonu | 21 |
| 2.3.2. Protein miktar tayini | 22 |
| 2.3.3. SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi | 23 |
| 2.3.4. Proteinlerin Katı Bir Yüzeye Transferi..... | 26 |
| 2.3.5. İmmünoblotlama..... | 27 |
| 2.4. BrdU İnkooperasyonu ile Hücre Proliferasyonun Tespiti..... | 27 |
| 2.5. MTT testi ile Hücre Canlılık Analizi..... | 29 |
| 2.6. LDH testi ile Hücre Ölümü Analizi..... | 29 |
| 2.7. FACS ile Hücre Döngüsü Analizi..... | 29 |
| 2.8. İmmünoboyama | 30 |
| 2.9. Yara İyileşmesi Testi ile Hücre Hareketliliğinin Tespiti..... | 31 |

BÖLÜM 3. BULGULAR33

| | |
|--|-----------|
| 3.1. HCC Hücre Dizilerinde Kendiliğinden aktif PI3K/AKT Yolağının Belirlenmesi..... | 33 |
| 3.1.1. Serum Açlığı Koşullarında Üretilen Hücrelerde Bazal P-Akt proteininin Varlığı | 33 |
| 3.2. HCC Hücre Dizilerinde Serum ya da Büyüme Faktörleri ile PI3K/Akt Sinyal Yolağının Uyarılması..... | 34 |
| 3.2.1. Serum İçeren Koşullarda Üretilen Hücrelerde P-Akt Proteinin Varlığı..... | 34 |
| 3.2.2. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) Uyarılması ile PI3K/Akt Aktivasyonu..... | 36 |
| 3.2.3. Mahlavu ve SNU-449 Hücrelerinde HGF ya da Epidermal Büyüme Faktörüyle (EGF) uyarılması ile IP3K/Akt Aktivasyonu..... | 38 |
| 3.3. PI3K/AKT yolağının özgün inhibitör, LY294002 ile baskılanması.... | 39 |
| 3.3.1. Mahlavu Hücrelerinde Doza Bağımlı Olarak P-Akt Düzeyinde Azalma..... | 39 |
| 3.3.2. Bazal ve HGF ile Uyarılarak PI3K/Akt Sinyal Yolağı Artırılmış Huh-7 ve SNU-449 Hücrelerinde LY294002 Kullanılarak P-Akt Düzeyinin Azaltılması | 40 |
| 3.4. PI3K/AKT Yolağının Özgün İnhibitör, LY294002 ile Baskılanmasının Hücre Biyolojik Davranışları Üzerine Etkileri | 41 |
| 3.4.1. PI3K/Akt İnhibisyonunun HCC Hücrelerinde Proliferasyonu Farklı Düzeylerde Azaltması..... | 41 |
| 3.4.2. PI3K/Akt İnhibisyonunun Mahlavu Hücrelerini G1 Evresinde Durdurması..... | 43 |
| 3.4.3. PI3K/Akt İnhibisyonunun SNU449 Hücrelerinde Doz Bağımlı Olarak Canlılığı Azaltması..... | 44 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.4. PI3K/Akt İnhibisyonunun SNU449 Hücrelerinde Doz Bağımlı Olarak Hücre Ölümünü Artırması..... | 45 |
| 3.4.5. PI3K/Akt Yolağının Hücre Hareketliliğine Etkisi..... | 46 |
| BÖLÜM 4. TARTIŞMA | 50 |
| BÖLÜM 5. SONUÇLAR..... | 53 |
| BÖLÜM 5. KAYNAKLAR..... | 56 |

TEŞEKKÜR:

Ben **İmge Kunter**;

Her şeyden önce **anne ve babama** her zaman bana destek oldukları, emek verip sabırlı olmayı öğrettikleri, ilk deneylerimi sekiz yaşında benimle beraber yaptıkları, içine bakmak için öldürdüğüm kuşların ve otopsi yapmak için akvaryum termostatını kapatıp kaynattığım Japon balıklarının hesabını sormadıkları için, sorduğum her sorunun bir yanıtı olduğunu ve buna ulaşmanın yolunun benden geçtiğini her fırsatta tekrarladıkları için, iyi bir aşçı olmak yolunda yaptığın tüm kötü yemek ve tatlıları iştahla yedikleri için,

Tez ve hayat danışmanım **Yrd. Doç. Dr. Esra Erdal'a**, sadece öğretmenim değil ablam da olduğu, desteğini ve güvenini hep hissettiğim için

Bilimsel ve manevi desteğine her fırsatta başvurduğum **Prof. Dr. Neşe Atabey'e** tüm yardımlarından dolayı

Arkadaşım **Dr. Aslı Toylu' ya** dostluğu ve deneyimlerini paylaştığı için

Sadece arkadaşım değil kız kardeşim, annem, çalışma arkadaşım **Sanem Tercan Avcı' ya** hep olumlu olduğu, laboratuvar yardımları ve özellikle akşam yemekleri için

Arkadaşım **Emine Çelik' e** teknik desteği, küçük molalarımız ve kocaman gülümsemesi için

Arkadaşım **Sait Tümer'e** abim olmaktan hiç vazgeçmediği için

Gadimicilerime, dünyanın diğer ucundan yanımda oldukları ve koşulsuz destekleri için

Tosbiğime, bana hep uğurlu geldiği için

Sonsuz teşekkürler :)

TABLO LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 1.1. Farklı sinyal yollarındaki genlerin HCC'deki değişimi..... | 9 |
| Tablo 2.1. Tezde kullanılan hücre dizileri..... | 19 |
| Tablo 2.2. SDS-PAGE ayırlama jel bileşenleri | 24 |
| Tablo 2.3. SDS-PAGE istifleme jeli bileşenleri | 24 |
| Tablo 2.4. SDS-PAGE ayırlama etkinliği..... | 24 |
| Tablo 2.5. Kullanılan antikolar ve dilüsyonları..... | 27 |
| Tablo.3.1 Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağı aktivasyonu ve farklılaşma dereceleri..... | 38 |
| Tablo 3.2. Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde IP3K/Akt sinyal yolağı aktivasyonu ve hücre motilitesi | 46 |
| Tablo 5.1. Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde IP3K/Akt sinyal yolağı aktivasyonu inhibisyonu ve inhibisyonun hücre büyümesine etkisi | 54 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1.1 HCC' malignant fenotipin oluşumu | 3 |
| Şekil 1.2 Hepatokarsinogenez sürecinde HBV, HCV, aflatoksin ve alkolün rolü.... | 6 |
| Şekil. 1.3 Fosfatidil inozitolun moleküler formülü..... | 11 |
| Şekil 1.4 PKB/Akt izoformlarının bölgesel yapıları | 11 |
| Şekil 1.5 PI3K/Akt'ın yönlendirdiği biyolojik fonksiyonlar..... | 12 |
| Şekil 1.6 LY294002'nin moleküler yapısı..... | 18 |
| Şekil 1.7 Wortmannin'in moleküler yapısı..... | 18 |
| Şekil 3.1 Serumsuz ortamda HCC hücre hatlarında P-Akt protein seviyesi | 33 |
| Şekil 3.2 %10 FCS' li ortamda HCC hücre hatlarında P-Akt protein seviyesi..... | 34 |
| Şekil 3.3 SK-Hep1 hücrelerinde serum varlığında P-Akt immunoboyaması..... | 35 |
| Şekil 3.4 Mahlavu hücrelerinde serum varlığında P-Akt immunoboyaması | 36 |
| Şekil 3.5 Farklı koşullarda üretilen HCC hücre dizilerinde PI3K/Akt yolağı aktivasyonu | 37 |
| Şekil 3.6. Mahlavu ve SNU-449 hücre dizilerinde FCS, HGF ve EGF'in P-Akt protein miktarı üzerine etkisi..... | 39 |
| Şekil 3.7 Mahlavu hücre dizisinde LY294002'nin P-Akt seviyesi üzerine doz bağımlı etkisi..... | 40 |
| Şekil 3.8 Huh7 ve SNU-449 hücre dizilerinde LY294002 ve HGF'in ayrı ayrı ve birlikte P-Akt üzerine etkileri..... | 41 |
| Şekil 3.9 Serum varlığında 24 Saatlik 25µm LY294002 inhibisyonunun hücre proliferasyonuna etkisi..... | 42 |
| Şekil 3.10 Serum varlığında 48 Saatlik 25µM LY294002 inhibisyonunun hücre proliferasyonuna etkisi..... | 42 |
| Şekil 3.11 Serum varlığında üretilen Mahlavu hücrelerinde LY294002'nin 24 saatte hücre döngüsü üzerine etkileri..... | 43 |
| Şekil 3.12 Serum varlığında üretilen Mahlavu hücre dizisinde LY294002'nin 48 saatte hücre döngüsü üzerine etkileri | 43 |
| Şekil 3.13 Serum varlığında üretilen SNU-449 hücrelerinde LY294002'nin farklı dozlarda canlılık üzerine etkisi..... | 44 |

| | |
|---|----|
| Şekil 3.14 Serum varlığında üretilen SNU-449 hücre dizisinde LY294002'nin farklı dozlarda hücre ölümü üzerine etkisi..... | 45 |
| Şekil 3.15 SNU-475 hücre dizisinde 25µM LY294002 yara iyileşmesini üzerine etkisi. | 47 |
| Şekil 3.16 SKHep-1 ve SNU449 hücre dizilerinde serum ve HGF ve HGF ile birlikte 25µM LY294002 varlığının yara iyileşmesini üzerine etkisi..... | 49 |

KISALTMALAR

- EGF: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)**
HGF: Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)
PKB: Protein Kinase B (Prteoin Kinaz B)
HCC: Hepatocellular carcinoma (Hepatosellüler Karsinoma)
HBV: Hepatitis B Virus (Hepatit B Virüsü)
HCV: Hepatitis C Virus (Hepatit C Virüsü)
pRB: Retinoblastoma Protein (Retinoblastom Proteini)
BSA: Bovine Serum Albumine (Dana Serumu Albumini)
SDS: Sodium Dodesil Sulphate (Sodyum Dodesil Sülfat)
NaF: Sodium Floride (Sodyum Florid)
Na₃VO₄: Sodium ortho-vanadate (Sodyum Orto vanadat)
BCA: Bi-cincronic acid (Bi Sinkronik Asid)
NaCl: Sodium Cloride (Sodyum Klorür)
PMSF: Phenyl-methyl-Sulphonyl (Fenil metil sülfonil)
PI3K: Phosphatidyl-inositol 3 Kinase (Fosfatidil İnozitol 3 Kinaz)
PBS: Phosphate Buffer Saline (Fosfat Saline Tamponu)
FCS: Fetal Calf Serum (Fötal Sığır Serumu)
FBS: Fetal Bovine Serum (Fötal Dana Serumu)
DMEM: Duplecco's Modified Eagles Medium (Dublecco modifiye kültür ortamı)
TEMED: N,N,N,N Tetramethyl-1,2 diaminoethane
SDS-PAGE: SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
HRP: Horse Reddish Peroksidase
AC: Adenecarcinoma (Adenokarsinoma)
PFA: Paraformaldehyde (Paraformaldehit)
SDS-PAGE: SDS Poliacrilamide Gel Electrophoresis (SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi)
DMSO: Dimethyl Sulfoxide (dimetil sülfoksit)
PVDF: Polyvinylidene fluoride (Polivinil diflorür)
TBS: Tris-buffered saline (Tris tuz tamponu)
LDH: Lactate dehydrogenase (laktat dehidrogenaz)
CDK: Cyclin Dependent Kinase (siklin bağımlı kinaz)

GİRİŞ VE AMAÇ:

Fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K) fosfoinozitol-3,4,5-trifostatı (PI(-3,4,5)P₃) meydana getiren; hücrede proliferasyon, apoptoz, sitoskelet elemanlarının düzenlenmesi ve büyüme gibi sistemleri düzenleyen bir lipid kinazdır. PI(-3,4,5)P₃, Akt proteininin fosfoinozitol bağımlı kinaz 1 (PDK1) ve PDK2 tarafından fosforillenerek aktif hale getirildiği plazma membranına göçünü sağlayan bir ikincil mesajcıdır. Akt proteininin aktif hale geldiği, PI3K'in aktivasyonunu sağlayan mutasyonlar çeşitli kanser türlerinde görülmüştür. (19, 20).

Akt, PKB olarak da isimlendirilen 57 kD ağırlığında, viral onkoprotein v-Akt proteininin homoloğu olan bir Ser/Thr kinazdır. Akt'ın aktiflenmesi proliferasyon ve sağ kalım gibi çeşitli hücre fonksiyonlarda önemli bir yere sahiptir. PI3K-Akt sinyal yolağı birçok hücre uyarımıyla düzenlenip, transkripsiyon, translasyon, çoğalma, büyüme ve sağ kalım gibi önemli hücre fonksiyonları düzenler. (18,19). PI3K/Akt sinyal yolağı, hücre sağ kalımı ve proliferasyonu üzerindeki etkisine bağlı olarak tümör gelişiminde de önemli bir yere sahiptir. Çeşitli kanser tiplerinde, Akt onkogeninin aşırı ekspresyonuna veya amplifikasyonlarına rastlanmıştır.

Günümüzde dünyadaki kanser ölümlerinin %53 ünü oluşturan hepatosellüler karsinoma(HCC), yılda 500,000 ölümlle dünyada beşinci sıradaki kanser türüdür. HCC'nin moleküler patogeneziyle ilgili birçok bilinmeyen vardır. HCC'nin erken tanı ve tedavisi için bu kanser türünün ortaya çıkmasına ve gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. HCC'de hücre çoğalmasının kontrolsüz aktivasyonunu sağlayabilecek IGF döngüsü bozukluklarına (36, 37), PI3K inhibitörü olan pTEN mutasyonları (9), delesyon ve promotör aktivitesi kayıplarına (9, 10, 11, 12, 13, 14) rastlanması bu yolağın hepatokarsinogenez sürecindeki önemine işaret etmektedir. Ayrıca tedavi amaçlı rezeksiyon sonrasında PKB/Akt aktivasyonunun göstergesi olan Akt fosforilasyonu varlığının rekürrens için önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (38).

Bu çalışmada temel olarak HCC hücre dizilerinde PI3K/Akt sinyal yolağının önemini aydınlatmak amaçlanmıştır. Bu bağlamda çalışmamızda HCC hücre hatlarında PI3K/Akt yolağının aktif olup olmadığının belirlenmesi ve bu yolağın inhibisyonu ile kanser hücre davranışlarının nasıl etkileneceğinin anlaşılması hedeflenmiştir.

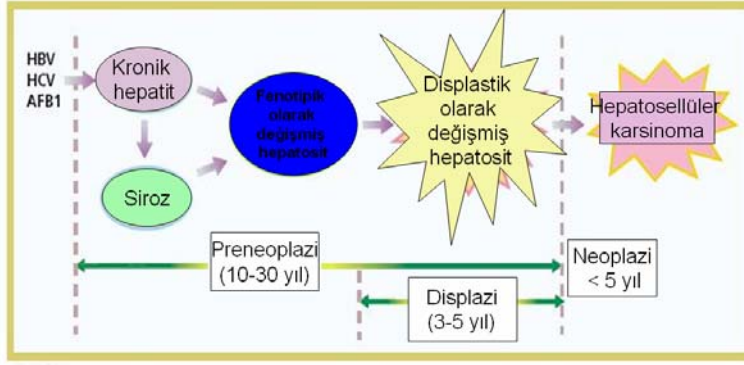
GENEL BİLGİLER

1.1. Hepatosellüler Karsinoma

Günümüzde dünyadaki kanser ölümlerinin %53 ünü oluşturan hepatosellüler karsinoma, yılda 500,000 ölümlle dünyada beşinci sıradaki neoplazm yapan hastalıktır (1). Asya ve Afrika'da ölümlerin majör sebebi olmakla beraber batıda rastlanma oranı gittikçe artmakta olduğundan, moleküler patogenezi, epidemiyolojisi ve tedavisi dikkat çekmeye başlamıştır. HCC'nin coğrafik olarak görülme sıklığının farkı, risk faktörleriyle karşılaşmanın heterojenliğinden ileri gelir. Bu risk faktörleri majör risk faktörleri olarak özetleyebileceğimiz siroz ve hepatit B (HBV), hepatit C (HCV), mikotoksin, aflatoksin, alkol ve minör risk faktörlerinden sigara kullanımı, aşırı demir alımı, hemokromatozistir (1, 2, 3, 4).

HCC hızlı gelişen ve ölümcül bir hastalıktır. Erken tanı ve cerrahi operasyon yüksek oranda başarılı olduğu halde, zamanında teşhis yapılamadığından karaciğer yetmezliğinden ölüm gerçekleşmektedir (2).

HCC tümör görülmesi ve tümörün progresyonuyla ilişkili birçok gen ekspresyonunun değişimiyle ilgili multistep bir süreçtir (3). Hepatokarsinogenez olarak isimlendirilen bu süreçte hepatosellüler karsinoma fenotipini oluşturan değişiklikler yavaş bir süreçte gerçekleşmektedir. Bu preneoplastik oluşum basamağında mitojenik yolların aktiflenmesinin, kronik hepatit, siroz veya ikisini birden taşıyan karaciğer dokusunun hücre yenilenmesini artırdığı biliniyor. Bu yenilenme telomeraz ekspresyonu artmış, mikrosatellit instabilitesi barındıran, kromozomal ve gen düzeyinde yapısal dengesizlikler içeren monoklonal populasyonun artmasını sağlamaktadır (5, 6). Gen ekspresyonlarının preneoplastik değişimi, DNA metilasyonu değişimlerinden, HCV ve HBV'nun etkisinden, nokta mutasyonları ve heterozigosite kayıplarından (LOH, loss of heterozygosity) ileri gelmektedir (3). Bu şekilde odaklar ve nodüller oluşturan displastik hepatositlerde, geri dönüşümsüz yapısal değişimlerin birikmesinin malignant fenotipi artırıp ve HCC ye doğru hücresel değişimi yönlendirdiği düşünülmektedir (Şekil 1.). HCC'nin farklı histopatolojik alt türlerinin ise farklı düzenleyici yollarla ilgili genlerin yapı ve işlevlerinin bozulmasıyla ilgili olduğuna inanılmaktadır (6).



Şekil 1.1. HCC' malignant fenotipin oluşumu

1.1.1. Hepatokarsinogenezin Aşamaları ve Genetik Mekanizması

Viral yollarla, aflatoksinle veya alkolle indüklenmiş hepatokarsinogenez sürecinde önemli olan temel basamaklar tüm karsinogenez süreçlerinde olduğu gibi hücreye yaşama avantajı kazandıran limitsiz bölünme, apoptozdan kaçma, angiogenez yapabilme özelliklerini kazandıran genetik ve epigenetik değişimlerdir. (3,5)

Hepatokarsinogenez sürecinde gerçekleşen değişimler birçok önemli sinyal yollarının bağlantılı genlerin değişmesine sebep olur. Yapılan çalışmalarda büyüme, hücre döngüsü, apoptoz, metastaz, sinyal iletimi, metabolizma gibi çeşitli süreçte yer alan genlerin ekspresyon artış ve azalışları bulunmuştur (3, 4, 5).

HBV ve HCV, aflatoksin ve kronik alkol alımı hepatokarsinogenez sürecini indükleyebilen majör sebeplerdendir (5).

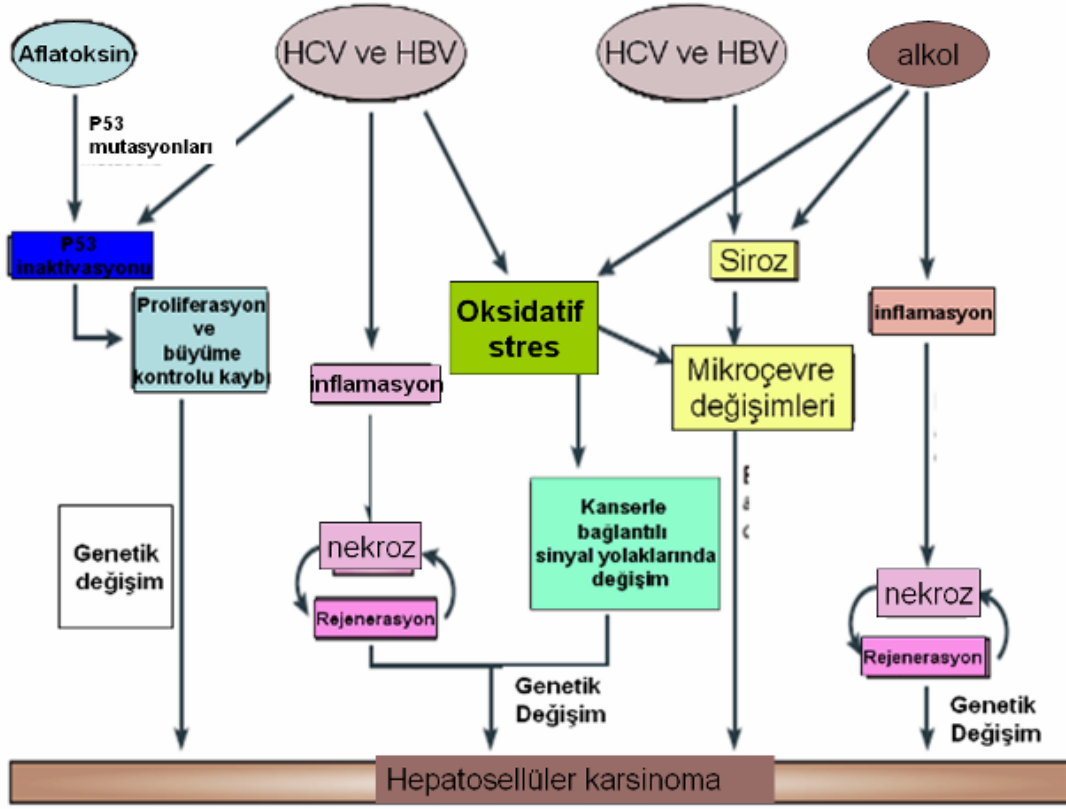
Hepatokarsinogenezde HBV'nin rolü: HBV hepadnaviridae ailesinden, sitopatik olmayan, çift iplikli, hepatotropik bir DNA virüsüdür. HBV genomunun kodladığı birçok viral protein hücre yaşam döngüsü için önemlidir, aynı zamanda HBV genomu HCC'de çok önemli olmakla beraber işlevi tam olarak anlaşılammış HBx proteinini de kodlar. HBV genomunun konakçı DNA'sına entegrasyonu kanserle ilişkili genlerde(TERT, PDGFR β , MAPK1) mikrolelesyonlara sebep olurken, HBx proteini hücre çoğalmasıyla ilişkili genlerin(Ras, SRC, Raf, MAPK, ERK, JNK) ekspresyonlarını değiştirir (5). HBxAg in aynı zamanda premalignant proliferatif nodüllerde IGF2, HCC de IGFR ekspresyonlarını aktive ederken, bazı HCC'lerde ras/raf/MAPK ve NF kappa-B yolağını aktive ederek hücre çoğalmasını aktiflerken, antiapoptotik bir protein olan dynein ekspresyonunu artırdığı, Rho B

ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir. HCC ile ilişkili ölümlerin %30-50 si HBV bağımlıdır (3, 4).

Hepatokarsinogeneizde HCV'nin rolü: HCC'de rastlanan diğer önemli virüslerden biri olan HCV flaviviriadae ailesinden, nonsitopatik bir virüstür. Bir RNA virusudur ve genoma entegre olmaz fakat kendi genomunun kodladığı proteinlerden olan NS5A, p53 e bağlanarak işlevini durdurur (5). HCV nin çekirdek proteininin ve 5A yapısıl proteininin trans aktivasyon özelliği vardır. Çekirdek proteini c-myc ekspresyonunu artırırken 5A p21 ekspresyonunu azaltır. Hem ekirdek hem de NS5A proteinleri Wnt-βcat mutasyonlarına ve aşırı ekspresyonlarına sebep olurken, NS5A PI3K'a da bağlanarak onu ve sinyal yolağında altındaki PKB/Akt proteinini ve Akt'a bağlı sağ kalım sinyallerini aktifler. (7) Aynı zamanda HCV ekirdek proteini reaktif oksijen radikallerini indükler ve HCC gelişimini oksidatif stres mekanizması aracılığıyla destekler (3, 4, 7).

Hepatokarsinogeneizde alkolün rolü: Kronik alkol tüketimi dolaşımdaki endotoksin konsantrasyonunu artırarak kpffer hücrelerini aktive edip kemokin ve sitokin salınımını uyarır. Bu da kronik hepatosit yenilenmesini, stellate hücrelerinin aktivasyonunu, sirozu ve HCC'yi uyarır. Alkol aynı zamanda fibroz ve siroza öncülük eden oksidatif stres mekanizmasını da uyarmaktadır (5).

Hepatokarsinogeneizde Aflatoksin-B1 rolü: Spesifik P53 mutasyonu ve HRAS gibi onkogenleri aktive ettiği bilinmesinin yanında siroz ve HCC oluşumunda HBV, HCV ve alkol gibi kesin bir bağlantısı bulunamamıştır (5).



Şekil 1.2 Hepatokarsinogenez sürecinde HBV, HCV, aflatoksin ve alkolün rolü(5)

1.1.2. HCC'deki Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

HCC'nin moleküler analizlerinde p53, β -katenin (β -cat), ErbB reseptör ailesi üyeleri, MET ve ligantı HGF, p16, E-kadherin, ve COX2 gibi onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin yeniden düzenlenmeleriyle ilgili birçok genetik ve epigenetik değişiklikler görülmüştür (4, 6 7, 8).

P53: HBV ve HCV bağımlı HCC'lerde %43, rejeneratif nodüllerde % 7 p53 inaktivasyonu görülmüştür (5). HCC'lerde 17p13 DNA bağlanma bölgesinde missence mutasyon vardır. HCC tümörlerinin % 25-60' ında 17p13 de LOH görülmüştür. 17 p LOH leri ise mutasyon olmayan allelde görülür. AFB1 de bu gen üzerinde 249. bazda mutasyona sebep olur. p53 geni üzerinde 249. bazında Arg den Ser e dönüşümünü sağlayan mutasyon diğer kanser türlerinde görülmez. HCC'de geç tümör evrelerinde p53 mutasyonu ile Rb geni kaybı (LOH 13q) arasında ilişki bulunmuştur. Kronik HBV enfeksiyonunda HBxAg nin

negatif büyüme regülatörü p53'e ve p53'e bağlanıp fonksiyonel olarak onu inaktive ettiği gösterilmiştir. Bu p53'ün baskıladığı alfa-fetoproteininin HCClerin %80'inde artmış olmasını da açıklar. p53'ün HBxAg tarafından inaktive edilmesi wnt yolağını uyarır (3, 4).

β-katenin: Karaciğer tümörlerin %30-40'ında β-cat aksin geni mutanttır veya ekspresyonu artmıştır. Aksin β-cat'e bağlanamayınca, β-cat birikip nükleusa gider ve Tcf ailesindeki transkripsiyon faktörlerini uyararak kanserle bağlantılı MYC, cycD1, COX-2, MMP-7 gibi genleri aktive eder (5). HCCnin erken evrelerinde görülen β-cat mutasyonu tümör transformasyonunda hücre-hücre ilişkisinde değişim olduğunun bir göstergesidir. β-cat mutasyonu fibrozis ve sirozis oluşumunda önemli yere sahiptir.

Erb reseptör ailesi: HCClerin %68'inde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), %84'ünde ErbB ailesi reseptör tirozin kinazı 3 (ERBB3), %21'inde ERBB2 (HER2), %61'inde ERBB4 aşırı ekspresyonu görülmüş. ERBB3 ve ERBB1 aşırı ekspresyonu yüksek proliferasyon indeksi, metastaz, tümör büyüklüğü ile karakterize agresif fenotiple birliktelik gösterir (5).

E-kadherin: E-kadherin (E-cad) genini içeren 16q heterozigosite kaybı (LOH) tümör ilerlemesi ve metastazıyla bağlantılıdır.

RB: %25-48 HCC vakasında Rb lokusunda LOH kaybı gözlenir, Rb ekspresyonu %30-40 downregüle olmuştur. Retinoblastomanın yıkılması ve metilasyon aracılıklı p16 susturulmasıyla Rb yolağı rahatsız edilir (4, 5).

PTEN: %17-27 HCC vakasında 10q kromozom kolunun kayıp olması 10q23 bölgesinde lokalize PTEN'in HCC'de rol oynadığına bir kanıttır. Somatik, missense, çerçeve kayması ve splice bölgesi mutasyonları, promotör aktivite kayıpları bazı HCC vakalarında görülmüştür (9, 10, 11, 12, 13, 14).

Telomeraz: Birçok HCC vakasında telomeraz aktivitesinin yeniden kazanıldığı ve telomer boylarının değiştiiği gösterilmiştir. Hatta birçok kanserde olduğu gibi HCC'de de telomeraz aktivitesinin izlenmesi erken kanser tanısı için bir belirteç olarak kullanılabilir (15).

P21: Yapılan çalışmalarda %40 HCC vakasında p21 ekspresyonunun azaldığı ve bu ekspresyon azalmasının p53 mutasyonu ve düşük ekspresyonuyla paralellik gösterdiği bulunmuştur (15).

1.1.3 Genetik ve Epigenetik Değişikliklerden Etkilenen Sinyal Yolakları Karsinogenez Sürecindeki Roller

Büyüme Faktörleriyle regüle edilen sinyal yolakları: Büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, reseptörün altındaki sinyal yolağı bileşenlerinin yeniden düzenlenmesi hepatokarsinogenez sürecinde önemli bir yere sahiptir. Tümör hücrelerinde, özellikle insülin benzeri büyüme faktörü ve reseptörü (IGF/IGF-1R), hepatosit büyüme faktörü ve reseptörü (HGF-MET), Wnt ve reseptörü FRZ, transforme edici büyüme faktörü α ve epidermal büyüme faktörü reseptörü(TGF α /EGFR), transforme edici büyüme faktörü β ve reseptörü (TGF β /T β R) ve bunlarla ilgili sinyal yolakları proliferasyonu, apoptoz engelleyici mekanizmaya ve invazif davranışa katkıda bulunur. Bu büyüme faktörü reseptörleri, treonin reseptörü ve serin-threonin reseptörüdür. Meydana gelen fonksiyonel etkiler birçok sinyal mekanizması arasında etkileşime sebep olur ve tümörle ilgili çeşitli faktörleri etkiler. Bu sinyal yollarının etkileştiği yolaklardan en önemlilerinden biride sağ kalım, apoptoz, proliferasyon ve çeşitli genlerin transkripsiyonuyla ilgili PI3K/Akt yolağıdır. Farklı sinyal yolaklarındaki genlerin HCC'deki değişimi aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo1.) (16, 17).

Tablo 1.1. Farklı sinyal yollarındaki genlerin HCC'deki değişimi (16)

| | | |
|--------------|----------------|--|
| IGF | IGF-II | Ekspresyonu %16-40 artmış |
| | IRS-I | Ekspresyonu %100 artmış |
| | IRS-II | Ekspresyonu %86 artmış |
| HGF | HGF | Stellate hücrelerince eksprese |
| | MET | Ekspresyonu %20-48 artmış |
| TGF α | TGF α | İdrarda %60-80 artmış HCC'de ekspresyonu %80 artmış |
| | HB-EGF/ EGFR | Ekspresyonu %59-100 artmış |
| | Her1 Her2/neu | Ekspresyonu %0-30 artmış |
| | Her3 | Ekspresyonu %84 artmış |
| | Her4 | Ekspresyonu %61 artmış |
| Wnt | B-katenin | Nükleer birikimi artmış %17-40 |
| | Aksin-1 | %5-14 Mutasyonu var |
| | Aksin-2 | %3-10 Mutasyonu var |
| | PIN1 | Ekspresyonu %50 artmış |
| | FRZ-7 | Ekspresyonu %90 artmış |
| | HDPR1 | Ekspresyonu %58 azalmış |
| TGF β | TGF β | Ekspresyonu %40 artmış |
| | T β R-I | Ekspresyonu %80 artmış |
| | T β R-II | Ekspresyonu %37-70 azalmış |
| | Smad2 | %3 Mutasyonu var |
| | Smad4 | Ekspresyonu %10 azalmış %6 Mutasyonu var |
| | Smad7 | Ekspresyonu %60 artmış |

Birçok insan kanserinde hücre yüzeyindeki reseptörlerin aşırı ekspresyonu veya devamlı olarak aktive olması, reseptörün altındaki sinyal yolağının aktive olması sonucunu doğurur. ErbB2 reseptörü meme ve birçok diğer kanser çeşidinde gen çoğalması sonucunda aşırı

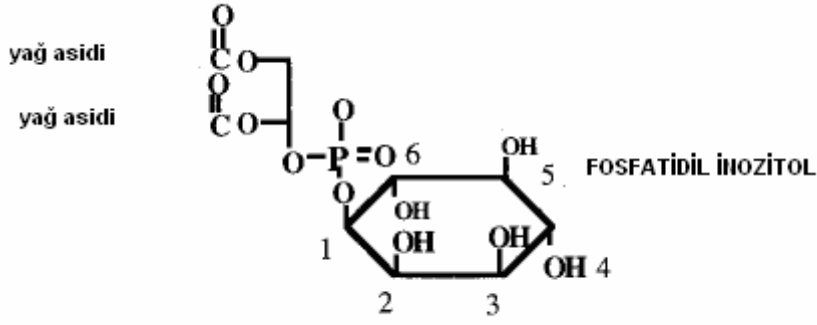
eksprese olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. ErbB2, erbB ailesinin diğer üyeleriyle birleşerek, hücre büyümesi, invazyon ve anti apoptoz gibi birçok sinyal yolağının aktivatörü olan heterodimerleri oluşturur. ErbB2-erbB3 dimeri, PI3K'in P85 alt ünitesinin SH2 bölgesine bağlanabilen 7 adet fosforillenebilir tirozin artığı içerdiğinden tümör hücrelerinde PI3K-Akt sinyal yolağını şiddetli şekilde aktive eder (18).

1.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağı

1.2.1. PI3K/Akt Sinyal Yolağı

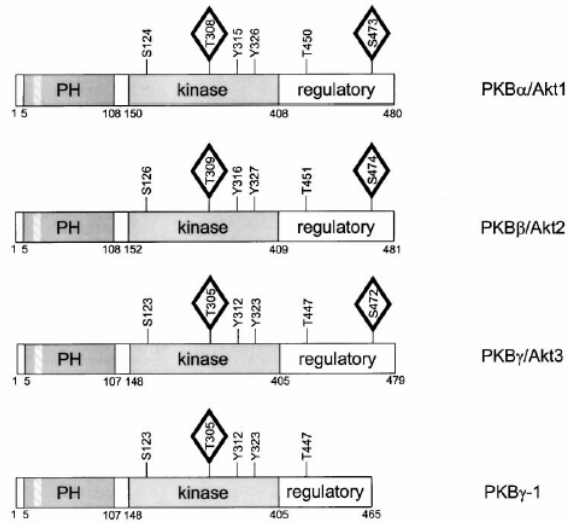
Fosfoinozitol-3-kinaz (PI3K) fosfoinozitol-3,4,5-trifostatı ($PI(-3,4,5)P_3$) meydana getiren bir lipid kinazdır. Proliferasyon, apoptoz, sitoskelet elemanlarının düzenlenmesi ve büyüme gibi sistemleri düzenler. $PI(-3,4,5)P_3$ Akt'ın fosfoinozitol bağımlı kinaz 1 (PDK1) ve PDK2 tarafından fosforillenip aktiflendiği plazma membranına göçünü sağlayan bir ikincil mesajcıdır (19, 20).

PI3K enzimleri yapısal ve fonksiyonel olarak I, II, III olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar, memelilerde ise yapısal ve fonksiyonel olarak farklı Ia ve Ib olan iki alt grup daha mevcuttur (18, 21, 22, 23). Onkogenez sürecinde Ia alt grubunun yer aldığı bilinir, α , β , γ diye isimlendirilen üç gence kodlanırlar (20). G protein aracılıklı reseptör(PRC) ve reseptör tirozin kinazların (RTK) aktivasyonu Ia ve Ib formlarının uyarımını sağlar (19). PI3K' in rolü $PI(4,5)P_2$ ' nin 3'-OH pozisyonundaki inozitol halkasını fosforilleyerek, sağ kalım sinyalleri ve insülin etkisi için gerekli ikincil mesajcı olan $PI(3,4,5)P'$ ı oluşturmaktır. Uyarılmamış koşullarda PIP_3 seviyesi insanda çok zor belirlenebilecek kadar azdır. PI3K'ler düzenleyici (P85) ve katalitik(P110) alt ünitelerden oluşan heterodimerlerdir. P85 alt üniteleri SH2 bölgesiyle kinazlardaki fosfotirozin artıklarıyla ilişkiye girer (Şekil.3) (18, 20, 22 ,23).



Şekil. 1.3 Fosfatidil inozitolun moleküler formülü (27)

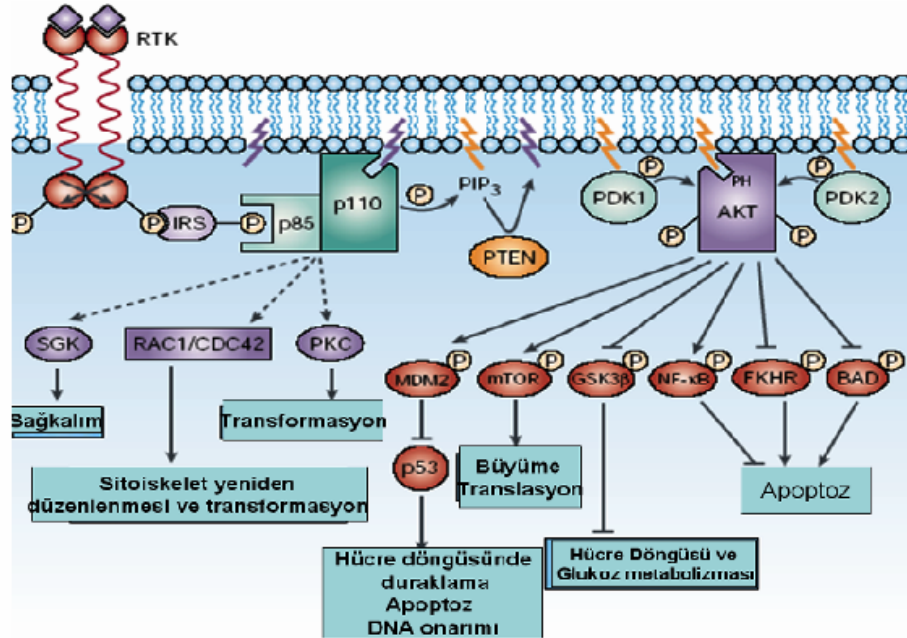
Akt PKB ve RAC olarak da isimlendirilen 57 kD ağırlığında, farelerde lösemiye sebep olan viral onkoprotein v-Akt proteininin homoloğu bir Ser/Thr kinazdır. Memeli genomu Akt1(PKB α), Akt2(PKB β), Akt3(PKB γ), izoformlarını (aminoasit düzeyinde yüksek düzeyde homoloji gösterirler) kodlayan üç Akt geni içerir (Şekil.5) (18, 19). Genlerin her biri N terminalinde Pleksin Homoloji(PH) bölgesi, merkezinde kinaz bölgesi ve C terminalinde düzenleyici bölge içeren proteinler kodlarlar. Akt'ın PH bölgesi tüm fosfo inozitoller (PI)'lar arasından tercihen PIP3'e bağlanır.



Şekil 1.4 PKB/Akt izoformlarının bölgesel yapıları (24).

Akt genleri farklı dokularda farklı ekspresyon modeline sahiptir. Örneğin Akt1 beyin, kalp, ve akciğerde yoğunlukla eksprese olurken, Akt2 iskelet kası ve embriyonik kahverengi yağ hücrelerinde, Akt3 ise beyin, böbrek ve embriyonik kalp dokusunda yoğunlukla eksprese olur. Akt genlerinin kromozomal lokasyonları 14q32(Akt1), 19q13.1- 13.2 (Akt2), 1q44(Akt3) olarak belirlenmiştir (18, 24).

Akt'ın aktiflenmesi proliferasyon ve sağ kalım gibi çeşitli hücresel fonksiyonlarda önemli bir yere sahiptir. PI3K-Akt sinyal yolağı birçok hücresel uyarımla düzenlenip, transkripsiyon, translasyon, çoğalma, büyüme ve sağ kalım gibi önemli hücresel fonksiyonları düzenler.(Şekil.3) Yolak aktivasyonu ile ilgili hasarlar kanser diyabet ve oto immün hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (18, 19).



Şekil 1.5 PI3K/Akt'ın yönlendirdiği biyolojik fonksiyonlar (27)

1.2.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağı Aktivasyonu

Büyüme faktörlerinin kendi reseptör tirozin kinazlarına veya G protein aracılıklı reseptörlere bağlanmaları PI3K'i aktive eder.

Akt aktivasyonunun detayları bilinmesine rağmen nasıl azaltıldığı ile ilgili çok az bilgi vardır. PI3K tarafından PIP3 oluşturulduktan sonra Akt membrana göç eder ve fosfolipidlere

bağlanır. Burada Aktın PH bölgesi ile ilişkiye giren PIP3, Akt proteininde şekilsel değişikliğe sebep olur ve bunun sonucunda da Akt kinaz bölgesindeki Thr308 ve C-terminalindeki düzenleyici bölgesindeki Ser473 aminoasitlerinden fosforillenir. Akt'ın Thr308'den fosforillenmesini ve aktif şeklinin korunması işlemi PDK1 enzimi tarafından yapılır. PDK1 enzimi aktivasyonu PI3K tarafından düzenlenir (19, 20). Akt'ın Thr 308 den fosforilasyonu Akt aktivasyonu için gereklidir fakat Akt'ın tamamlanmış aktivasyonu için hidrofobik C-terminal bölgesinden de fosforillmesi gerekir. Akt'ı Ser473 den fosforilleyen kinaz PDK2 diye isimlendirilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda integrin bağlantılı kinazın (ILK) Aktın fosforilasyon sürecinde yer aldığı bulunmakla beraber, ILK'ın direk olarak Akt'ın Ser473 fosforilasyonunu sağladığı gösterilememiştir (18). Akt'ın PI3K den bağımsız olarak aktivasyonunu, protein kinaz A agonistleri (PKA), β -adrenerjik reseptörler ve hücre içi kalsiyum oranı sağlar. Bunların yanında Akt sıcaklık şoku, UV, iskemi, hipoksi, hipoglisemi ve oksidatif stres tarafından da aktive edilebilir. Bu durum PI3K inhibitörlerine direnci de açıklamakta kullanılabilir (19).

Aktivasyondan sonraki aşamada, Akt bilinmeyen bir mekanizmayla substratlarının olduğu sitoplazma ve çekirdeğe göç eder (18). Akt aktive olunca altındaki substratları fosforilleyerek hücrel yanıtı oluşturur (19).

1.2.3.PI3K/Akt Sinyal Yolağı Aktivasyonunun Hücre Davranışındaki Rolü

Akt, Bad ve ASK-1 gibi proteinleri fosforilleyerek hücrel sağ kalımı, p21,p27 gibi CDK inhibitörlerini fosforilleyerek hücre döngüsünü, GSK-3 β 'yı fosforilleyerek hücre metabolizmasını, FKHR ailesi üyelerini gibi transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek gen transkripsiyonunu etkiler (Şekil.3) (19).

Akt Aktivasyonunun Hücre Proliferasyonundaki Rolü

Aktive olmuş Akt hücre proliferasyonu ile ilgili glikojen sentez kinaz (GSK-3), glukoz taşıyıcıları (GLUT4), siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, P21/waf1/Cip1, P27/Kip1, rapamisin memeli hedefi (mTOR) ve TSC2 gibi birçok substratı modüle eder.

Akt N-terminal serin artığını direk olarak fosforilleyerek, GSK3'ün aktivitesini durdurur. GSK3'ün inhibisyonu, fosforilasyonla yıkılan β -kateninin fosforilasyonunu engelleyerek birikmesini ve çekirdeğe göç etmesini sağlar. Nükleusta β -katenin Tcf/Lef1 gibi farklı transkripsiyon faktörleriyle birleşip silkin-D1 gibi, retinoblastoma aşırı fosforilasyonu ile aktivasyonunun durdurulması yoluyla hücre döngüsü ilerlemesini sağlayan birçok genin transkripsiyonunu aktifler.

Akt aynı zamanda P21/waf1/Cip1 ve P27/Kip1'i fosforilleyerek onları sitoplazmada oyalar ve proliferasyon karşıtı etkilerini yapmalarını engeller.

Akt'ın mTOR fosforilasyonu, siklin-D mRNA sının translasyonunu iletir. Akt aynı zamanda TSC'yi fosforile ederek onun büyüme baskılayıcı etkisini ortadan kaldırır (18).

Akt Aktivasyonunun Hücre Sağ Kalımındaki Rolü

Aktif PI3K'in önemli fonksiyonlarından biride apoptozu inhibe etmesidir. PI3K bağımlı hücre sağ kalımını yönlendirmek için Akt iyi bir adaydır. Akt farklı hücre ölümüne giden senaryolarda (oksidatif ve ozmotik stres, radyasyon, iskemik şok, kemoterapötik ilaçlar) anti apoptotik faktör olarak yer alır.

Akt, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını kontrol eden Bad gibi öncül apoptotik proteinleri fosforilleyip aktivasyonlarını bozarak, apoptoz karşıtı mekanizmayı yönlendirir. Akt tarafından forkhead ailesi üyelerinin(AFX, FKHR, FKHL1) fosforillenmesi FasL, IGFBP-1 ve Bim gibi apoptoz genlerin transkripsiyonlarını inhibe eder. Akt IkappaB kinaz α 'yı aktifleyerek IkappaB'yi fosforiller. Bu durum nükleer faktör kappaB'nin aktivasyonuna ve ona bağımlı Bcl-XL, kaspaz inhibitörleri, c-Myb gibi sağ kalım genlerinin transkripsiyonunu sağlar. Akt, Bcl-2, Mcl-1 ve Aktın kendisi gibi apoptoz karşıtı genlerin transkripsiyonunu artıran siklik AMP Response Element Binding proteini fosforilleyip aktifler (18, 25).

Akt, murine double minute-2 (mdm-2) proteinini nükleusa yollayıp P53 destabilizasyonu sağlayarak P53 ü dolaylı olarak düzenler. P53 yıkılımı artınca, hücresel strese cevap azalır ve sağ kalım artar. Bununla beraber inhibitörünü yıkarak NFkB'nin aktivasyonunu sağlar (18).

1.2.4. IP3K/Akt Sinyal Yolağı ve Kanser

PI3K'in P85 düzenleyici alt ünitesi insan kanserlerinde mutasyonların hedefidir. PI3K'in P110 α katalitik alt ünitesini kodlayan PIK3CA gen mutasyonları kolon, gastrik, meme, ve akciğer kanseriyle glioblastomalarda görölmüştür. Yapılan çeşitli çalışmalarda ovaryum, serviks, baş boyun kanserleri, gastrik kanserler ve glioblastomalarda PIK3C gen amplifikasyonu da görölmüştür. PI3K'in P65 alt ünitesinin güdük olduğu durumlarda PI3K'in devamlı aktivasyonuna ve hücre dönüşümüne neden olur. Reseptör tirozin kinazların aktivasyonuna sebep olan mutasyonlar PI3K-Akt yolağını etkiler. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) hücre dışı bölgesinin güdük olan formu PI3K-Akt'ın potansiyel aktivatörü olur. Onkogenler ve PI3K-Akt yolağı arasında bağlantı da söz konusu olabilir. Örneğin TLC Akt'a bağlanarak onun devamlı dimerizasyonunu, aktivasyonunu ve nükleer göçü ilerletebilir.

Yıllar içerisinde biriken çalışmalar Akt sinyal yolağının hücre döngüsü, sağ kalım, büyüme, migrasyon ve anjiogenezde rol oynayarak malignat transformasyonda ve kemoterapiye dirençte rol aldığını göstermiştir. Ayrıca Akt aktivasyonuna sebep olan, Akt'ın negatif düzenleyicisi PTEN mutasyonlarına birçok tümörde rastlanmıştır. % 17-27 HCC vakasında 10q kromozom kolunun kayıp olması 10q23 bölgesinde lokalize PTEN'in HCC de rol oynadığına bir kanıttır. Somatik, missense, çerçeve kayması ve splice bölgesi mutasyonları bazı HCC vakalarında görölmüştür. PTEN mutasyonları tiroid, kolon, prostat, uterus, merkezi sinir sistemi ve yumuşak dokuların primer kanserlerinde gösterilmiştir. Aynı zamanda kolorektal kanserlerde promotor hipermetilasyonu ile da PTEN inaktivasyonu rapor edilmiştir (18).

Bunun yanında birçok kanserde Akt aktivasyonuna, aşırı ekspresyonuna ve amplifikasyonuna rastlanmıştır. Akt geninin mutasyonu insan kanserlerinde rapor edilmemiş olmasına rağmen, Akt1'in gastrik karsinoma ve glioblastomada, Akt2'nin ovaryum, pankreatik, gastrik ve meme karsinomalarında gen amplifikasyonu görölmüştür. Akt3 ün ise mRNA düzeyinde aşırı ekspresyonu meme ve prostat kanserlerinde gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, melanoma baş boyun kanserleri, meme kanseri, kolon kanseri, ovaryum kanseri, pankreatik kanser, safra kesesi kanseri, özafagual skuamöz hücreli karsinomada ve prostat kanserinde artan Akt aktivitesi saptanmıştır. Birçok insan hücresinde Akt'ın ektopik ekspresyonu, özellikle devamlı aktivasyonu hücre sağ kalımı ve malignat dönüşümü indüklerken, Akt aktivasyonunun inhibe edilmesi apoptozu artırmaktadır. Bununda ötesinde

Akt aktivasyonunun tümör invazivliğini ve kemoterapi direncini artırdığını, Akt'ın baskılanmasının ise intrahepatik metastazı baskıladığı gösteren çalışmalar mevcuttur. Tüm bu çalışmalar kanser tedavisinde Akt yolağının önemli bir hedef olmasını sağlamaktadır (19, 26, 27).

Özetlenecek olursa Akt'ın tümör gelişiminde rol oynadığına dair görüşler 3 sebebe dayanmaktadır. Bunlardan birincisi Akt aşırı eksprese eden transgenik hayvanların cilt, meme, lenfotik nodüllerde, ovaryumda, ve beyinde tümör geliştirmesi, bunun yanında PTEN heterozigot hayvanların kontrole göre karaciğer, endometriyum, testis, tiroid ve prostatta daha fazla tümör geliştirmesidir. İkincisi çeşitli karsinojenlerle akciğer epitellerini muamele edince PI3K/Akt yolağının artması ve bunun karsinojenlere karşı bir yanıt olabileceğini düşüncesidir. Üçüncüsü ise meme, kolon, ovaryum, pankreas, prostat kanserlerinde in vivo olarak Akt aktivitesinin saptanması ve multiple myeloma, baş boyun, meme, kolon, ovaryum, prostat kanserlerinde immünohistokimyasal olarak da Akt aktivitesinin gözlenmiş olmasıdır (19).

1.2.5. PI3K-Akt Yolağının İnhibisyonunu ve Kanser Tedavisine Kullanımı

Akt aktivasyonunun detayları bilinmesine rağmen nasıl aktivasyonunun durdurulduğıyla ilgili çok az bilgi vardır (20). İnsan kanserlerinde sıklıkla germline veya somatik olarak mutasyona uğramış bir tümör baskılayıcı olan PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), PI3K-Akt yolağının başlıca negatif düzenleyicisidir. PTEN PI(3,4,5)P3'ü 3. pozisyonundan fosforile edip PI(4,5)P2 ye çevirerek PIP3 oranını düşürür. Germline PTEN mutasyonları, kanser ve malignant tümör gelişimine yüksek yakınlıkla seyreden, az rastlanan bir genetik hastalık olan Cowden's hastalığını oluştur (18, 27).

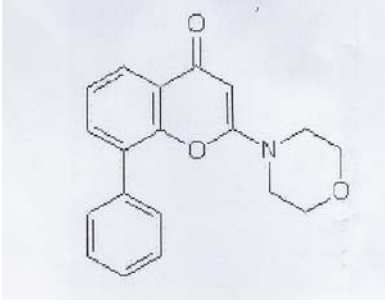
Bunun yanında Akt aktivitesi SHIP (SH2 içeren izozitol fosfataz) ve CTMP (Karboksi terminal modüle edici protein). SHIP PI(3,4,5)P3'ü 5 pozisyonundan defosforile ederek Akt'ın hücre içi miktarını ayarlar. Fakat SHIP kaybı insan kanserlerinde rapor edilmemiştir ve SHIP'in PI3K-Akt sinyali üzerindeki etkisi in vivo ortamda tam olarak anlaşılmamıştır. CTMP ise son zamanlarda keşfedilen bir proteindir. İn vitro olarak CTMP Akt'ın karboksi terminal düzenleyici bölgesine bağlanıp onun Ser 473 ve Thr 308 aminoasitlerinden fosforillenip aktiflenmesini engeller. Fakat henüz insan kanserlerindeki in vivo değişimleri

henüz rapor edilmemiştir. Bunlar ek olarak Akt aktivasyonunun bir kısmı genel bir fosfataz olan PP2A tarafından engellenir (18).

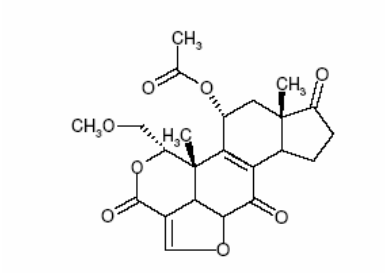
PI3K-Akt'ın yolakta daha yukarılarından kaynaklı, PI3K gen amplifikasyonu sebebiyle veya PTEN mutasyonu veya kaybından meydana gelen kontrolsüz Akt aktivasyonu kanser gelişimine yataklık eder. Bu yüzden Akt aktivasyonunun inhibisyonu kanser tedavisinde önemli bir stratejidir. Yapılan birçok çalışmada Akt inhibisyonu için Wortmannin ve LY294002 isimli iki bileşik kullanılmıştır. Wortmannin tip I PI3K'i inhibe eden fungal bir metabolittir ve nanomolar konsantrasyonlarda PI3K'in P110 katalitik alt ünitesine bağlanıp geri dönüşümsüz olarak PI3K'i inhibe eder (Şekil.5) (18). Yüksek dozlarda miyozin hafif zincir kinazını, fosfolipaz C, D, A2 ve DNA bağımlı protein kinazları da inhibe eder (19). Wortmannin'in in vitro ve in vivo olarak tümör karşıtı aktivitesi gösterilmiştir. Fakat Wortmannin kullanımının dezavantajı suda çözünmeyip organik çözücülerde çözünmesi ve bunun klinik vakalarda kullanımını kısıtlamasıdır.

LY294002 ise flavonoid türevidir, yarışmalı ve geri dönüşümlü olarak PI3K'in ATP bağlanma bölgesini inhibe eder.(Şekil.4) Genellikle in vi vitro olarak kullanılmış olan bileşik, proliferasyon ve apoptoz karşıtı aktiviteye sahiptir. LY294002 G1 duraklaması yaratıp, P27/Kip1 seviyesini artırıp, siklin E ve D seviyelerini düşürerek hücre proliferasyonunu durdurur. Fakat LY294002 Akt aktivitesi düşük olan hücrelerde efektif değildir. Yapılan çalışmalarda LY294002 in vitro ve in vivo olarak tümör gelişimini inhibe etmiştir (18, 19).

Wortmannin ve LY294002'nin her ikisi de Akt'ı değil direkt olarak PI3K'i inhibe eder. Bu yüzden Akt'ı direkt olarak inhibe edecek daha küçük moleküllere ihtiyaç vardır. Yeni geliştirilen fosfatidilinozitol eter lipid analogu (PIA) Aktın PH bölgesine direkt olarak bağlanarak, PDK1 ve PI3K'i etkilemeden, Akt'ı inhibe ederek, altındaki hedeflerinin fosforilasyonunu azaltır. Fakat bu molekülün kullanımı için daha ileri düzeyde çalışmalar yapılmalıdır. Aynı şekilde alkil fosfolipidler de PI3K'in yeni kullanılmaya başlanılan inhibitörleridir fakat bu konuda yeterince çalışma yapılmamıştır (18) .



Şekil 1.6 LY294002'nin moleküler yapısı



Şekil 1.7 Wortmannin'in moleküler yapısı

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. HCC Hücre Dizileri

Tezde kullanılan HCC hücre dizileri (Mahlavu, Huh7, Hep40, SNU-475, SNU-398, SNU-449, SK-Hep1, PLC/PRF-5, Hep3B, HepG2) Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından temin edilmiştir. Tablo 2.1’de bu hücre dizilerine ait bilgiler özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Tezde kullanılan hücre dizileri

| Hücre dizisi | Yaş¹ | Tümör Tipi | HBV² | Farklılaşma derecesi |
|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------|
| Huh7 | 57 | HCC | - | Farklılaşmış |
| HepG2 | 15 | HCC/HB ³ | - | Farklılaşmış |
| Hep40 | ? | HCC | + | Farklılaşmış |
| PLC/PRF/5 | 24 | HCC | + | Farklılaşmış |
| Mahlavu | ? | HCC | - | Farklılaşmamış |
| SK-Hep-1 | 52 | AC ⁴ | - | Farklılaşmamış |
| SNU-449 | 52 | HCC | + | Farklılaşmamış |
| SNU-475 | 43 | HCC | + | Farklılaşmamış |
| SNU-398 | 42 | HCC | + | Farklılaşmış |

¹ Tümör cerrahisi yapıldığında hastaların yaşı

² HBV DNA’sı varlığı

³ Hepatoblastoma ⁴ Adenokarsinoma

2.2. Hücre kültürü

2.2.1. Hücrelerin İdame Ettirilmesi

Tablo 2.1’de kullanılan HCC hücre dizileri, normal koşullarda %10 FCS (Fetal Calf Serum) (Biochrom, S0125), 2mM L-Glutamin (Biological Industries, 03-020-1C), 100u/ml

penisilin ve 0,1mg/ml streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C) ve % 1 esansiyel olmayan aminoasit karışımı içeren RPMI-1640 (Biological Industries, 01-104-1A) içerisinde üretilmişlerdir. Bazal koşullarda yapılan deneyler için serum açlığı oluşturmak amacıyla, büyüme ortamına FCS yerine % 1 BSA (Ambresco 0332-1006) kullanılmıştır. Hücre kültürü işlemleri laminer kabinet (Aura Vertical S.D.4,C5681) içerisinde yapılırken, hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde (Heal Force, HF90) kültüre edilmiştir. Hücreler büyüme hızlarına ve başlangıç yoğunluklarına göre değişmekle birlikte 3 ila 5 günlük aralıklarla bir alt kültüre edilmiştir. Hücreler %80 civarında yoğunluğa ulaştığı zaman kültür kaplarındaki ortam çekilip, 3 defa pH: 7.4 steril PBS ile yıkanmıştır. Ardından PBS uzaklaştırılıp kültür kabına 1 ml Tripsin-EDTA (Biological Ind., 03-054-1B) solüsyonu konularak inkübatörde hücreler tutundukları yüzeyden ayrılana kadar 1-2 dakika bekletilmiştir. Tripsinize edilen hücrelerin üzerine FCS içeren ortam konularak pipetlenmiş ve bu işlemin sonunda istenilen miktarda hücre (hemasitometrede sayılarak) yeni kültür kaplarına alınmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında ters bakışlı faz kontrast mikroskopundan (Nicon, Phase Contrast-2 LWD 052, 202086) yararlanılmıştır.

2.2.2. Büyüme Faktörleriyle Uyarılma

Deneylerde 40ng/ml HGF (MY 111, Dr. Donald P. Bottaro, NIH, NCI tarafından sağlandı) ve 10ng/ml EGF (Sigma E 9644-2MG) kullanılmıştır. HGF dilüsyonu için Tris-BSA(0.5M Tris-baz,1.5 M NaCl, %2 BSA) çözeltisi kullanılmıştır. HGF uyarımı için, deneyin sonlandırılmasından hemen önceki 15 dakika boyunca, EGF uyarımı için ise aynı şekilde 5 dakika boyunca yapılmıştır. Büyüme faktörü eklenmeden 15 dakika önce hücre kültür ortamlarına serin fosfataz inhibitörü olan NaF (100µM) eklenmiştir.

2.2.3. Hücrelerin Dondurulup Çözülmesi

Hücrelerin dondurulması: Ortalama 2-3 günlük kültür sonunda, logaritmik büyüme evresine gelmiş hücreler % 70-80 yoğunlukta yaklaşık $3-4 \times 10^6$ hücre sayısına ulaşıncaya kadar dondurulmuştur. Bunun için PBS ile 3 defa yıkanılan ve PBS uzaklaştırılınca tripsinize edilen

hücreler hücre kültür ortamında süspense edilmiş ve 1500 rpm de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz uzaklaştırılıp hücreler taze olarak hazırlanmış ve buzda soğutulmuş 1ml dondurma ortamında (% 20 FCS, % 10 DMSO, % 80 DMEM) yeniden yavaşça süspense edilerek hücre dondurma tüplerine konulup, 4°C’de soğutulmuş ve dakikada 1°C’lik soğuma sağlayan buz kutusuna (Nalgene 5100-0001) konulmuştur. Bir gece boyunca -80°C’de tutulduktan sonra sıvı azot tankına kaldırılmıştır.

Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi: Dondurulan hücreler sıvı azottan çıkarılıp, 37°C’deki su banyosunda tutularak hızla çözülmüş ve üzerine 37°C’ye kadar ısıtılan hücre kültürü ortamı konularak süspense edilmiştir. Süspansiyon 1500 rpm de 5 dakika santrifüjlenip DMSO içeren üst faz atılmış ve hücre pelleti yine ısıtılmış normal kültür ortamıyla süspande edilerek yeni bir hücre kültür kabına konulmuştur.

2.3. Western Blotlama

2.3.1. Kültür Hücrelerinden Total Protein İzolasyonu

Tanımlanan deney koşulları ile üretilerek, % 70-80 yoğunluğa ulaşmış hücreler soğuk PBS ile 2-3 kez yıkayıp 1ml PBS içerisinde hücre kazıyıcılarla kazılarak 1,5 ml’ lik eppendorf tüplerine toplanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 1500 rpm’de 5 dakika santrifüjlenip (Eppendorf Centrifuge 5415R) üst faz uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti üzerine, pelletin yaklaşık olarak 4 katı kadar buzda soğutulmuş NP-40 liziz tamponu (50 mM pH 7.4 Tris-HCl, % 1 NP-40, % 0.25 sodyumdeoksikolat, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1mM PMSF, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄) eklenip pipetlenmiştir. Buz üzerinde 5 dakika aralıklarla karıştırılarak 30 dakika bekletilen örnekler +4 °C’de soğutulmuş santrifüjde 13000 rpm devirde 15 dakika santrifüjlendikten sonra total hücre proteinini içeren üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve elde edilen proteinlerin protein miktarı belirlenip, çok daha küçük hacimlere ayırmak amaçlı yeni tüplere dağıtılarak -80 °C’lik buzdolabında daha sonra kullanılmak üzere dondurulmuştur.

2.3.2. Protein Miktar Tayini

Protein miktar belirlemesi için BCA Protein Assay Kit (Pierce 23225) kullanılmıştır. Her bir tüpte farklı miktarlarda stok BSA (Pierce, 23209) içeren, BCA ve ddH₂O ilaveleriyle 1ml'lik toplam hacme ulaştırılan reaktif solüsyonları hazırlanmıştır. Yine bunlara paralel olarak, miktarı tayin edilecek toplam protein lizatlarının her birinden 2 µl içeren ve aynı şekilde BCA ve ddH₂O ile 1ml'ye tamamlanmış reaktif solüsyon hazırlanmıştır. Tüm örnekler tepkime gerçekleşmesi için 60 °C' de 15 dakika inkübe edilmiş. Isı altında içerdikleri protein miktarlarına orantılı şekilde değişiklik gösteren reaksiyon sonunda oluşan bikronik asit-bakır komplekslerinin optik densiteleri (OD), atılabilen plastik spektrofotometre küvetleri kullanılarak (Brand 759220), 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) kör baz alınarak ölçülmüştür. Bilinen BSA konsantrasyonlarına karşı spektroda okunan OD değerleri kullanılarak çizilen standart doğrusal grafikten elde edilen matematiksel formül kullanılarak diğer örneklerdeki bilinmeyen protein miktarları hesaplanmıştır.

Farklı dilüsyonlarda BSA çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

| Tüp numarası | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------------------------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|
| BSA stok (µl) | 0 | 2.5 | 5 | 7.5 | 10 | 12.5 | 15 | 20 |
| ddH ₂ O (µl) | 100 | 97.5 | 95 | 92.5 | 90 | 87.5 | 85 | 80 |
| BCA reaktif solüsyon (µl) | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 |

(1. tüp kör'dür)

Protein örnekleri aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

| Tüp numarası | 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Örnek (µl) | 0 | 2 | 2 | 2 |
| ddH ₂ O | 98 | 98 | 98 | 98 |
| BCA reaktif solüsyonu (µl) | 900 | 900 | 900 | 900 |
| Liziz tamponu (µl) | 2 | - | - | - |

(1. tüp kör'dür)

2.3.3. SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrez

BioRad mini protein elektrofrez sistemi (Mini-PROTEAN Electrophoresis Cell 165-3301) kılavuzunda tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır. Sisteme uygun jel hacmi yine kılavuza göre tanımlanmıştır. Bir falkon tüp içinde Tablo 2.1'deki gibi % 10'luk ayırıcı jel (seperasyon jeli) içerikleri karıştırılarak hazırlanıp ve iki cam arasına dökülmüştür. Jelin üzerini kaplayacak miktarda dH₂O'ya doydurulmuş saf izoamil alkol eklenerek jelin polimerize olması ya da başka bir deyişle katılaşması beklenmiştir. Ayırıcı jelin içereceği poliakrilamid konsantrasyonuna Tablo 2.3'de gösterilen şekilde western blotlamada bakılacak proteinin büyüklüğüne göre karar verilmiştir. Ayırıcı jel katılaşınca üzerindeki izoamilalkol dökülmüş ve Tablo 2.2'de gösterildiği şekilde % 5'lik istifleme jeli (Staking jeli) hazırlanıp camlar arasına konulmuştur. Hemen uygun taraklar camların en üst kısmına kılavuzda gösterildiği şekilde yerleştirilip istifleme jelinin katılaşması beklenmiştir. Daha sonra tarak yavaşça çıkarılmış ve kuyucuklar polimerize olmayan akrilamidi uzaklaştırmak için elektrofrez yürüme tamponu ile yıkanmıştır.

Tablo 2.2. SDS-PAGE ayırlama jel bileşenleri

| Kullanılacak kimyasal | %10'luk ayırlama jel (5ml) | %10'luk ayırıcı jel (10ml) | %10'luk ayırıcı jel (20ml) |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| dH ₂ O | 1.9 | 4.0 | 7.9 |
| %30 akrilamid mix | 1.7 | 3.3 | 6.7 |
| 1.5M Tris-HCl (pH8.8) | 1.3 | 2.5 | 5.0 |
| %10 SDS | 0.05 | 0.1 | 0.2 |
| %10 Amonyum persülfat | 0.05 | 0.1 | 0.2 |
| TEMED | 0.02 | 0.04 | 0.08 |

Tablo 2.3. SDS-PAGE istifleme jeli bileşenleri

| Kullanılacak kimyasal | %5'lik istifleme jeli(5 ml) | %5'lik istifleme jeli(10 ml) |
|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| dH ₂ O | 3.4 | 6.8ml |
| %30 akrilamid mix | 0.83 | 1.7ml |
| 1.5M Tris-HCl (pH6.8) | 0.63 | 1.25ml |
| %10 SDS | 0.05 | 0.1ml |
| %10Amonyum persülfat | 0.05 | 0.1ml |
| TEMED | 0.005 | 0.01ml |

Tablo 2.4. SDS-PAGE ayırlama etkinliği

| % Akrilamid konsantrasyonu | Doğrusal ayırlama aralığı (kD) |
|----------------------------|--------------------------------|
| 15 | 12-43 |
| 10 | 16-68 |
| 7.5 | 36-94 |
| 5 | 57-212 |

%30Akrilamid-bisakrilamid

28.2 g akrilamid

0.8 g bisakrilamid

ddH₂O ile 100 ml'e tamamlanır

%10 SDS

1 g SDS

ddH₂O ile 10 ml'ye tamamlanır

%10 APS (taze hazıranmalıdır)

0.1g APS

ddH₂O ile 1ml ye tamamlanır

Konsantrasyonları belirlenmiş örneklerden eşit miktarlardaki proteinler, % 5 β -ME (Applichem, A1108,0100) içeren 5X yükleme tamponu ile son konsantrasyon 1X olacak şekilde karıştırılıp, 95 °C' de 5 dakika kaynatılmıştır. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığına gelince, tanka yerleştirilmiş tris-glisin elektroforez yürüme tamponu içerisindeki jellerin kuyularına yüklenmiştir. Bir kuyuya da proteinlerin büyüklüklerini tahmin etmek amacıyla içinde bilinen büyüklüklerde çeşitli proteinler bulunan önceden boyalı büyüklük belirteci (prestained size marker) (MBI Fermentas SM0671) yüklenmiştir. Örnekler istifleyici jelin sonuna kadar 70V'da, ayırıcı jelde ise 110 V sabit gerilimde 1-2 saat yürütülmüştür.

Tris-Glisin Yürütme Tamponu (1X 1000 ml)

10 ml %10 SDS

3 g Tris-Baz

14.4 g Glisin

5X yükleme tamponu(40ml pH:7)

4 g SDS

20ml Gliserol

1.3 Tris

3 mg Bromfenol Mavisi

2.3.4. Proteinlerin Katı Bir Yüzeğe Transferi

Yürütmenin tamamlanmasına yakın mini jel boyutlarında eldiven giyilerek her jel başına 1 PVDF membran (millipore, IPVH15150) ve 4 adet Whatmann kağıdı kesilmiştir. Bu arada PVDF membran 40 saniye metanol içerisinde bekletilip dH₂O ile 1-2 saniye yıkanmıştır. Membran ve whatmannlar Tris-Glisin transfer tamponu içinde en az 10 dakika bekletilmiştir. Yürütme tamamlandığında jel camlar arasından çıkarılıp 1-2 dakika aynı tampona konulmuştur.

Yarı-kuru transfer cihazı (Hoefler SemiPhor- Pharmacia Biotech) temizlenmiş ve sırasıyla 2 adet Whatmann, jel, PVDF membran ve 2 adet Whatmann tampon sızdırılarak yerleştirilmiştir. Transfer tamponunun ıslaklığından yararlanılıp bu katmanlar arasındaki hava kabarcıkları çıkarılmıştır. Cihaz kapatılıp, elektrotları takıldıktan sonra, jelin mm³'ü başına 3.5 - 5.5 mA olacak şekilde akım geçirilerek 12 V civarında, 45 dakika transfer gerçekleştirilmiştir. Transfer cihazının üst kapağı + yüklü katot iken alt kapak – yüklü anot görevi yapar, böylelikle SDS muamelesi ile negatif yüklü hale gelen proteinlerin jelden membrana göçü sağlanmıştır.

Tris-Glisin transfer tamponu (1X 1000 ml)

3 g Tris-Baz

14.4 g Glisin

2 ml %10 SDS

200 ml Metanol

2.3.5. İmmünoyblotlama

Transfer işlemleri tamamlandıktan sonra, cihaz açılıp, kurumasına imkan vermeden membran derhal TBS içerisine konuldu. Blotlama sırasında özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için membran % 10'luk süt tozu % 0.5 Tween-20 içeren TBS-T tamponu ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edilerek bloklayma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Belirlenmek istenilen proteine karşı özgül olarak üretilmiş satın alınan antikorların (primer antikor), %3 süt tozu içeren TBS-T içinde optimizasyon sonrasında belirlenmiş konsantrasyonlarda olacak şekilde dilüsyonları yapılmış ve oda ısısında 1 saat ya da +4 °C'de gece boyunca yavaşça çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından membran en az 6 kere 10'ar dakikalık çalkalamalarla yıkanmıştır. Daha sonra primer antikorun elde edildiği hayvana karşı ve ucunda HRP enzimi takılı antikorun yine %3 süt tozu içeren TBS-T kullanılarak optimize dilüsyonları yapılmış ve 1 saat oda ısısında yavaşça çalkalanarak inkübe edilmiştir. Primer antikor sonrasında yapılan yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Kullanılan antikorlara ait bilgiler ve optimize edilmiş dilüsyon koşulları Tablo 2.4.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.5. Kullanılan antikorlar ve dilüsyonları

| Firma/Katalog no | Köken | Antikor Adı | Dilüsyon* |
|------------------------|--------|--------------------------|-----------|
| Cell Signaling - 4051 | Fare | α - P-Akt Ser 473 | 1/1000 |
| Santa Cruz Sc-11397 | Tavşan | α - Kalneksin | 1/7500 |

*Dilüsyonlar %3 süt tozu içeren TBS-T içinde yapılmıştır.

Tüm yıkamaların ardından, ECL+(Amersham RPN2132) ya da Pierce (West Dura Extended Duration Substrate, 34075) gibi farklı deteksiyon solüsyonları kullanılarak bantlar görüntülenmiştir. Pierce kitinde önerildiği gibi membran 5 dakika solüsyon karışımıyla muamele edildikten sonra naylon içerisine alınmıştır. Işımaya duyarlı Kodak (5256441) filmi naylon içerisindeki membran üzerinde, kasette kapalı şekilde, farklı antikorlar için farklı sürelerde tutulup ardından da banyo edilen filmde sonuçlar görüntülenmiştir. İkincil antikor

ucuna bağlı HRP enzimi Pierce kitinin içerisindeki substratı parçalayarak ışımaya sebep olmuştur.

2.4. BrdU İnkooerasyonu ile Hücre Proliferasyon Tespiti

BrdU bölünen hücrelerde timidin bazının üridin ile yer değiştirmesine dayalı olarak bölünen hücrelerle bölünmeyen hücreleri ayıran bir proliferasyon değerlendirme yöntemidir. Bu yöntemi kullanarak proliferasyon değerlendirilmesi için 48 kuyucuklu hücre kültürü kabına önceden optimizasyon deneyi ile belirlenen 20×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Hücreler yaklaşık olarak 12-16 saat sonra yapışmalarını tamamladıklarında eklenecek inhibitörler ortama konulup istenilen değerlik zaman aralıklarında deney durdurulup proliferasyon değerlendirilmiştir. Bunun için zaman dilimi dolduğunda kuyucuklara son konsatrasyon $30 \mu\text{M}$ olacak şekilde BrdU eklenip 3 saat inkübatörde 37°C 'de bekletildi. Üç saatlik inkübasyon bitiminde hücreler PBS ile iki kez yıkanıp kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Etanol (Merck 1.11727.2500) ile 10 dakika sabitlenip etanolün uzaklaştırılması için 10 dakika PBS ile yıkanmıştır. Taze hazırlanmış 2N HCl (Merck K27564414) ile 20 dakika inkübe edilmiştir. PBS ile 15 dakika yıkanıp, PBS içerisinde hazırlanmış %1 BSA (Amresco 0332-1006) %0.5 Tween ile spesifik olmayan antikor bağlanmalarının engellenmesi sağlanmıştır. 1/500 dilüsyonda anti BrdU antikor (DakoCytomation M0744) eklenip 1 saat inkübe edilmiştir. PBS-T ile 15 dakika yıkanıp peroksidaz işaretili ikincil antikor (Dako, 4061) ile 30 dakika tutulup yeniden PBS-T ile 15 yıkanmıştır. DAB substrat kromojeni (Dakocytomation, K3468) eklenip, 8 dakika inkübe edilen kromojen suyla yıkanıp hücreler hematoksilenle (zıt boyama için) boyanmıştır. Mikroskopta kuyucuk içerisinden belirli 5 alandaki proliferasyon olan ve olmayan hücreler renklerine göre ayırt edilip sayılmış ve yüzde bölünen hücre sayısı bulunmuştur. Deney l set halinde yapıldığından her koşulun ortalaması ve standart sapması çıkarılıp değerlendirilmiştir.

3.5. MTT Testi ile Hücre Canlılık Analizi

CellTiter 96 AQ One solution Cell Proliferation (Promega 6358A) test kiti ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde MTS tetrazolium tuzu canlı hücreler tarafından metabolize edilir ve renkli formazan bileşiğine dönüştürülür. Kültür ortamı 490 nm de spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu yöntemi kullanarak canlılık değerlendirilmesi yapılması için 48 kuyucuklu hücre kültür kabına 10×10^3 hücre ekilmiş, yaklaşık 12-16 saat kadar sonra, kültür ortamı değiştirilerek eklenecek inhibitörler konulmuştur. 24 ve 48 saat sonunda kitte kitapçığında önerilen yöntem izlenerek canlılık analizi yapılmıştır.

3.6. LDH testi İle Hücre Ölümü Analizi

CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega 6178) test kiti ile gerçekleştirilmiştir. Bu test hücre membran bütünlüğü bozulan hücrelerde, sitoplazmadan kültür ortamına salınan LDH'nin ölçülmesine dayalı bir yöntemdir. Hücrelerin içinde bulunduğu kültür ortamında açığa çıkmış olan LDH enzimi etkisiyle renkli formazan bileşiği oluşturulur. Oluşan renk 490 nm de spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu yöntemi kullanarak hücre ölümü analizi yapılması için 48 kuyucuklu hücre kültür kabına 10×10^3 hücre ekildi, yaklaşık 12-16 saat kadar sonra, kültür ortamı değiştirilerek eklenecek inhibitörler konuldu. 24 ve 48 saat sonunda kit kitapçığında önerilen yöntem izlenerek hücre ölümü analizi yapılmıştır.

2.7. FACS ile Hücre Döngüsü Analizi

Yöntemde Propidium İodide'nin çift iplikli DNA ya bağlanmasıyla DNA miktarına bağlı olarak floresan sinyal oluşmaktadır. Oluşan floresan sinyal yoğunluğuna göre hücrenin, hücre döngüsünün hangi aşamasında olduğu belirlenir. 6cm çapında kültür kaplarında ekilen hücreler 12-16 saat sonra yapışmalarını tamamladığında kültür ortamı değiştirilip inhibitörler eklenmiştir. 24 ve 48 saat sonra hücreler tripsinle kaldırılıp, tripsini uzaklaştırmak için santrifüj edildikten sonra PBS ile süspanse hale getirilmiş, DNA Prep Coulter Reagents Kit

(PN 6607055) kullanılarak, kitte önerilen protokol izlenmiş ve Beckman Coulter EpicsXL Flow Cytometry cihazında analizlenmiştir.

3.8. İmmunoboyama

İmmunohistokimya

Hücreler, 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisine yerleştirilmiş otoklavlanarak sterilize edilmiş 22 mm²'lik lameller üzerinde normal koşullarda kültüre edilmişlerdir. Ekilen hücre sayısı hücreler arasında, büyüme hızlarına göre farklılık göstermiştir. Tüm hücre hatları için biri negatif kontrol olmak üzere 2 lamel hazırlanmış, 2 günlük inkübasyon sonrasında %80 yoğunluk gösteren hücreler için immunositokimya protokolüne geçilmiştir. Hücre kültür ortamı uzaklaştırılıp, hücreler PBS ile 2-3 kez yıkanmıştır. Tespit için %3 lük taze hazırlanmış PFA (Apllichem A3813) 15 dakika boyunca hücrelerle maruz bırakılıp, hücre membranı geçirgenliğini artırmak için 3 dakika da %0.1 lik Triton X-100 (Sigma) kullanılmış ve PBS ile 2-3 kez yıkanmıştır. Spesifik olmayan antikor bağlanmalarını engellemek için PBS içerisinde hazırlanmış %10'luk FBS ile 30 dakika boyunca bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bloklamanın ardından nemli ortam sağlaması amacıyla içerisinde yarı ıslak havlular olan kabın içinde, 6 kuyulu kültür kabındaki lamellerin üzerine, %1.5'lük FBS içeren PBS' de sulandırılmış primer antikorlar lamel yüzeyini kaplayacak (100 µl) miktarında konulmuş ve 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 30 dakika boyunca 5 dakikada bir PBS değiştirilerek hücreler yıkanmış ve peroksidaz enzimi taşıyan 100 µl ikincil antikor (Dako, 4061) ile 30 dakika boyunca nemli ortamda inkübe edilmiştir. Ardından lameller PBS ile 30 dakikada 5-6 sefer yıkanarak, 100 µl DAB-substrat (Dako, 3468) kromojeni lameller üzerinde 5 dakika tutulup su ile iyice yıkanmıştır. Yıkamadan sonra tüm hücrelerde zıt boyama sağlayan hematoksilen boyasıyla 5 dakika inkübe edilerek çekirdek boyaması yapılmıştır. Boya sonrasında PBS yıkaması yapıldı ve lameller kuyulardan çıkartılarak ksilol (Merk, UN-1307 K27957685) içine batırılarak kurutuldu. Lamellerin lamlar üzerine kapatılması sırasında mounting medium kullanıldı (Dako, S3025). Negatif kontrollere sadece birincil antikor yerine % 1.5'lük FBS içeren PBS konulmuş, bu adımın dışındaki tüm prosedür

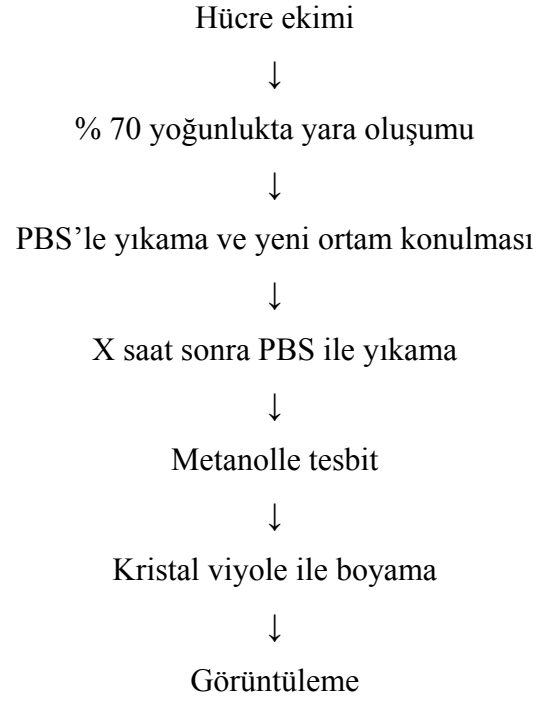
aynı şekilde uygulanmıştır. Değerlendirmeler ve fotoğraf çekimleri ışık mikroskobu aracılığıyla yapılmıştır.

İmmunfloresans

Yukarıda anlatıldığı şekilde ikinci antikor aşamasına kadar işlemler aynı şekilde yapılmıştır. PBS ile yıkamaların ardından FITC konjuge anti mouse (Chemichon, AP124F) sekonder antikorunu % 1.5'lik FBS içeren PBS' de 1/500 dilüsyonda 30 dakika boyunca nemli ve ışısız ortamda inkübe edilmiştir. Ardından lameller PBS ile 30 dakikada 5-6 sefer yıkanarak çekirdek boyaması için 45 saniye 0.1 µg/ml konsantrasyonda (zıt boyama için) DAPI içerisinde tutulmuştur. PBS ile 2-3 sefer yıkayıp floresans mounting medium (Dako, S3023) kullanılarak lamalar üzerine kapatılmıştır. Negatif kontrollere sadece birincil antikor yerine % 1.5'lik FBS içeren PBS konulmuş, bu adımın dışındaki tüm işlemler aynı şekilde uygulanmıştır. Görüntüler değerlendirmeleri ve fotoğraf çekimi epifloresans mikroskop (Nikon Eclipse E600) kullanılarak yapılmış ve Macprobe (PCI Sientific Systems, USA) software sistemiyle değerlendirilmiştir.

3.9.Yara İyileşmesi testi İle Hücre Hareketliğinin Tespiti

Hücreler 10×10^4 olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına % 10 FCS'li ortamda ekilip, % 70 yoğunlukta olduklarında pipet ucuyla yara oluşturulup yüzeyden kalkan hücreler PBS ile yıkanmış, inhibitörlü ve normal olan yeni ortamlar konulmuştur. 12-16 saat sonra yara bölgesine göç eden hücrelerin durumunu gözlemlemek için fotoğraf çekilmiştir. Ardından PBS ile yıkayıp soğuk metanol ile fiske edilmiş ve % 0.2'lik kristal viyole ile boyanmış ve faz kontrast mikroskobunda fotoğrafları çekilmiştir. Deneyin akış şeması aşağıdaki gibidir.

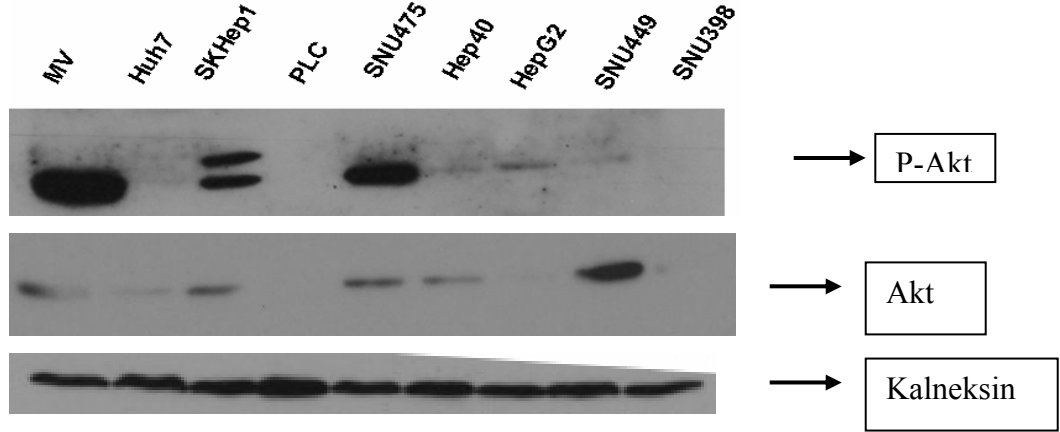


BULGULAR

3.1. HCC Hücre Dizilerinde Kendiliğinden Aktif PI3K/Akt Yolağının Belirlenmesi

3.1.1. Serum Açlığı Koşullarında Üretilen Hücrelerde Bazal P-Akt Proteinin Varlığı

Serum açlığında üretilen HCC hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının aktif olup olmadığına bakmak amacıyla bu hücrelerden elde edilen total hücre lizatında P-Akt proteininin varlığına western blotlama yöntemi ile bakıldı. Buna göre, incelenen 9 HCC hücre dizisinden yalnızca 3 tanesinde (Mahlavu, SNU-475, SKHep-1) dikkat çekici düzeyde P-Akt proteinine rastlandı (Şekil 3.1). Hücrelerin üretilme koşullarında sinyal yollarını uyarıcı hiçbir etken olmadığı için, bu deney sonucu bize bu hücrelerin PI3K/Akt yolağını uyaran faktörleri kendiliğinden salgılayabilme özelliğinde olduklarını düşündürdü.



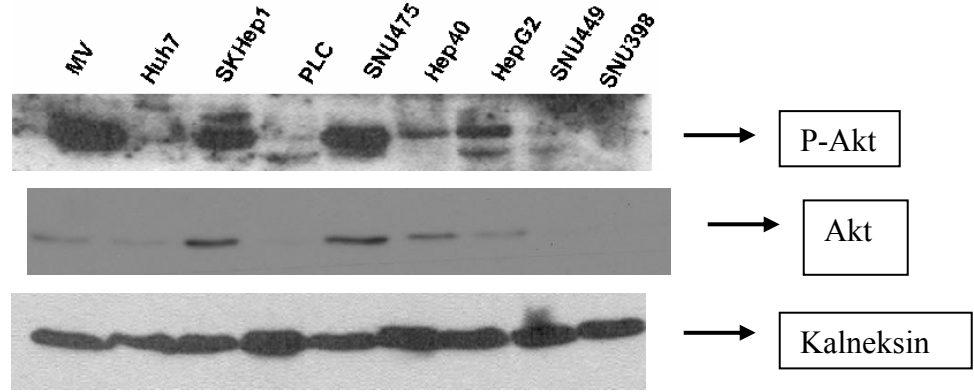
Şekil 3.1. Serumsuz ortamda HCC hücre hatlarında P-Akt protein seviyesi

3.2. HCC Hücre Dizilerinde Serum ya da Büyüme Faktörleri ile PI3K/Akt Sinyal Yolağının Uyarılması

3.2.1. Serum İçeren Koşullarda Üretilen Hücrelerde P-Akt Proteinin Varlığı

Western Yöntemiyle Belirlenen P-Akt Proteinin Varlığı

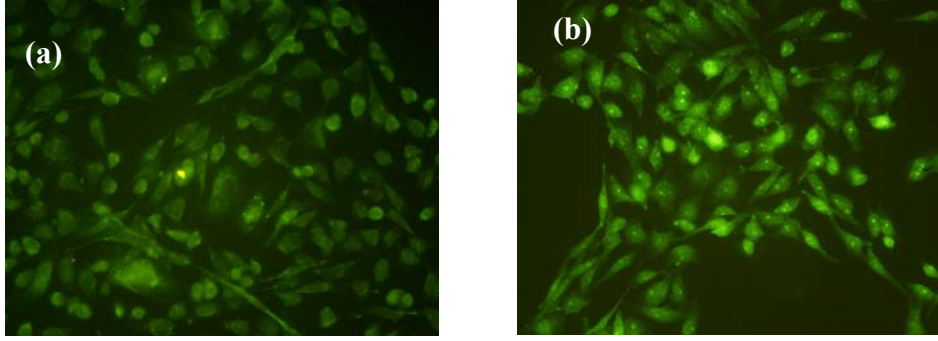
HCC hücre dizilerinin normal kültür koşullarında, başka bir deyişle, % 10 FCS içeren ortamda üretilmelerinden sonra elde edilen hücrelerden hazırlanan protein lizatları kullanılarak, serum uyarımı ile PI3K/Akt yolağı aktivasyonunu incelemek üzere, P-Akt düzeyine western blotlama yöntemiyle bakıldı. Bu deneyin sonucunda, kendiliğinden aktif olan Mahlavu, SNU-475, SK-Hep1 hücrelerine ek olarak, SNU-449, Hep40, HepG2 hücreleri farklı seviyelerde fakat diğer hücrelere göre oldukça fazla miktarda P-Akt proteinini içerdiği gözlemlendi (Şekil 3.2).



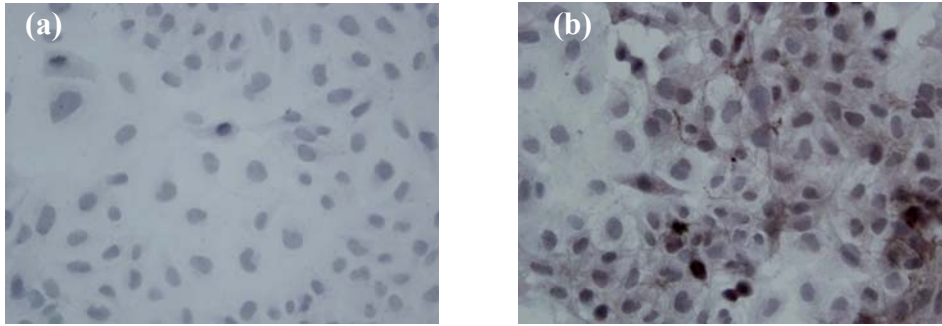
Şekil 3.2. %10 FCS' li ortamda HCC hücre hatlarında P-Akt protein seviyesi

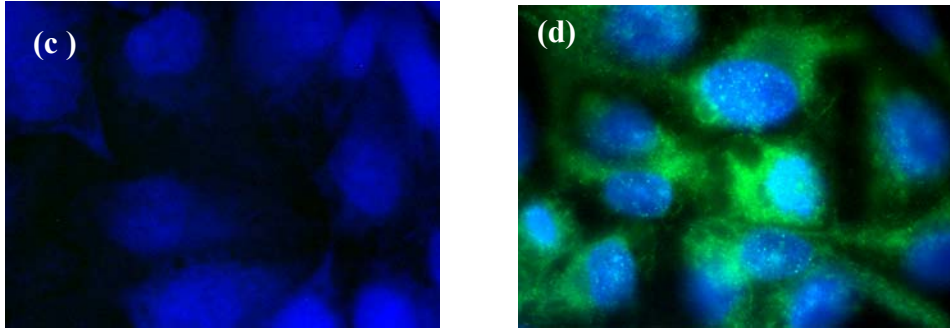
İmmunoboyama Yöntemleri ile Belirlenen P-Akt Proteini

Western blotlama yöntemiyle belirlenen P-Akt proteinin varlığı, aynı koşullarda HCC hücre hatlarında immünfloresan ve immünositokimya yöntemleri kullanarak doğrulanmıştır. Şekil 3.3'de serum varlığında SK-Hep1, Şekil 3.4'de Mahlavu hücrelerinde sırasıyla immünositokimya ve immünofloresan yöntemiyle, negatif kontrole göre hem sitoplazmik hem de çekirdekte pozitif olan P-Akt proteini gösterilmiştir.



Şekil 3.3 SK-Hep1 hücrelerinde serum varlığında P-Akt immunoboyaması **a**-negatif kontrol, **b**- P-Akt boyamasıdır. Zıt boya olarak DAPI kullanılmıştır.

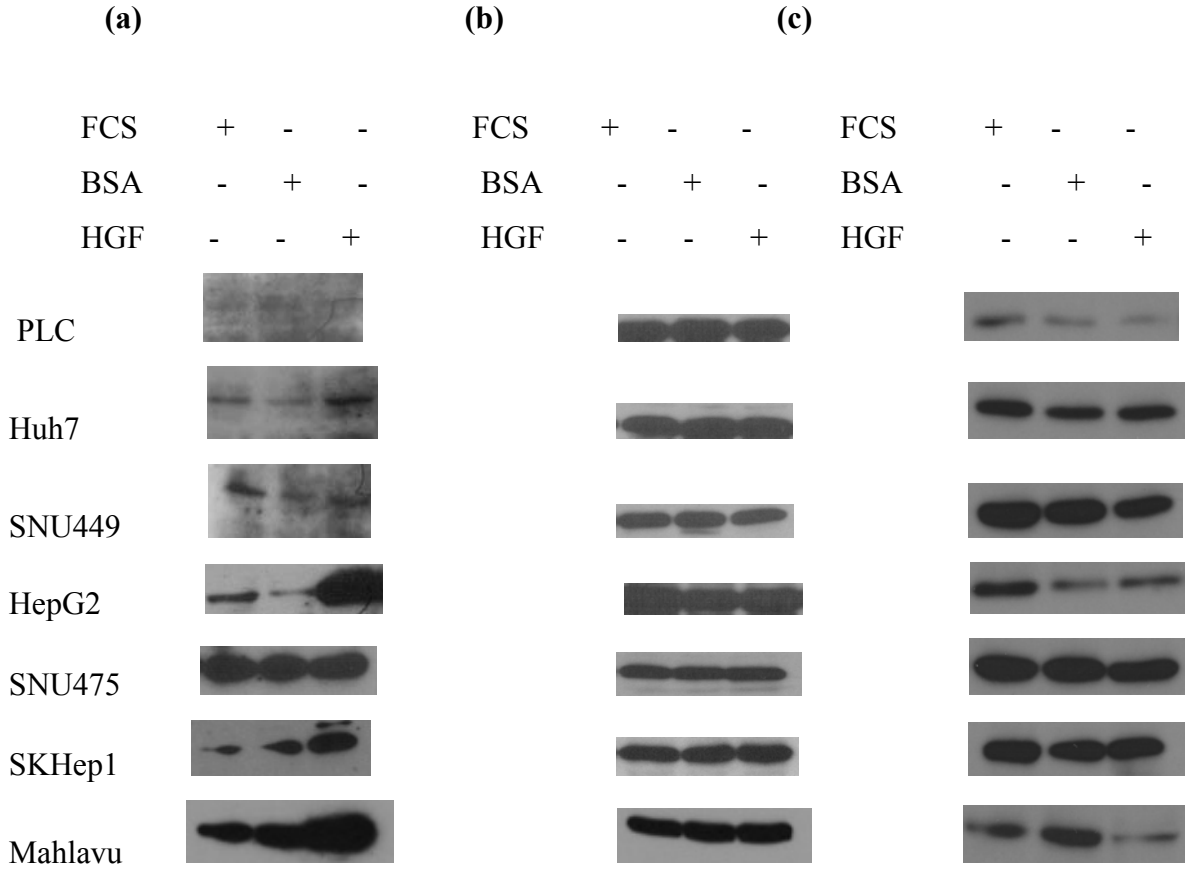




Şekil 3.4. Mahlavu hücrelerinde serum varlığında P-Akt immunoboyaması **a-**İmmünohistokimya negatif kontrol, **b-** İmmünohistokimya P-Akt boyamasıdır. Zıt boya olarak hematoxilen kullanılmıştır. **c-** İmmünfloresan negatif kontrol **d-** İmmünfloresan P-Akt boyamasıdır. Zıt boya olarak DAPI kullanılmıştır

3.2.2. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) Uyarılması ile PI3K/Akt Aktivasyonu

9 HCC hücre dizisinde, %10 FCS'li, serumsuz, ve 40ng/ml HGF içeren serumsuz ortamda 24 saat üretilen hücrelerden elde edilen protein lizatlarında P-Akt protein düzeyindeki değişimlere bakıldı (Şekil 3.5). Bu deney koşullarında SNU-398 ve Hep40 de P-Akt proteinine hiç rastlanmadığı için incelemeye alınmadı. Sonuç olarak burada, PLC ve SNU 475 hücrelerindeki PI3K/Akt sinyal yolağı aktivasyonu farklı koşullardan etkilenmezken, HepG2, SKHep1, Huh7 ve Mahlavu hücrelerinin üreme koşullarından serum çıkarıldığında beklenen şekilde, bu yolağın aktivasyonunda yani bunun göstergesi olarak P-Akt protein düzeyinde azalma gözlenmiştir. Yine etkilenen bu hücrelerde, buna HGF uyarımı yapıldığında beklenen şekilde PI3K/Akt sinyal yolağı aktivasyonu ve bunun göstergesi olarak P-Akt protein düzeyinde çok net bir artış görülmüştür. PLC ve SNU 475 hücrelerinde HGF reseptörü olan c-met transkriptleri olduğu halde (N. Atabey veri) büyüme faktörü uyarımı ile IP3K/Akt yolağı aktivasyonunun etkilenmemesi dikkat çekicidir.



Şekil 3.5. Farklı koşullarda üretilen HCC hücre dizilerinde PI3K/Akt yolağı aktivasyonu **a-** Tüm hücre dizilerinde P-Akt proteinini **b-** Eşit yükleme kontrolü için kalneksin proteinini **c-** Akt proteinini

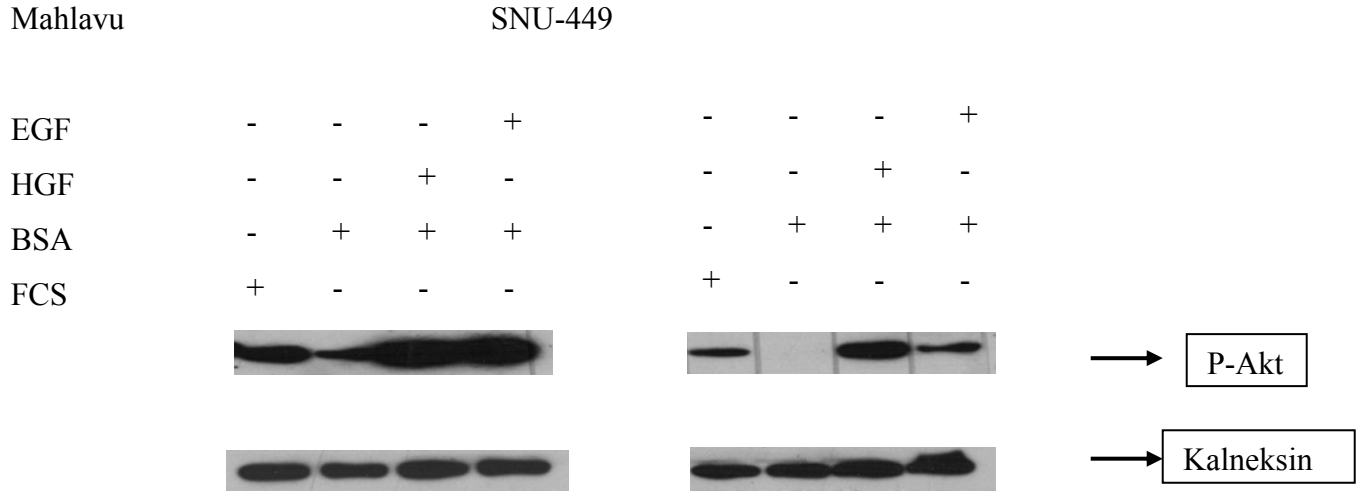
Bu verilerin ışığında HCC hücre hatlarının farklılaşma derecelerini ve PI3K/Akt yolaklarının aktivasyon durumunu bir tabloda özetleyecek olduğumuzda farklılaşma düzeyi zayıf olan hücre hatlarında diğerlerine göre daha yüksek PI3K/Akt yolak aktivasyonu varlığı gözlemlenmiştir.

Tablo.3.1 Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağı aktivasyonu ve farklılaşma dereceleri

| HCC hücre hatları | Serumsuz ortam | Serumlu ortam | Farklılaşma düzeyleri |
|-------------------|----------------|---------------|-----------------------|
| MV | ++++ | ++++ | Zayıf |
| SNU 475 | +++ | +++ | Zayıf |
| SK-Hep1 | ++ | ++ | Zayıf |
| HepG2 | (+/-) | + | İyi |
| SNU 449 | (+/-) | +/- | Zayıf |
| Hep40 | - | +/- | İyi |
| Huh7 | - | +/- | İyi |
| PLC | - | - | İyi |
| SNU 398 | - | - | İyi |

3.2.3. Mahlavu ve SNU-449 Hücrelerinde HGF ya da Epidermal Büyüme Faktörüyle (EGF) uyarılması ile PI3K/Akt Aktivasyonu

%10 FCS'li, serumsuz, 15 dakika 40ng/ml HGF uyarımlı ya da 5 dakika 10ng/ml EGF uyarımlı serumsuz ortamlarda, 48 saat üretilen Mahlavu ve SNU-449 hücrelerinde PI3K/Akt yolağının aktivasyonundaki değişimler incelenmiştir. Şekil 3.6'da gösterildiği gibi bu deneyin sonucunda iki hücre dizisinde de ortamda serumun olmamasın P-Akt seviyesinde azalmaya neden olduğu, her iki büyüme faktörünün de sinyal yolağı aktivasyonunu ve buna bağlı olarak P-Akt seviyesini arttırdığı bulunmuştur. Mahlavu hücreleri daha önceki deneylerimizde gösterdiğimiz gibi, kendiliğinden PI3K/Akt aktivasyonu sağlayacak yapıda olduklarından serumsuz ortamda P-Akt seviyesi SNU-449 hücrelerindeki kadar azalmazken, SNU-449 hücrelerinde de EGF uyarımlı ortamda P-akt seviyesi Mahlavu hücrelerindeki kadar artmamıştır.

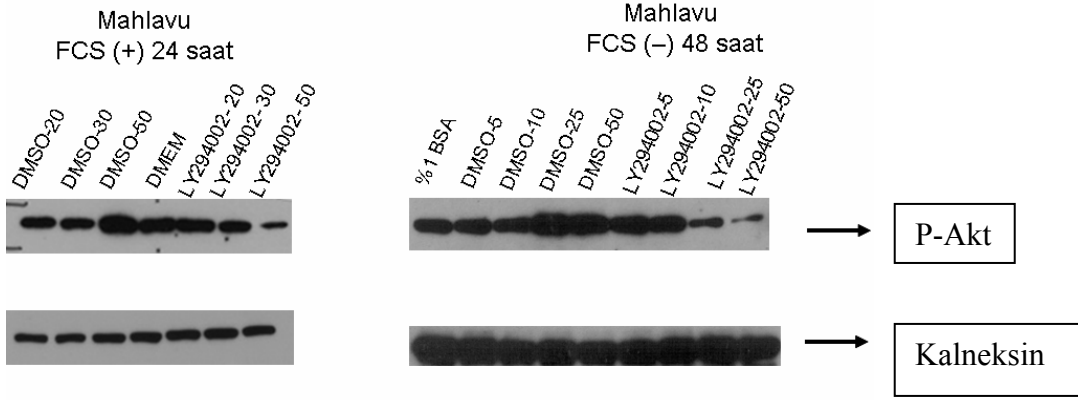


Şekil 3.6. Mahlavu ve SNU-449 hücre dizilerinde FCS, HGF ve EGF'in P-Akt protein miktarı üzerine etkisi

3.3. PI3K/AKT yolağının özgün inhibitör, LY294002 ile baskılanması

3.3.1. Mahlavu Hücrelerinde Doza Bağımlı Olarak P-Akt Düzeyinde Azalma

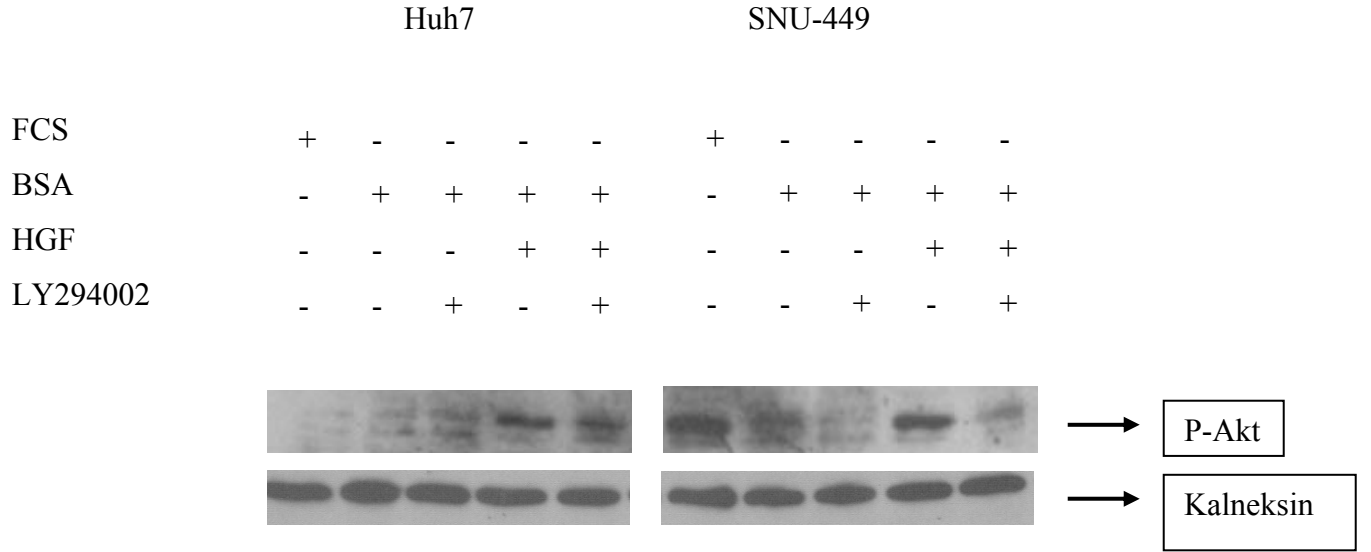
HCC hücrelerinde, PI3K/Akt yolağının özgün inhibitörü olan LY294002'nin doza bağımlı etkisini belirlemek üzere, farklı dozlarda inhibitör kullanılarak normal koşullarda 24 saat, bazal koşullarda 48 saat üretilen kendiliğinden aktif Mahlavu hücrelerinde P-Akt düzeyindeki değişimlere bakıldı. Deneylerde kullanılan doz aralıklarına, HCC'ler için toksik dozun belirlendiği ön optimizasyon deneylerine (veri gösterilmedi) ve literatür verilerine göre karar verildi (28-35). Buna göre Mahlavu hücrelerinde LY294002'nin doza bağımlı olarak 24 ve 48 saatte FCS'li ve FCS'siz ortamda 25µM düzeyinde P-Akt seviyesinde belirgin azalmaya neden olduğu gözlemlenmiş olup bundan sonraki deneylerde bu aralıklarda inhibitör kullanımı uygun görülmüştür.



Şekil 3.7 Mahlavu hücre dizisinde LY294002'nin P-Akt seviyesi üzerine doz bağımlı etkisi

3.3.2. Bazal ve HGF ile Uyarılarak PI3K/Akt Sinyal Yolağı Artırılmış Huh7 ve SNU-449 Hücrelerinde LY294002 Kullanılarak P-Akt Düzeyinin Azaltılması

Huh7 ve SNU-449 hücre dizileri sırasıyla %10 FCS'li, %1 BSA'lı, %1 BSA + HGF'li, %1 BSA'lı ve inhibitörlü, %1 BSA'lı + HGF + inhibitörlü ortamlarda 48 saat boyunca büyütülmüş ve protein izolasyonundan hemen önce HGF ile indüklenecek olan koşullar 40ng/ml HGF ile 15 dakika boyunca indüklenip, protein izolasyonu yapılmıştır. Şekil 3.8'de gösterildiği gibi Huh7 ve SNU-449 hücrelerinde HGF uyarımı ile artmış olan PI3K/Akt aktivasyonu, LY294002 inhibitörü ile baskılanmıştır.



Şekil 3.8 Huh7 ve SNU-449 hücre dizilerinde LY294002 ve HGF'in ayrı ayrı ve birlikte P-Akt üzerine etkileri

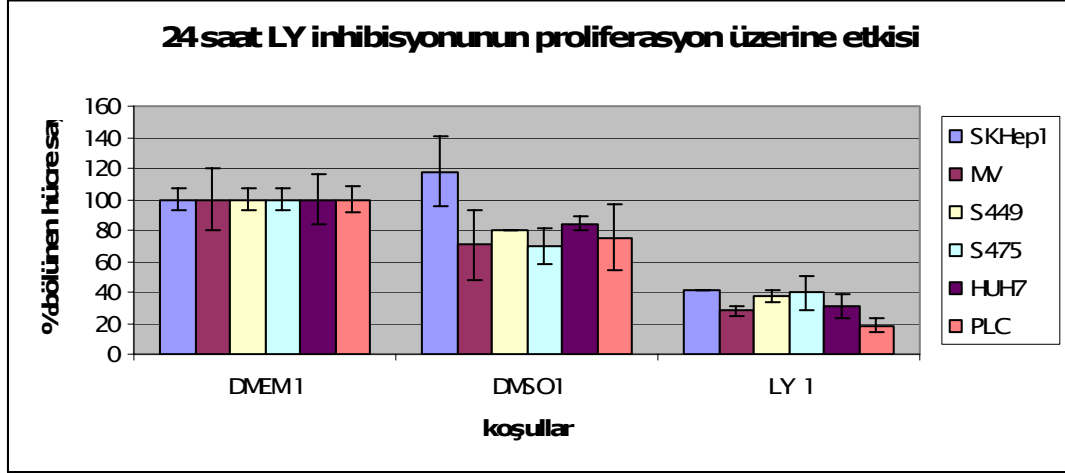
3.4. PI3K/AKT yolağının özgün inhibitör, LY294002 ile baskılanmasının Hücre Biyolojik Davranışları Üzerine Etkileri

3.4.1. PI3K/Akt İnhibisyonunun HCC Hücrelerinde Proliferasyonu Farklı Düzeylerde Azaltması

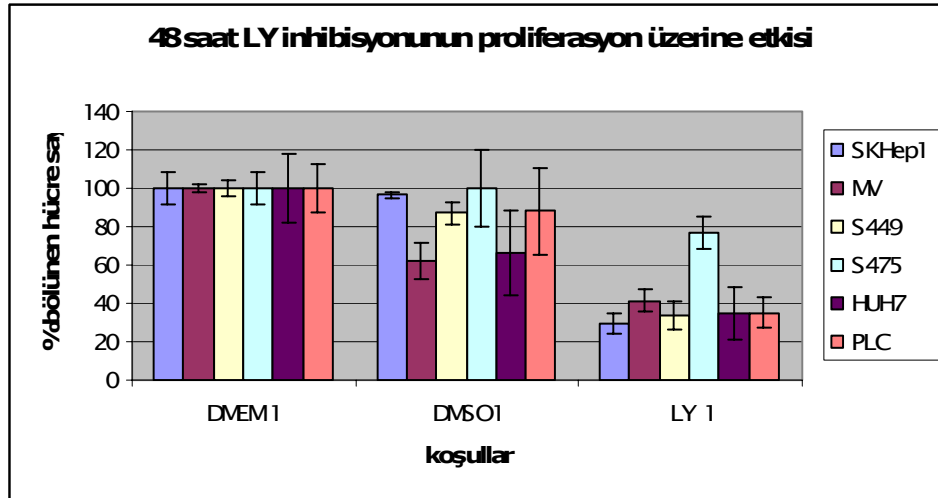
HCC hücre dizilerinde 24 ve 48 saat LY294002'nin proliferasyondaki etkisine bakmak amacıyla, BrdU inkooperasyon yöntemi ile bölünen hücre sayısındaki değişim değerlendirilmiştir. HepG2 ve SNU-398, Hep40 hücre dizilerinde teknik nedenlerden dolayı bu yöntem uygulanamadığından Huh7, Mahlavu, SNU449, SNU475, PLC, SKHep1 hücreleri kullanılmıştır.

Buna göre, HCC hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağı inhibisyonu, farklı düzeylerde olmakla birlikte, çözücü ve normal kontrolleri ile kıyaslandığında ortalama %50 civarında

bölünen hücre miktarında ya da başka bir deyişle hücre proliferasyonunun da azalmaya neden olmuştur. En belirgin azalma ise 24 ve 48 saatte SKHep-1 hücrelerinde gerçekleşmiştir (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10).



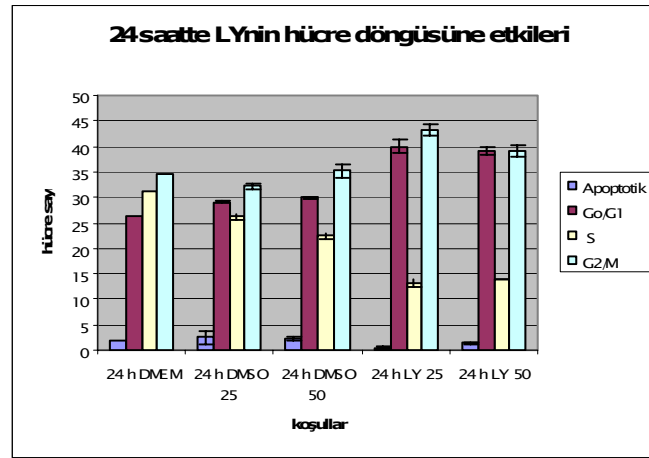
Şekil 3.9 Serum varlığında 24 Saatlik 25µm LY294002 inhibisyonunun hücre proliferasyonuna etkisi



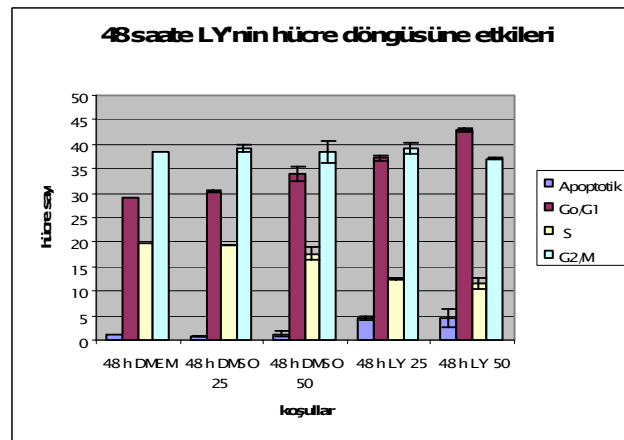
Şekil 3.10 Serum varlığında 48 Saatlik 25µM LY294002 inhibisyonunun hücre proliferasyonuna etkisi

3.4.2. PI3K/Akt İnhibisyonunun Mahlavu Hücrelerini G1 Evresinde Durdurması

Mahlavu hücre dizisinde 24 ve 48 saatlik deney setinde LY294002 inhibitörünün 25 ve 50 μ M'lık iki konsantrasyonu kullanılıp DNA Prep. Coulter Reagents kitiyle FACS analizi yapılmıştır. İnhibitörün her iki konsantrasyonu 24 ve 48 saatte G0/G1 fazında birikme yaratırken sentez fazına giren hücre sayısında azalmaya neden olmuştur.



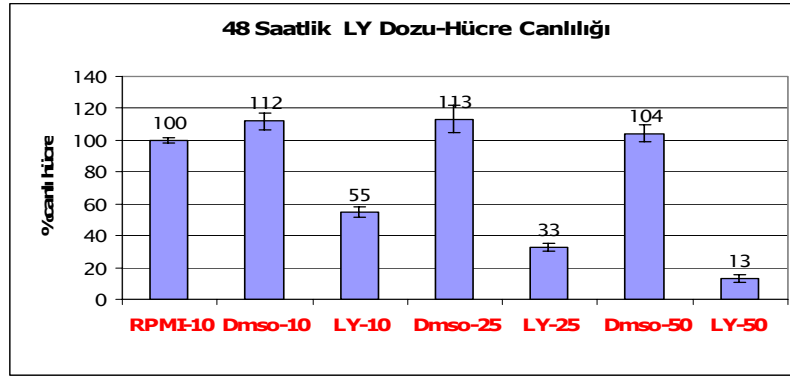
Şekil 3.11 Serum varlığında üretilen Mahlavu hücrelerinde LY294002'nin 24 saatte hücre döngüsü üzerine etkileri



Şekil 3.12 Serum varlığında üretilen Mahlavu hücre dizisinde LY294002'nin 48 saatte hücre döngüsü üzerine etkileri

3.4.3. PI3K/Akt İnhibisyonunun SNU449 Hücrelerinde Doz Bağımlı Olarak Canlılığı Azaltması

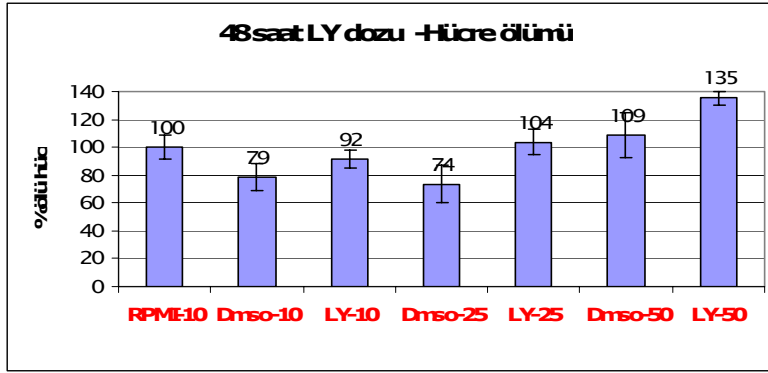
SNU-449 hücre dizisi ile 48. saatte CellTiter 96 AQ One Solution Cell Proliferation kitiyle yapılan hücre canlılık analizinde 25 μM 'lık dozun, biyolojik yanıt çalışmaları için uygun olduğu 50 μM 'lık dozun ise hücre canlılığını çok azalttığından toksik geldiği gözlemlenmiştir.



Şekil 3.13 Serum varlığında üretilen SNU-449 hücrelerinde LY294002'nin farklı dozlarda canlılık üzerine etkisi

3.4.4. PI3K/Akt İnhibisyonunun SNU-449 Hücrelerinde Doz Bağımlı Olarak Hücre Ölümünü Arttırması

SNU-449 hücre dizisi ile 48. saatte CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kitiyle yapılan hücre ölümü analizlerinde her iki dozunda hücre ölümünü çok fazla etkilemediği gözlemlenmiştir.



Şekil 3.14 Serum varlığında üretilen SNU-449 hücre dizisinde LY294002'nin farklı dozlarda hücre ölümü üzerine etkisi

3.4.5. PI3K/Akt Yolağının H¼cre Hareketliliğine Etkisi

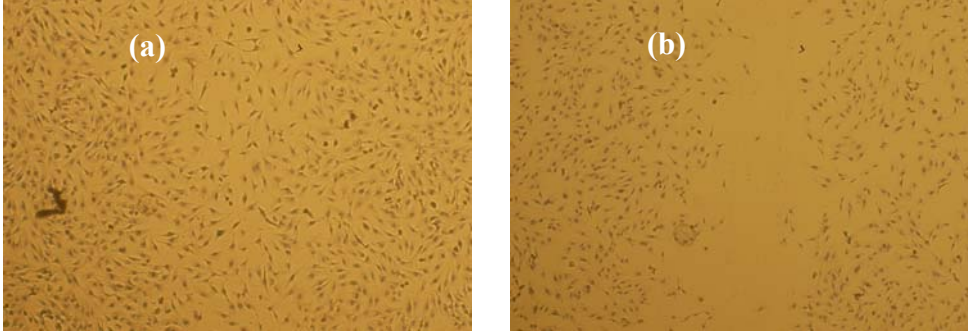
HCC h¼cre dizilerinin normal k¼lt¼r koşullarında, başka bir deyişle, % 10 FCS i¼eren ortamda ¼retildiklerinde yara oluşumundan 48 saat sonraki yara kapatma dereceleri g¼zlemlenmiř(şekil g¼sterilmedi) ve tablo 3.2'de g¼r¼ld¼đ¼ gibi P-Akt seviyesi ile h¼cre motilitesi arasında bir korelasyon bulunmuştur.

Tablo 3.2. Hepatosell¼lar karsinoma h¼crelerinde IP3K/Akt sinyal yolağı aktivasyonu ve h¼cre motilitesi

| HCC h¼cre hatları | Serumlu ortam P-Akt proteini | H¼cre motilitesi |
|-------------------|------------------------------|------------------|
| MV | ++++ | ++++ |
| SNU 475 | +++ | +++ |
| SK-Hep1 | ++ | ++ |
| HepG2 | + | - |
| SNU 449 | +/- | + |
| Hep40 | +/- | - |
| Huh7 | +/- | - |
| PLC | - | incelenmedi |
| SNU 398 | - | - |

SNU-475 Hücrelerinde PI3K/Akt İnhibisyonunun Hareketliliği Durdurması

SNU-475 hücre dizisinde 24 saatlik yara oluşumu deneyi yapılmış ve yara oluşumundan sonra inhibitör eklenmiştir. Şekil 3.15’de gösterildiği gibi 24 saatin sonunda kontrole göre yaranın kapanmadığı gözlemlenmiştir.

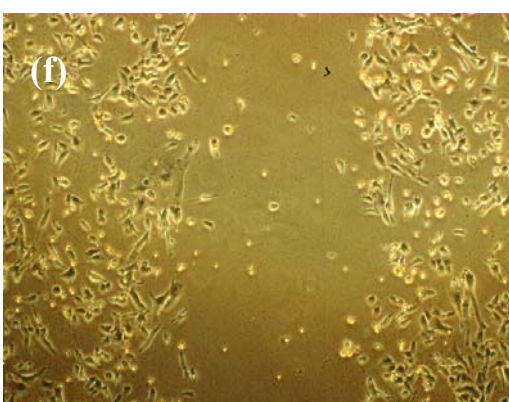
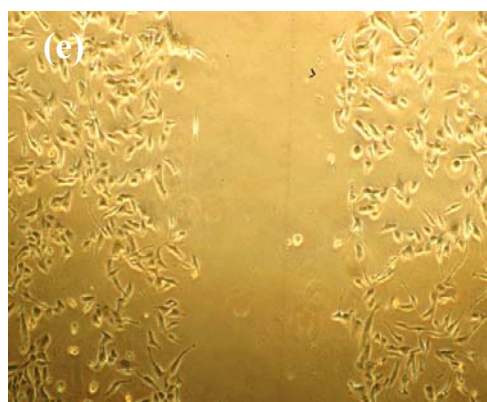
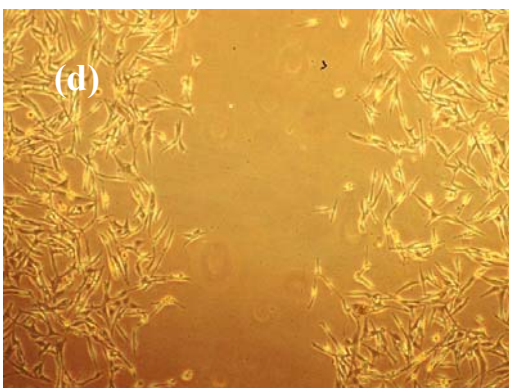
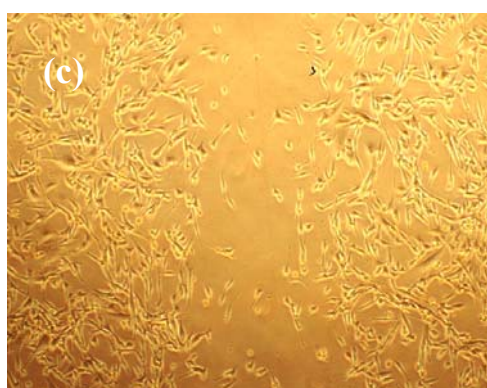
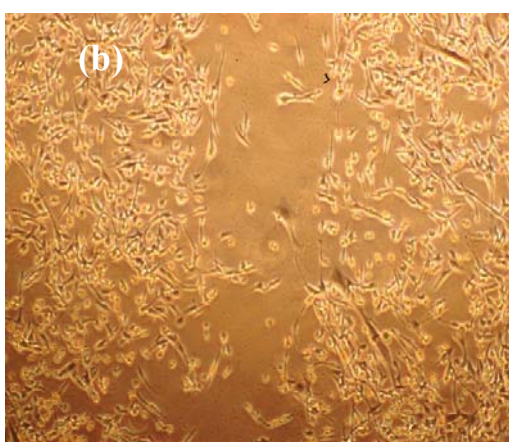
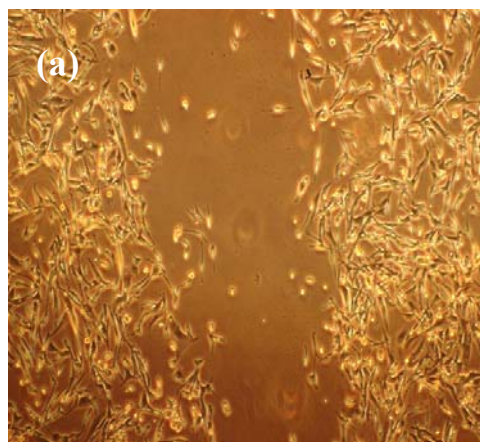


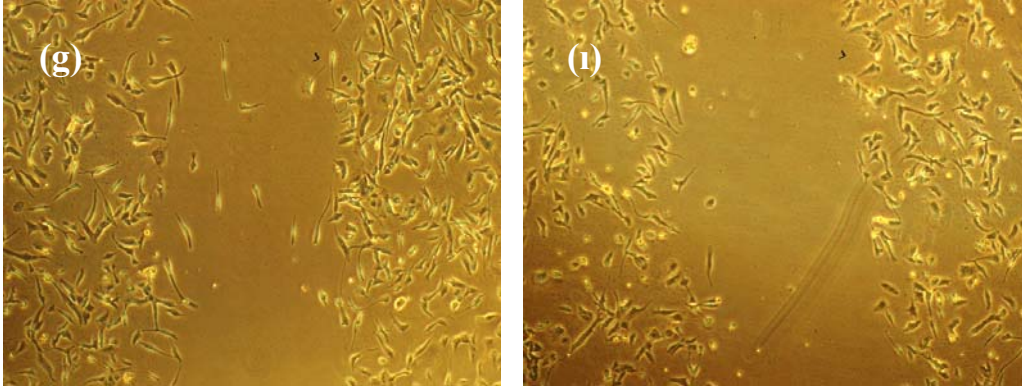
Şekil 3.15 SNU-475 hücre dizisinde 25µM LY294002 yara iyileşmesini üzerine etkisi

a-İnhibitörsüz ortamdaki SNU-475 hücreleri **b-** İnhibitörlü ortamdaki SNU-475 hücreleridir.

PI3K/Akt Aktivasyonunun Hücre Hareketliliğini Artırması ve Aktiflenmiş Yolağın İnhibisyonunun SKHep-1 ve SNU449 Hücrelerinde Hareketliliği Durdurması

Deney setinde yara oluşturulduktan sonra SKHep1 ve SNU449 hücreleri, serumlu, serumsuz, serumsuz ortamda HGF ile birlikte ve serumsuz ortamda HGF ve de LY294002 inhibitörüyle birlikte 24 saat büyütüldüklerinde, Şekil 3.16’da görüldüğü gibi serum varlığının hücre hareketliliğini az miktarda etkilediği, HGF varlığında ise bu etkinin biraz daha arttığı, LY inhibitörü kullanımında ise HGF’in etkisinin baskılandığı gösterilmiştir.





Şekil 3.16 SKHep-1 ve SNU449 hücre dizilerinde serum ve HGF ve HGF ile birlikte 25µM LY294002 varlığının yara iyileşmesini üzerine etkisi

a-Serumsuz ortamdaki **b**-Serumlu ortamdaki **c**-HGF'li ortamdaki **d**-HGF ve LY inhibitörünün birlikte bulunduğu ortamdaki SKHep-1 hücreleridir.

e- Serumsuz ortamdaki **f**- Serumlu ortamdaki **g**- HGF'li ortamdaki **ı**- HGF ve LY inhibitörünün birlikte bulunduğu ortamdaki SNU449 hücreleridir.

TARTIŞMA

PI3K/Akt sinyal yolağı, hücre sağ kalımı ve proliferasyon, dolayısı ile tümör gelişiminde önemli bir yere sahiptir. Çeşitli kanser tiplerinde, bu yolağın ara mesajcısı olan ve Akt onkogeni olarak da tanınan protein kinaz B (PKB/Akt) aşırı aktif hale geçmektedir. Hepatosellular karsinoma gelişim sürecinde PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ya da bunun hücreye etkileri üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Buna rağmen, HCC’de kontrolsüz aktivasyonu sağlayabilecek IGF döngüsü bozukluklarına yaklaşık % 30 oranında (36, 37) yine PI3kinaz inhibitörü olan pTEN’deki mutasyonlar % 27 oranında (9), delesyon ve promotor aktivite kayıplarına da sıklıkla (9, 10, 11, 12, 13, 14) rastlanması bu yolağın hepatokarsinogenez sürecindeki önemine işaret etmektedir. Buna ek olarak bir çalışmada (38) tedavi amaçlı rezeksiyon sonrasında PKB/Akt aktivasyonunun göstergesi olan Akt fosforilasyonunun, rekürrens için önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, HCC PI3K/Akt yolağının aktif olup olmadığının belirlenmesi ve bu yolak inhibisyonu ile kanser hücre davranışlarının nasıl etkileneceğinin anlaşılması özellikle son yıllarda bu yolağın herhangi bir basamağına karşı üretilen çok özgün inhibitörlerin HCC tedavisinde kullanılabilme geçerliliğine katkıda bulunacaktır (38, 28, 26, 29, 31).

Temel olarak bu çalışmada HCC hücre dizilerinde PI3K/Akt sinyal yolağının önemini aydınlatmak amaçlanmıştır. Bu amaçla yolağın aktivasyonu halinde artan serine 473’den fosforile Akt (P-Akt) proteinin varlığına western blotlama ve immunoboyamalarla incelenmesi yöntemleri benzeri çalışmalarda da özgün olması nedeniyle tercih edilmektedir (38, 28, 26, 39, 40, 41).

Çalışmamızda kullanılan 9 HCC hücre dizisinde 3 tanesinde (Mahlavu, SK-Hep1 ve SNU475) bu yolağın kendiliğinden aktif olduğu belirlenmiştir. Mahlavu ve SNU475 hücrelerinde gözlemlenen aşırı aktivasyonu açıklayabilen mekanizmalardan birinin, bu hücrelerde negatif düzenleyici olan pTEN’in bulunmaması (M.Öztürk yayınlanmamış veri) olduğu düşünülmektedir. Yine 4 HCC hücresinde bazal koşullarda kendiliğinden aktif olarak nitelendirdiğimiz hücelere oranla oldukça az aktivasyonun görüldüğu hücelerde (HepG2, SNU 449, Hep40, Huh7) serum ya da büyüme faktörü uyarımı ile aktivasyon düzeyinin artması ve inhibitörle azaltılması, bu yolağın HCC’lerde büyük oranda farklı seviyelerde aktif ve düzenlenebilir olduğunu göstermiştir. Huh7, SNU-475 ve SKHep1 hücrelerinde total Akt protein düzeyinin serum yokluğunda ve HGF uyarımında değişmemiş olduğu gözlemlenmiştir.

Bununla beraber MV, Huh7, PLC, HepG2 ve SNU-449 hücrelerinde total Akt protein düzeyi, serum yokluğunda ve HGF uyarımında değişmiştir.

PI3K/Akt yolağı aktivasyonunda gözlemlenen artış, özellikle prostat, meme ve yumurtalık kanserinde de çeşitli gruplarca bildirilmiş olup yine bunlardan hasta dokularında yapılan çalışmalarda bu artışın tümör derecesi, aşamaları ve kötü prognozla sıkı bir bağlantı içerisinde olduğu gösterilmiştir (9, 40, 41, 42, 51). Buna ek olarak farklı çalışmalarda PI3K/Akt devamlı ya da kontrolü aktivasyonunun meme, glioblastom, kolon kanserinde ve hepatosellüler karsinomada proliferasyonu arttırdığı (43, 42, 44, 45) ve sitoplazmik p27 birikimini devamında G1 hücre durmasını ortadan kaldırdığı (46) bulunmuştur. Bunun yanında PI3K aktiflenmesiyle yapışma bağımsız büyümenin arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (50). Bunun tersi olarak PI3K/Akt yolağı inhibisyonu ile birçok araştırmacı, kanser hücrelerinin çeşitli aşamalarda tümorojenik özelliklerini inhibe etmeyi başarmıştır. Kolon adenokarsinoma hücrelerinde PI3K inhibitörü wortmannin kullanılarak P-Akt'ı baskıladıklarında yapışma bağımsız büyümenin ve yumuşak agarda koloni oluşumunun azaldığı gösterilmiştir. (41). Başka bir çalışmada hematopoetik hücre hatlarında PI3K özgün inhibitörü LY294002 kullanıldığında hücre canlılığının azaldığı ve apoptozda artış olduğu gösterilmiştir (30). Yumurtalık hücre hatlarıyla yapılan bir diğer çalışmada PI3K spesifik inhibitörü LY294002 kullanımının proliferasyon inhibisyonu ve hücre döngüsünde G1 aşamasında duraklama yarattığı, bu duraklamanın ise cycD1, CDK4, CDC25, p21 inhibisyonu ve p16 aktivasyonu ile PI3K/AKT/mTOR üzerinden olduğu bulunmuştur (47). PI3K/Akt inhibisyonunun tümör hücre proliferasyonları üzerine bildirilen bu sonuçlara benzer olarak bizim çalışmamızda, yine literatürde çoğunlukla inhibisyon için tercih edilen LY294002 maddesini kullanarak HCC hücrelerinde bölünen hücre sayısında ve/veya proliferasyonda azalmaya rastlanmıştır. Bir diğer bulgu olarak PI3K/Akt aktivasyonu yüksek olan Mahlavu hücrelerinde gözlemlenen G1 evresindeki durma, HCC'ler için daha önce bir çalışmada bildirilmiştir (28). HCC hücre hatlarıyla yapılan bir çalışmada Akt yolağının metastatik molekülleri ve metastatik fenotipi artırdığı ortaya konmuştur (48). PI3K/Akt yolağının metastasla ilişkisini aydınlatmak için yapılan Nakanishi ve ark. 2002 yılında yaptığı çalışmada, beş HCC hücre hattının P-Akt düzeylerine incelenmiş ve yumuşak agarda kloni oluşturma ile P-Akt düzeyleri arasında sıkı bir bağlantı bulunmuştur. Bunlar arasında en yüksek P-Akt düzeyine sahip olan hücre hattı LY294002 inhibitörü ile muamele edilince koloni oluşturma potansiyeli azalmış ve hücreler hücre döngüsünün G1 aşamasında duraklamışlardır (28).

PI3K/Akt yolağı direk inhibisyonunun HCC hücrelerinde hücre hareketliliği üzerine engelleyici etkisi ise çalışmamızda ilk kez bildirilmiş olmasına rağmen bu yolağın hücre motilitesindeki bilinen etkileri sınırlıdır. Wang ve ark.'lerin 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada HepG2 hücrelerinde HGF recept r  olan c-Met'i inhibe ederek invazyonda azalma olduğu gösterilmişse de bu etkinin Akt ya da ERK1/2 üzerinden olduğu kesin değildir (35). Akt EGF, HGF, IGF, insülin gibi çeşitli faktörlerin reseptör uyarımları ile aktive olduğundan ve bu uyarımların başka birçok molekülü aktive etmesinden dolayı hücre davranışındaki biyolojik yanıtların direk Akt bağımlı olduğunun belirlenmesi önemlidir. Bu açıdan literatürü inceleyecek olursak son yıllarda PI3K ve Akt aktivitesini negatif etkileyen pTEN'in hücre gücü ve hücre polaritesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (32, 33). Yine kanser hastalarında yapılan klinik çalışmalar da Akt ekspresyonu artmış tümöre sahip olanların daha invazif ve kötü prognozla ilintili metaztatik özellikte hastalıklara sahip oldukları bildirilmiştir (20, 34, 49). Tüm bunlar Akt'ın kendi başına hücre gücü ve invazyonunda bulunduğunu işaret etse de moleküler düzeyde nasıl hücre içi iskeletini ve böylelikle hareketliliği düzenlediği bilinmemektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER:

Yukarıda sunulan bulguların ışığında, HCC hücrelerini başlıca 3 ana gruba toplamak mümkün olacaktır (Tablo 5.1).

1. Kendiliğinden (konstitütif) aktif PI3K/Akt sinyal yolağına sahip olanlar; MV, SNU-475 ve SK-Hep1. Bu sonucu MV ve SNU-475 hücreleri için, PI3K/Akt yolağına negatif düzenleyicisi olan pTEN proteininin bulunmaması (M.Öztürk veri) açıklayabilmektedir.

2. Kendiliğinden aktif olmayan, fakat serum ve büyüme faktörü etkisiyle indüklenebilenler; HepG2, SNU 449, Hep40, Huh7. HepG2 hücrelerinde HGF uyarımı ile oluşan Akt yolağı aktivasyonundaki artış dikkat çekici şekilde olması bu hücrelerde HGF reseptörü olan c-Met'in çok yüksek oranda eksprese olması (N. Atabey veri) ve embryonik kökenli hepatoblastom olması ile açıklanabilmektedir.

3. PI3K/Akt aktivasyonu olmayanlar; PLC ve SNU 398. HGF ile indüklenemeyen SNU 398 hücre dizisinde IGF uyarımı denenmiş ve P-Akt seviyesinde bir artış yine gözlenememiştir(veri gösterilmemiştir). Bu hücrelerde pTEN ekspresyonunun diğer hücre dizilerindekine oranla çok fazla olması ve yine bu hücrelerde c-met'in bulunmaması PI3K/Akt yolağına aktif olmamasını ve HGF ile indüklenememesini açıklayabilmektedir.

Tablo 5.1. Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde IP3K/Akt sinyal yolağı aktivasyonu inhibisyonu ve inhibisyonun hücre büyümesine etkisi

| HCC hücre hatları | Serumsuz ortam | Serumsuz + HGF ortam | Serumlu ortam | Serumsuz + HGF + LY29004 | Farklılaşma statüleri | pTEN ekspresyonu (protein)* | Serum LY29004 ortamda hücre büyümesinde durma** |
|-------------------|----------------|----------------------|---------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------------|---|
| MV | ++++ | +++++ | ++++ | İncelenmedi | Zayıf | - | var |
| SNU 475 | +++ | +++ | +++ | İncelenmedi | Zayıf | - | var |
| SK-Hep1 | ++ | +++ | ++ | İncelenmedi | Zayıf | ++ | var |
| HepG2 | (+/-) | +++ | + | İncelenmedi | İyi | + | *** |
| SNU 449 | (+/-) | + | +/- | +/- | Zayıf | +++ | var |
| Hep40 | - | +/- | +/- | İncelenmedi | İyi | ++ | incelenmedi |
| Huh7 | - | +/- | +/- | - | İyi | ++ | var |
| PLC | - | - | - | İncelenmedi | İyi | + | var |
| SNU 398 | - | _***** | - | İncelenmedi | İyi | ++++ | *** |

* Prof. Dr. M. Öztürk yayınlanmamış veri

** BrdU deneyi ile gösterilmiştir 24 ve/veya 48 saatlik uygulamalar denenmiştir.

*** Hücre büyüme şekilleri teknik olarak yönteme uygun olmadığından yapılamadı

(+/-): Sadece 120ug protein yüklendiğinde

**** SNU 398 hücrelerinde c-met transkripsiyon düzeyinde bulunmadığından (Prof. Dr. N. Atabey yayınlanmamış veri) bu hücrelerde HGF yanıtı olmamasını doğrulamaktadır.

Total Akt protein düzeyinin serum yokluğunda ve HGF uyarımında MV, Huh7, PLC, HepG2, SNU-449 hücrelerinde değişmesi ve Huh7, SNU-475, SKHep1 hücrelerinde değişmemesini aydınlatmak üzere çalışmalarımız devam etmektedir.

Bu veriler doğrultusunda yolağın PI3K spesifik inhibitör ile baskılanabildiği ve bu baskılanmanın, HCC hücrelerinde bölünen hücre sayısını ve/veya proliferasyonu azalttığı gözlemlenmiştir. Bu verilere ek olarak PI3K/Akt yolağı baskılanmasının hücre döngüsünde

G1 de duraklamaya neden olduğu ve HCC hücrelerinde hücre motilitesi üzerine engelleyici etkisinin var olduğu ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

1. Bruix J, Boix L, Sala M., Llovet J. M., Focus on hepatocellular carcinoma, *Cancer Cell* March 2004
2. Tang Z. Y., Hepatocellular Carcinoma-Cause Treatment and Metastasis, *World J Gastroenterol* 2001;7(4):445-454, 2001
3. Feitelson M. A., Sunl B., Tufan N. L. S., Liu J., Pan J., Lian Z., Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis, review, *Oncogene* 21, 2593 ± 2604, 2002
4. Buendia M. A., Genetics of hepatocellular carcinoma, *Cancer Biology* , vol.10, 2000, pp185-200
5. Farazi P. A., DePinho R. A., Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment, *Nature*, 674, Volume 6, September 2006
6. Snorri S. Thorgeirsson W., Grisham J. W., Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma, *nature genetics*, volume 31, august 2002
7. Lau S., Guan X., Cytogenetic and molecular genetic alterations in hepatocellular carcinoma, *Acta Pharmacologica Sinica* 26 (6): 659–665, Jun 2005
7. Levrero M., Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C, *Oncogene* (2006) 25, 3834-3847
8. Cha C, DeMatteo R.P., Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 19, No. 1, pp. 25–37, 2005
9. Kawamura N, Nagai H, Bando K, Koyama M, Matsumoto S, Tajiri T, Onda M, Fujimoto J, Ueki T, Konishi N, Shiba T, Emi M., PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas: somatic inactivation of both alleles in tumors, *Jpn Journal of Cancer Reserch* 1999 Apr;90(4):413-8

- 10.** Ma DZ, Xu Z, Liang YL, Su JM, Li ZX, Zhang W, Wang LY, Zha XL., Down-regulation of PTEN expression due to loss of promoter activity in human hepatocellular carcinoma cell lines, *World Journal of Gastroenterology* 2005 Aug 7;11(29):4472-,2005
- 11.** Zhang L, Yu Q, He J, Zha X., Study of the PTEN gene expression and FAK phosphorylation in human hepatocarcinoma tissues and cell lines, *Molecular Cell Biochemistry* 2004 Jul;262(1-2):25-33, 2004
- 12.** Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M, Naito M, Enomoto K, Watanabe S, Mak TW, Nakano T., Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas, *Journal of Clinical Investigation*, 2004 Jun;113(12):1774-83, 2004
- 13.** Kang-Park S, Lee YI, Lee YI., PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling; the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells. *FEBS Letter*, 2003 Jun; 19;545(2-3):203-8, 2003
- 14.** Fujiwara Y, Hoon DS, Yamada T, Umeshita K, Gotoh M, Sakon M, Nishisho I, Monden M., PTEN / MMAC1 mutation and frequent loss of heterozygosity identified in chromosome 10q in a subset of hepatocellular carcinomas, *Jpn Journal of Cancer Reserch*, 2000 Mar;91(3):287-92, 2000
- 15.** Nita M. E., Ferreira V. A., Carrilho F. J., Nita K. S., Mello E. S., Rodrigues J. J., Molecular Aspects of Hepatic Carcinogenesis, *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 44(1):39-48 January-February, 2002
- 16.** Breuhahn K., Longerich T., Schirmacher P., Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma, *Oncogene* (2006) 25, 3787–3800, 2006
- 17.** Remy I., Montmarquette A., Minhnick S. W., PKB/Akt modulates TGF- β signalling through a direct interaction with Smad3, *Nature Cell Biology*, Vol.6, no.4, April 2004

18. Osaki M., Oshimura M., Ito H., PI3K-Akt Pathway: Its functions and alterations in human cancer, *Apoptosis* 2004;9: 667-676, 2004
19. West K. A., Castillo S.S., Dennis P. A., Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance, *Drug Resistance Updates*, (2002) 234-248, 2002
20. Vivanco I., Sawyers C. L., The Phosphatidylinositol 3-Kinase–Akt Pathway In Human Cancer, *Nature Reviews Cancer*, volume 2, July 2002
21. Bader A. G., Kang S., Zhao L. Vogt P.K., Oncogenic PI3K Deregulates Transcription and Translation, *Nature Reviews, Cancer*, Volume 5, December 2005
22. Cantrell D.A., Phosphoinositide 3-kinase signaling pathways, *Signal Transduction and Cellular Organization*, *Journal of Cell Science* 114 (8)
23. Coffey P. J., Jin J., Woodgett J. R., Protein kinase B: a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3- kinase activation, *Biochem. J.* (1998) 335, 1-13, 1998
24. Nicholson K.M., Anderson N. G., The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy, *Cellular Signalling* 14 (2002) 381– 395, 2002
25. Toker A., Lerner M. Y., Akt Signaling and Cancer: Surviving but not Moving On, *Cancer Res* 2006;66: (8). April 15, 2006
26. Yang I., Dan H. C., Sun M., Lu Q., Sun X., Feldman R. I., Hamilton A. D., Pollock M., Nicosia S. V., Herlyn M., Sebti S., Cheng J., Akt/PKB Signaling Inhibitor-2, a Selective Small Molecule Inhibitor of Akt Signaling with Antitumor Activity in Cancer Cells Overexpressing Akt, *Cancer Research* 64, 4394, July, 2004
27. Cantley L. C., Neel B. G., New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway, review, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 4240–4245, April 1999

- 28.** Nakanishi K., Sakamoto M., Yasuda J., Takamura M., Fujita N., Tsuruo T., Todo S., Hirohashi S., Critical Involvement of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Anchorage-Independent Growth and Hematogeneous Intrahepatic Metastasis of Liver Cancer, *Cancer Research*, C 62, 2971–2975, May 15, 2002
- 29.** Mitsui H., Takuwa N., Maruyama T., Maekawa H., Hirayama M., Sawatari T., Hasimoto N., Takuwa Y., Kimura S., The MEK-1 ERK Kinase Pathway and the PI 3-Kinase -Akt Pathway Independently Mediate Anti-Apoptotic Signals in HepG2 Liver Cancer Cells, *Int. J. Cancer*: 92, 55-62, 2001
- 30.** Huang H. M, Huang C. J., Yen J. Y, Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways, *Blood vol. 96, no. 5, September 2000*
- 31.** Gulati N, Laudet B, Zohrabian VM, Murali R, Jhanwar-Uniyal M., The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway, *Anticancer Res. 2006 Mar-Apr;26(2A):1177-8,2006*
- 32.** Merlot S, Meili R, Pagliarini DJ, Maehama T, Dixon JE, Firtel RA., A PTEN-related 5-phosphatidylinositol phosphatase localized in the Golgi, *The Journal Of Biological Chemistry* , 2003 Oct 10;278(41):39866-7, 2003
- 33.** Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M., Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE, *Developmental Cell*, 2005 Sep; 9(3):389-402, 2005
- 34.** Scheid M. P.,Woodgett J. R., Phosphatidylinositol 30 Kinase Signaling in Mammary Tumorigenesis, *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, Vol. 6, No. 1, 2001
- 35.** Wang SY, Chen B, Zhan YQ, Xu WX, Li CY, Yang RF, Zheng H, Yue PB, Larsen SH, Sun HB, Yang X., SU5416 is a potent inhibitor of hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and blocks HGF-induced invasiveness of human HepG2 hepatoma cells, *Journal of Hepatology*, 2004 Aug;41(2):267-73,2004

- 36.** Oka Y, Waterland R. A., Killian J., Nolan C. M., Jang H., Tohara K, Sakaguchi S, Yao K, Iwashita, A. Yata Y., Takahara T., Sato S., Suzuki K., Masuda T., Jirtle R. L., M6P/IGF2R Tumor Suppressor Gene Mutated in Hepatocellular Carcinomas in Japan, *Hepatology*, May 2002
- 37.** Piao Z., Choi Y., Park C., Lee W.J, Park J., Kim H., Deletion of the M6P/IGF2r gene in primary hepatocellular carcinoma, *cancer letters* 120(1997) 39-43
- 38.** Nakanishi K., Sakamoto M., Yamasaki S., Todo S., Setsuo Hirohashi, Akt Phosphorylation Is a Risk Factor for Early Disease Recurrence and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma, *American Cancer Society, Cancer* 103:307–12. 2005
- 39.** Jiang K., Sun J., Cheng, J., Djeu J. Y., Wei S., Sefti S., Akt Mediates Ras Downregulation of RhoB, a Suppressor of Transformation, Invasion, and Metastasis, *Molecular And Cellular Biology*, Vol. 24, No. 12, P. 5565–5576, June 2004
- 40.** Sun M., Wang G., Paciga J.E., Feldman I. R., Yuan Z, Ma X, Shelley S. A., Jove R., Tsihchlis P. N., Nicosia S. V., Cheng Q., AKT1/PKB Kinase Is Frequently Elevated in Human Cancers and Its Constitutive Activation Is Required for Oncogenic Transformation in NIH3T3 Cells, *American Journal of Pathology*, Vol. 159, No. 2, August 2001
- 41.** Khaleghpour K., Li Y., Banville D., Yu Z., Shen S., Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma, *Carcinogenesis* vol.25 no.2 pp.241±248, 2004
- 42.** Bao S., Ouyang G., Bai X., Huang Z., Ma C., Liu M., Shao R., Anderson R. M., Rich J. N., Wang X., Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway, *Cancer Cell*, April 2004, Vol. 5, 2004
- 43.** Flynn P., Wong M., Zavar M., Dean Z. M., Stokoe D., Inhibition of PDK-1 activity causes a reduction in cell proliferation and survival, *Current Biology* 2000, 10:1439-1442, 2000

- 44.** Liang J., Zubovitz J., Petrocelli T, Kotchetkov R., Connor M. K. , Han K., Lee J., Ciarallo S.,Catzavelos C., Beniston R., Franssen E., Slingerland J., PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest, *Nature Medicine*, Vol. 8, No. 10, October 2002
- 45.** Gupta D., Syed N. A., Roesler W. J., and Khandelwal R. L., Effect of Overexpression and Nuclear Translocation of Constitutively Active PKB-a on Cellular Survival and Proliferation in HepG2 Cells, *Journal of Cellular Biochemistry* 93:513–525, 2004
- 46.** Gao N., Flynn D. C., Zhang Z., Zhong X., Walker V., Liu J., Shi X., Jiang B., G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells, *AJP-Cell Physiology* 287:281-291, 2004
- 47.** Gao N., Flynn D. C., Zhang Z., Zhong X., Walker V., Liu J., Shi X., Jiang B., G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells, *AJP-Cell Physiology* 287:281-291, 2004
- 48.** Qi H., Zhang Y., Ma J., Guo P., Zhang X., Chen H., Insulin/protein kinase B signalling pathway upregulates metastasis-related phenotypes and molecules in H7721 human hepatocarcinoma cell line, *Eur. J. Biochem.* 270, 3795–3805, *FEBS* 2003
- 49.** Kim D., Kim S., Koh H., Yoon S., Chung A., Cho K. S. S, Chung J., Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production, *The FASEB Journal*, Vol. 15 September 2001
- 50.** Klippel A., Escobedo M. A., Wachowicz M. S., Apell G, Brown T. W., Giedlin M. A., Kavanaugh W. M., Williams L. T., Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Sufficient for Cell Cycle Entry and Promotes Cellular Changes Characteristic of Oncogenic Transformation, *Molecular And Cellular Biology* ,Vol. 18, No. 10, 1998

51. Cicenás .J., Urban P., Vuaroqueau V., Labuhn M., Küng W., Wight E., Mayhew M., Eppenberger U., Castori S.E., Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2, *Breast Cancer Research Vol 7 No 3, 2005*