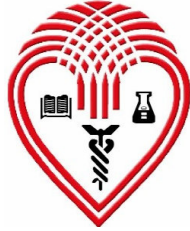


**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA  
β KATENİN VE PROLİFERASYON  
İLİŞKİSİ**

**Tıbbi Biyolog Aşlı Karan**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2006**

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA  
β KATENİN VE PROLİFERASYON  
İLİŞKİSİ**

**Tıbbi Biyolog Ashı Karan**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2006**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1. ÖZET .....	1
2. SUMMARY .....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER .....	4
4.1. $\beta$ KATENİN MOLEKÜLÜ .....	4
4.1.1. $\beta$ Katenin ve Adezyon .....	6
4.1.2. $\beta$ Katenin ve Wnt Haberleşme Sistemi .....	7
4.1.2.1. Wnt Sinyali $\beta$ Kateninin Sitoplazma ve Çekirdekte Birikmesine Neden Olur. ....	9
4.1.2.2. Wnt Sinyali Yokluğunda ise Normalde Plazma Membranında Kaderin Molekülüne ya da Sitoplazmada APC ve Aksine Bağlı Bulunan $\beta$ kateninin Yıkımı Söz Konusudur. ....	9
4.1.3 $\beta$ Katenin ve Kanser .....	9
4.2. HÜCRE SİKLUSU .....	10
4.3. METASTAZ .....	12
4.4. MEME KANSERİ .....	13
4.4.1. Meme Kanseri Hücre Soyları .....	13
5. MATERYAL VE YÖNTEM .....	15
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR .....	15
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER .....	16
5.2.1. Hücre Kültürü .....	16
5.2.2. İmmünohistokimya.....	16
5.2.2.1. Bromodeoksiüridin İmmünohistokimyası .....	16
5.2.2.2. $\beta$ Katenin ve Fosfo $\beta$ Katenin İmmünohistokimyası .....	17
5.2.3. İstatistiksel İnceleme .....	17
6. BULGULAR .....	18

6.1. MDA-MB 231, MCF-7 ve T47D MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA β KATENİN VE FOSFO β KATENİN EKSPRESYONLARININ LOKALİZASYONU .....	18
6.2. MDA-MB 231, MCF-7 ve T47D HÜCRE PROLİFERASYONUNUN BrdU İLE GÖSTERİLMESİ .....	20
7. TARTIŞMA .....	23
8. SONUÇ .....	27
9. TEŞEKKÜR .....	28
10. KAYNAKLAR .....	29

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>AEC</b>	: Aminoetilkarbezol
<b>APC</b>	: Adenomatöz Polipozis Koli
<b>BrdU</b>	: 5-bromo 2'-deoksiuridin
<b>CDK</b>	: Siklin bağımlı kinazlar
<b>CTNNB1</b>	: Katenin $\beta$ 1 geni
<b>DMEM</b>	: Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumu
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>Dsh</b>	: Dishelleved
<b>Fzd</b>	: Frizzled
<b>GSK3 <math>\beta</math></b>	: Glikojen sentetaz kinaz 3 $\beta$
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon solüsyonu
<b>SPSS</b>	: Sosyal bilimler için istatistik programı
<b>TCF/LEF</b>	: T hücre transkripsiyon faktörü/ Lenfoid çoğaltıcı faktör
<b><math>\beta</math> TrCP</b>	: $\beta$ transdusin tekrarları içeren protein

**Araştırma Proje Numarası:** HE /0172004

## 1. ÖZET

Bu çalışmada meme kanseri hücre soyları MDA-MB 231, MCF-7 ve T47D hücrelerinde  $\beta$  katenin ve fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonu immünohistokimyasal olarak incelendi. MDA-MB 231 hücrelerinde nükleer lokalizasyonlu  $\beta$  katenin ekspresyonu saptandı. Fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonu bazı hücrelerin nükleus ve nükleusa yakın bölgelerinde izlendi. MCF-7 hücrelerinde  $\beta$  katenin ekspresyonu hücre membranında lokalize idi, fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonu ise gözlenmedi. T47D hücrelerinde  $\beta$  katenin ekspresyonu hücre membranında lokalizasyon gösterirken, fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonu az sayıda hücre membranında zayıf olarak izlendi. Hücrelerin proliferasyon düzeyi BrdU işaretleyicisi kullanılarak immünohistokimyasal olarak incelendiğinde MDA-MB 231 hücrelerinin proliferasyon oranının en yüksek oranda olduğu gözlemlendi. En düşük proliferasyon oranı ise T47D hücre soyunda tespit edildi.

Sonuç olarak, MDA-MB 231 hücre soyunda  $\beta$  katenin ekspresyonunun nükleusta lokalize olması ve proliferasyon hızının daha yüksek olması bu hücrelerin MCF-7 ve T47D hücrelerine göre daha malign karakterde olmasıyla uyum göstermektedir.

## 2. SUMMARY

In this study the expression of  $\beta$  catenin and phospho  $\beta$  catenin were examined immunocytochemically in MDA-MB 231, MCF-7 and T47D breast cancer cell lines. In MDA-MB 231 cells  $\beta$  catenin expression was observed in the nucleus. Phospho  $\beta$  catenin expression was observed in the nucleus and perinuclear area of some cells.  $\beta$  catenin expression was localized in the cell membrane in MCF-7 cells, whereas phospho  $\beta$  catenin expression wasn't observed in these cells. In T47D cells,  $\beta$  catenin expression was localized in the cell membrane and phospho  $\beta$  catenin expression was weakly observed in the cell membrane of a few cells. We examined cell proliferation rate immunocytochemically using BrdU proliferation marker and we observed the highest proliferation rate in MDA-MB 231 cells. The lowest proliferation rate was observed in T47D cell lines.

In conclusion, higher proliferation rate and nuclear localization of  $\beta$  catenin expression in MDA-MB 231 cells is compatible with its malign character compared to MCF-7 and T47D cells.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

$\beta$  katenin, hücrede hem adezyon bağlantılarında hem de wnt haberleşme sisteminde görev yapan önemli bir proteindir (1). Hücrede  $\beta$  katenin miktarı stabil tutulur, hücrede aşırı birikimi durumunda ise çekirdeğe geçip çeşitli faktörleri aktive ederek tümör oluşumuna neden olur. İnsanda pek çok kanser türünde  $\beta$  kateninin hücrede birikmesine neden olan mutasyonlar rol almaktadır.

$\beta$  katenin ve APC (adenomatöz polipozis koli) moleküllerinin kolon kanserindeki rolleri üzerine yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır (2,3), ancak meme kanseriyle ilişkisini inceleyen yeterli araştırma mevcut değildir. Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biri olup, Avrupa'da her 8 kadından biri meme kanseri gelişim riski taşımaktadır (4). Meme kanserinde prognoz çeşitli biyolojik karakteristikler tarafından belirlenir. Hücre proliferasyonu da bu karakteristiklerden biridir ve BrdU inkorporasyon yöntemi, S faz proliferasyon oranının belirlenmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, birbirinden farklı hormon duyarlılığı ve invazyon özelliklerine sahip olan MDA-MB 231, MCF-7 ve T47D insan meme kanseri hücre soylarının proliferasyon oranlarının,  $\beta$  katenin ve fosfo  $\beta$  katenin ekspresyon düzeylerinin ve lokalizasyonlarının immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi amaçlanmıştır.



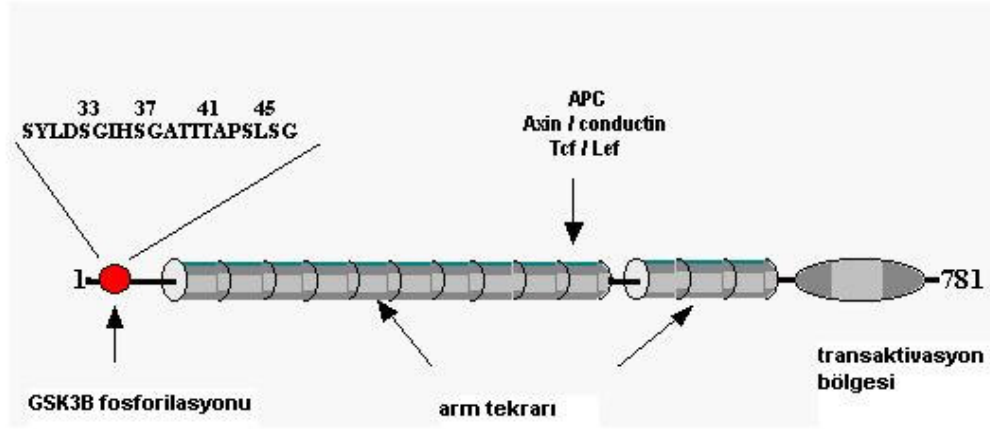
## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. $\beta$ KATENİN MOLEKÜLÜ

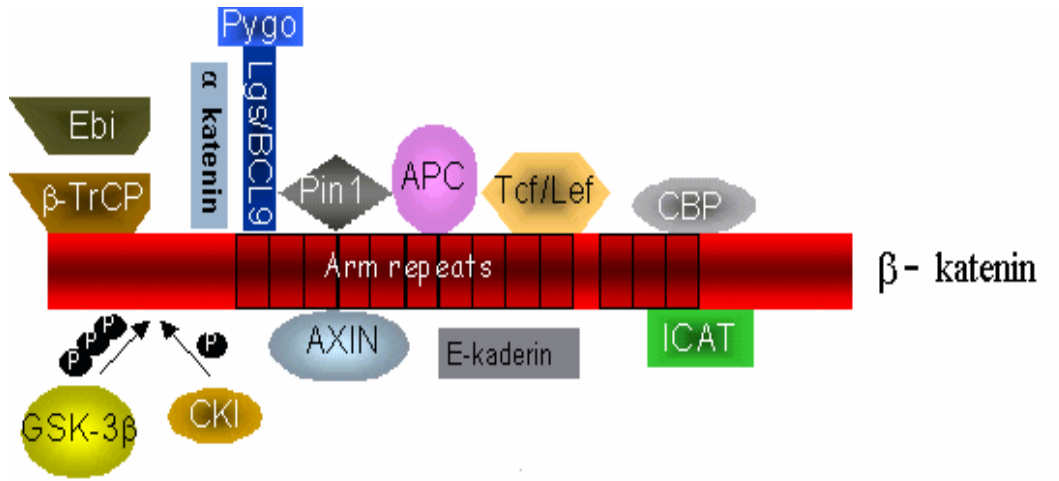
$\beta$  katenin 781 aminosidden oluşan 92 kDa'luk bir proteindir (5,6). Temel yapısı yaklaşık 130 aminoasidden oluşan bir amino uç, 42 aminoasidden oluşan tekrar bölgesi ve 110 aminoasidden oluşan karboksil ucundan oluşur (Şekil 1) (7,8). Tekrar bölgesi ilk olarak drosophila segment polarite geni armadillo (arm)'da tespit edilmiş ve bu yüzden arm tekrar bölgesi olarak adlandırılmıştır. Daha sonraları benzer tekrar bölgelerinin memeli armadillo homologu olarak  $\beta$  katenin,  $\gamma$  katenin ve başka proteinlerde de varlığı gösterilmiştir. Arm tekrar bölgesi  $\beta$  kateninin kaderin molekülü, adenomatös polipozis koli (APC), aksin ve TCF/LEF (T hücre transkripsiyon faktörü/ Lenfoid çoğaltıcı faktör) transkripsiyon faktörü ailesine bağlanmasını düzenler (Şekil 2) (9-12). Amino ucu  $\beta$  kateninin stabilitesinin sağlanmasında, karboksil ucuda transkripsiyon aktivitesinde önemli rol oynar (7,13,14).

$\beta$  katenin,  $\alpha$  ve  $\gamma$  katenin, birlikte, katenin ailesini oluştururlar. Bu geniş aile  $Ca^{+2}$  bağımlı homotipik hücre hücre adezyon moleküllerinin oluşumunda, büyüme, epitelyal hücre polaritesi ve tümör gelişiminde önemli rol oynarlar. Bu üç katenin de arm tekrar bölgesine sahiptirler.  $\beta$  katenin ve  $\gamma$  katenin yüksek oranda homologturlar, %70 oranında aynı aminoasitleri taşırlar ve arm tekrar kısımlarının %80'i aynı aminoasitlerden oluşur fakat fonksiyonları farklılıklar gösterir (15).  $\gamma$  katenin tümör oluşumunu baskımlarken,  $\beta$  kateninin kontrolsüz çoğalmayı ve tümör oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (16).

$\beta$  katenin hücrede iki önemli göreve sahiptir. Hücreler arası adezyon bağlantılarının temel yapısal komponenti olarak bütünlüğün korunmasında ve wnt haberleşme sisteminde kritik öneme sahiptir.



Şekil 1.  $\beta$  katenin molekülünün yapısı (8).



Şekil 2.  $\beta$  katenin ve ona bağlanan moleküller (13).

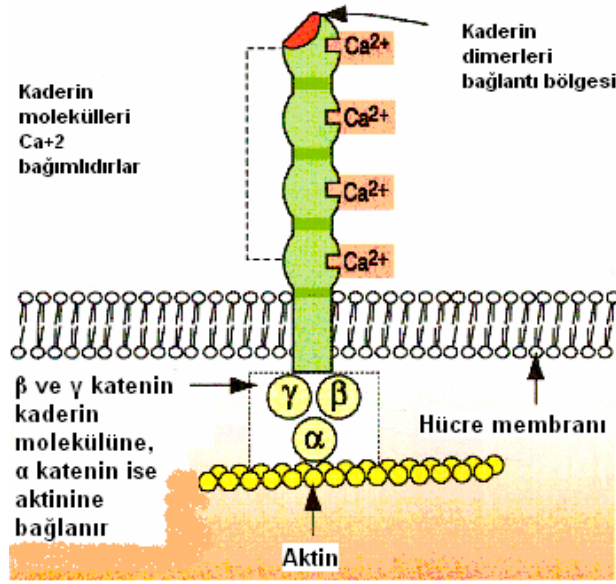
#### 4.1.1. $\beta$ Katenin ve Adezyon

$\beta$  katenin, epitelyal hücrelerin sitoplazmasında ve plazma hücre membranında yer alır. Hücreler arası adezyonu düzenleyen kaderin-katenin kompleksinin bir üyesi olarak görev yapar. Adezyon bağlantıları hücre ve doku morfolojilerinin belirlenmesinde, hareket, büyüme, farklılaşma ve hayatta kalma gibi biyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca hücre hareketi, proliferasyon ve kontakt inhibisyonunda da önemlidir. Adezyon bağlantıları birbirine komşu hücrelerin kaderin molekülleri arasındaki homofilik bağlantılar tarafından kurulurlar (Şekil 3) (17).

Kaderin molekülleri,  $Ca^{+2}$  bağımlı proteinlerdir bu yüzden adezyon bağlantılarının morfolojik ve fonksiyonel devamlılığı için  $Ca^{+2}$  gereklidir.  $Ca^{+2}$  un uzaklaştırılması kaderin moleküllerinin ayrılmasına ve bağlantının bozulmasına sebep olur (18).

Farklı dokularda farklı kaderin tipleri bulunmaktadır, E-kaderin normal epitelde, P-kaderin plasentada, N-kaderin ise sinir dokusunda ilk kez tanımlanmış ve bu isimleri almışlardır. Kaderin moleküllerinin fonksiyon kaybına pek çok kanser tipinde rastlanmaktadır (19).

Kaderin molekülleri sitoplazmik tarafta kateninlere bağlanırlar (20).  $\beta$  kateninin adezyon bağlantılarına katılması,  $\alpha$  kateninin amino uç bölgesine kaderinin ise tekrar bölgesine bağlanması sonucu olur.  $\beta$  katenin ve  $\gamma$  katenin (plakoglobin) direk olarak kaderinin karboksil ucuna bağlanır,  $\alpha$  katenin ise sitoplazmik aktin molekülüne bağlantıyı sağlar (21,22). Adezyon bağlantılarında rol oynayan diğer molekül katenin benzeri bir molekül olan p120 (sigma) katenindir ve kaderine bağlı bulunur. Fakat p 120 kateninin fonksiyonu henüz anlaşılamamıştır (23-25).



Şekil 3.  $\beta$  katenin molekülünün adezyon bağlantılarındaki rolü (17).

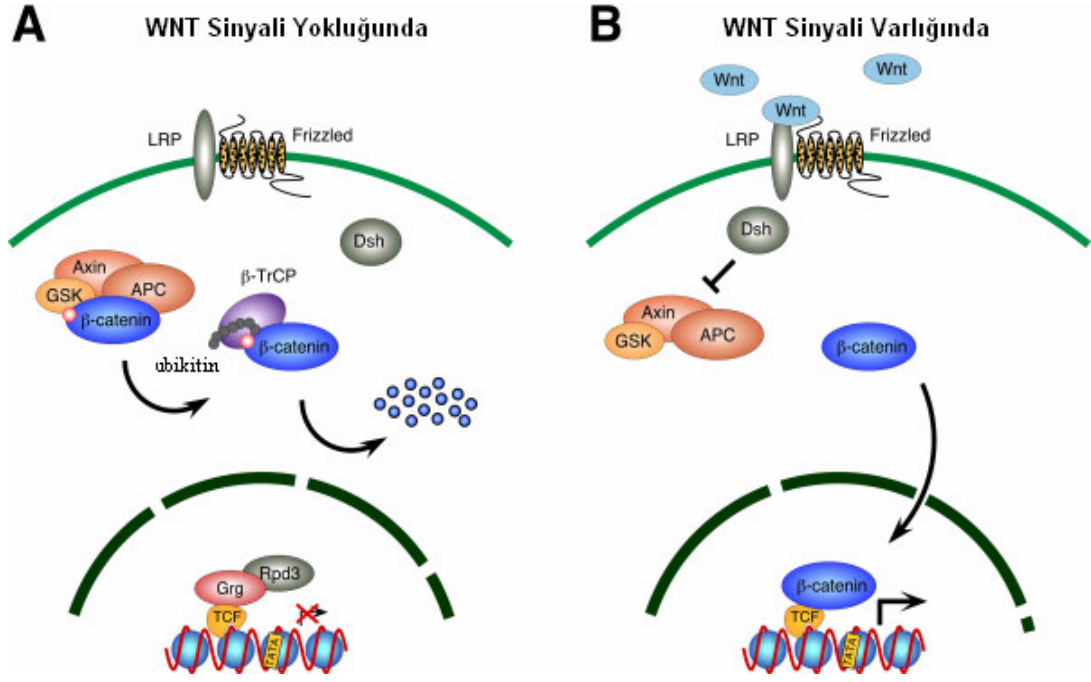
#### 4.1.2. $\beta$ Katenin ve Wnt Haberleşme Sistemi

$\beta$  katenin wnt haberleşme sisteminde önemli bir yere sahiptir (26,27). Wnt proteinleri gelişim sırasında hücreler arası iletişimde rol oynayan moleküllerden oluşmuş geniş bir ailedir. Wnt ismini ilk keşfedilen iki üyesi; wingless (drosophila) ve int-1 (fare)'den alır (28).

Wnt proteinleri, solucandan memelilere kadar pek çok organizmada bulunur ve gelişimi kontrol eden sisteinden zengin glikolize ligandlardan oluşurlar. Üyeleri hücre düzeyde hücre çoğalması, morfolojisi ve hareketi gibi yaşamsal fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alır. Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar tümör oluşumunda da rol oynadıklarını göstermektedir (29).

Wnt ligandları Frizzled (Fzd) reseptörlerinin ekstraselüler kısımlarına bağlanırlar. Frizzled genleri ilk defa drosophila doku polarite geni olan Frizzled'da tespit edilmiş ve bu yüzden bu ismi almışlardır. Wnt ligandının Fzd reseptörüne bağlanmasıyla wnt haberleşme sistemi aktive olur. Dishelleved (Dsh) fosforilize olur ve aksin ile bağlanarak

GSK3  $\beta$  (Glikojen sentetaz kinaz 3  $\beta$ )'nin kinaz aktivitesini inhibe eder. GSK3  $\beta$ 'nin  $\beta$  katenini fosforile etmesi engellenir ve  $\beta$  katenin yıkımdan kurtulur (Şekil 4) (30,31).



Şekil 4. Wnt haberleşme sistemi. Sinyal yokluğunda  $\beta$  kateninin yıkılması gerçekleşmekte, sinyal varlığında ise çekirdekte birikmesi söz konusu olmaktadır (31).

#### **4.1.2.1. Wnt Sinyali $\beta$ Kateninin Sitoplazma ve Çekirdekte Birikmesine Neden Olur.**

Biriken  $\beta$  katenin, çekirdekte transkripsiyon faktör ailesinden TCF/LEF ile bağlanır ve hedef genlerin ekspresyonunu uyarır.  $\beta$  katenin-TCF/LEF sistemi tarafından aktive edilen genlerden bazıları: siklin D1, c-myc gibi hücre siklusunu düzenleyen genler; fibronektin, WISP 1 gibi hücre ekstraselüler matriks bağlantılarının düzenlenmesinde rol oynayan genler; Tcf 1, c-jun, fra 1, PPAR delta gibi çeşitli transkripsiyon faktörleridir (32).

#### **4.1.2.2. Wnt Sinyali Yokluğunda ise Normalde Plazma Membranında Kaderin Molekülüne ya da Sitoplazmada APC ve Aksine Bağlı Bulunan $\beta$ Kateninin Yıkımı Söz Konusudur.**

Wnt sinyali yoksa GSK3 $\beta$ , kazein kinaz 1'in  $\beta$  katenini Serin (Ser) 45 tarafından işaretlemesinin ardından, Threonin (Thr) 41, Serin 35 ve Serin 33'ü ardarda fosforilize eder (33-36). Fosforilize  $\beta$  katenin,  $\beta$  TrCP ( $\beta$  transdusin tekrarları içeren protein) tarafından bağlanır.  $\beta$ -TrCP,  $\beta$  kateninin proteozom tarafından tanınmasını ve yıkılmasını sağlar (37). Kısacası, GSK3 $\beta$ , APC ve aksinden oluşan kompleks  $\beta$  kateninin proteozom tarafından tanınmasını sağlar ve yıkımına yol açar.

$\beta$  kateninin yıkımı ubiquitin-proteozom yıkım yolu ile gerçekleştirilir. Ubikitin 76 aminoasitten oluşan bir polipeptiddir, bir proteinin lizis yan zincirlerinin amino grubuna bağlanarak o proteini işaretler. Bu noktaya daha sonra yeni ubiquitinler eklenerek bir multiubikitin zincir oluştururlar. Bu şekilde çok sayıda ubiquitin ile işaretlenmiş protein, oldukça iri, çok sayıda alt birimden oluşmuş bir proteaz kompleksi olan proteozom tarafından yıkılır (38).

#### **4.1.3. $\beta$ Katenin ve Kanser**

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması, invazyon ve metastaz ile karakterizedir. Hücrenin genetik olarak değişimi ile yani transformasyonla başlar. Bunu hücrelerin

kontROLSÜZ OLARAK çoğalması, çevre dokulara yayılma (invazyon) ve başka organlara yayılma (metastaz) aşamaları izler.

İnsanda pek çok kanser türünde  $\beta$  kateninin hücrede birikmesine neden olan mutasyonların rol aldığı bildirilmiştir. Bu mutasyonlar  $\beta$  kateninde veya diğer wnt haberleşme sistemi elemanlarında görülebilmektedir (39).

CTNNB1 (Katenin  $\beta$  1) geni  $\beta$  katenini kodlar. Bu genin ekson 3 bölgesi insan tümörlerinde mutasyonların gelişim noktası olarak tanımlanmıştır. Ekson 3 kritik Ser/Thr residülerini kodlayan kısımdır ve  $\beta$  katenin ancak bu residülerin GSK3 $\beta$  tarafından fosforile edilmesinden sonra hücrede yıkıma uğrayabilir. Bu yüzden, bu bölgede oluşan bir mutasyon  $\beta$  kateninin hücrede birikmesine yol açar. Kolorektal karsinoma, desmoid tümör, endometrial karsinoma, hepatoblastoma, intestinal karsinoma, melanoma, over karsinomu, pankreatik ve prostatik karsinoma gibi bazı kanser tiplerinde ekson 3 mutasyonları tanımlanmıştır (40,41).

## 4.2. HÜCRE SIKLUSU

Bütün organizmalar sürekli olarak bölünen ve çoğalan hücrelerden oluşurlar. Hücreler, yaralanmış ya da ölmüş hücrelerin yerine geçmek için veya döllenmiş yumurtanın gelişimi için bölünürler. Vücudumuzda, dakikada 300 milyon hücre mitoz bölünme geçirmektedir (42).

Hücre siklusu hücre içeriğinin kopyalandığı ve hücrenin ikiye bölündüğü olaylar bütünüdür. Temel olarak G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. G1 fazında hücre büyümesi başlar, hücre %20 büyür, S fazı kromozomların duplika olduğu ve hücre büyümesinin devam ettiği fazdır. G2 fazında hücre yeterli büyüklüğe ulaşır ve M fazında hücre bölünmesi gerçekleşir (43).

Memeli hücre siklusu, siklinler tarafından yürütülür. Siklinler görevlerini CDK'lar (siklin bağımlı kinazlar) üzerinden gerçekleştirirler (Şekil 5) (44).

Hücre siklusunun düzenlenmesi:

- G1- S Geçişi

Siklin D, CDK4 ve CDK6'yı aktive eder. Bu aktivasyon, retinoblastoma proteinin (pRb) fosforilasyonu ve deaktivasyonuna neden olur.

- S Fazı

Siklin E ve siklin A CDK2'yi aktive eder, siklin A aynı zamanda CDK1'i aktive eder.

- G2- M geçişi

Siklin B CDK1'i aktive eder.

Siklusun kontrolünü sağlayan iki grup CDK inhibitörü vardır. INK4 grubu p16, p15, p18 ve p19 tarafından oluşturulur ve siklin D, CDK4 ve CDK6'yı inhibe eder. p21, p27 ve p57 ise tüm CDK'ları inhibe ederler (45).

Genetik yapının sorunsuz aktarılması için hücre siklusunda kontrol noktaları vardır:

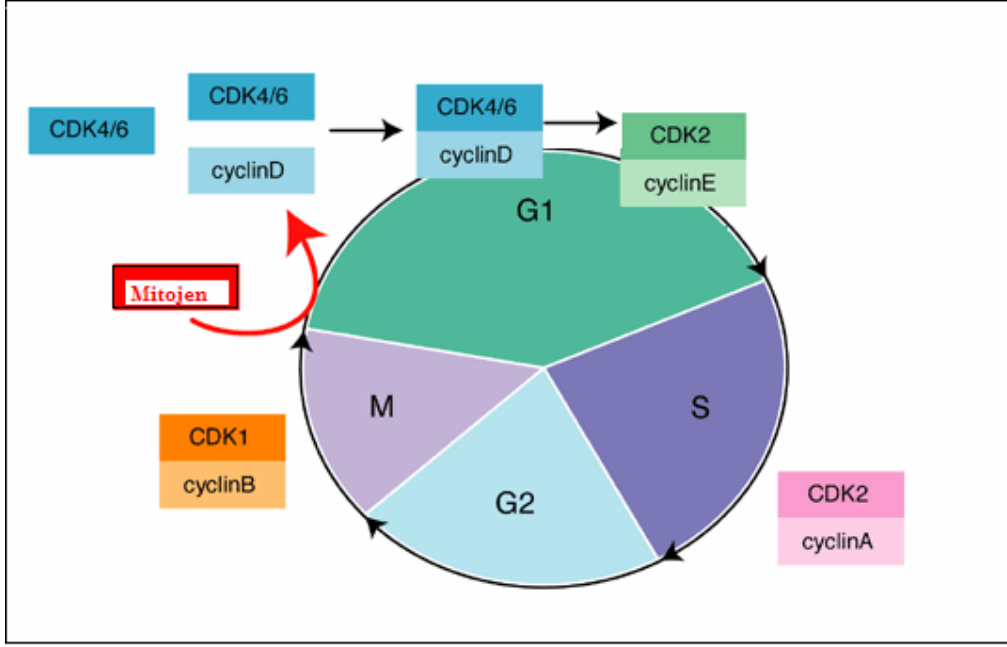
Kontrol noktası 1: G1 fazında yer alır. Hücre büyüklüğünü ve genetik materyali kontrol eder.

Kontrol noktası 2: G2 fazında yer alır. Bütün genetik materyal duplike oldu mu, genetik materyal intakt mı kontrol eder.

Kontrol noktası 3: M fazında yer alır. Kromozomlar spindle'a bağlandı mı kontrol eder.

Eğer bu noktalardan herhangi birinde sorun varsa hücre siklusu durdurulur ve sorun tamir edilmeye çalışılır. Tamir başarılmazsa hücre yok edilir.





Şekil 5: Hücre siklusu (44).

### 4.3. METASTAZ

Kanserli hücrelerin buldukları doku dışında, doğrudan ya da kan-lenf damarlarıyla, başka bölgelere göç etmelerine metastaz denir. Metastaz kanserin ileri aşamasıdır ve çoğunlukla ölümcüldür.

Metastaz malign tümörlerin belirleyici özelliklerindedir. Metastatik kanser hücreleri ilk önce ekstraselüler matriksi geçerek çevre dokuya invaze olurlar. Daha sonra lenf yada kan damarlarıyla hedef dokuya yayılırlar ve orada sekonder tümör odağını oluştururlar. Hücreler hedef dokuda kontrolsüz çoğalmaya devam ederler. Fakat kan desteği olmayan kanser hücreleri çoğalamayacağından çeşitli faktörler salgılayarak yeni kan damarlarının oluşumunu sağlarlar.

## **4.4. MEME KANSERİ**

Üreme sisteminin önemli bir organı olan memede görülen meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. İleri yaş, erken menarş, geç menapoz, aile hikayesinin bulunması, alkol kullanımı gibi faktörler risk grubunu oluştururlar.

Meme kanserleri, kanser hücrelerinin lokalize olduğu yere veya yayılma eğilimlerine göre sınıflandırılabilirler. Kanser hücreleri süt kanallarında lokalize ise duktal, lobüllerde lokalize ise lobuler, medullada ise medullar meme kanseri ismini alır. Eğer kanser hücreleri kaynaklandıkları yerle sınırlı kalırlarsa in situ, yayılma eğilimi gösterirlerse invazif meme kanseri olarak adlandırılırlar. Meme kanseri metastazları kemik, akciğer, lenf nodu ve beyinde ortaya çıkarlar.

Meme kanseri prognozunun değerlendirilmesinde hasta yaşı, tümör çapı, tümör evresi, hormon reseptör varlığı veya yokluğu ve S faz proliferasyon indeksi parametreleri kullanılır. Meme kanserleri hormon reseptör pozitif veya negatif olarak hücre yüzeyinde yer alan östrojen ve progesteron reseptör düzeylerine göre sınıflandırılırlar (46). Bu sınıflama sonucu hormon reseptör pozitif bulunan tümörler, tamoksifen ve aromataz inhibitörleri gibi anti-östrojenlerle tedaviye iyi yanıt verirler ve bu nedenle hormon reseptör pozitifliği iyi prognozla ilişkilendirilir. Progesteron pozitifliği de prognozun önceden belirlenmesinde östrojen kadar önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir (47).

### **4.4.1. Meme Kanseri Hücre Soyları**

Meme kanseri çalışmaları in vitro olarak meme kanseri hücre soyları kullanılarak yapılmaktadır. Çalışmamızda üç tür meme kanseri hücre soyu kullanıldı. Bunlar; MDA-MB 231, MCF-7 ve T47D hücre soylarıdır. Bu üç hücre soyu, östrojen ve progesteron pozitif ve negatifliği ile invazyon özellikleri bakımından farklılıklar göstermektedir.

MDA-MB 231, insan adenokarsinomu kaynaklıdır. Östrojen negatiftir. İnvazif bir hücre soyudur.

MCF-7, insan adenokarsinomu kaynaklıdır. Östrojen pozitifdir. İnvazif değildir.

T47D, duktal karsinoma kaynaklıdır. Östrojen ve progesteron pozitifdir. İnvazif değildir.

## 5. MATERYAL VE YÖNTEM

### 5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- 1) NaCl, Atabay AT091-950
- 2) KCl, Carlo Erba 360107
- 3) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Riedel-de Häen 81890
- 4) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Riedel-de Häen 8210A
- 5) HCl, Merck K23226314 632
- 6) DMEM, Sigma D5546
- 7) Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
- 8) L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
- 9) Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-1C
- 10) Fetal Sığır Serumu, Seromed S0115
- 11) Anti-  $\beta$  katenin antikoru, Cell Signaling Technology 9562
- 12) Anti-Fosfo  $\beta$  katenin antikoru, Cell Signaling Technology, 9561
- 13) Anti-BrdU antikoru, Neomarkers MS-1058
- 14) Histostain Plus Kit, Zymed 85-8943
- 15) Aminoetilkarbazol (AEC), Lab Vision TA-060-HA
- 16) Metanol, Riedel-DC-Haen 24229
- 17) Tripsin EDTA, Biological industries 243338
- 18) DMSO, Sigma D 2650
- 19) Borik Asit, Sigma B0252
- 20) Sodyum tetra borat, Sigma B0127

## **5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER**

### **5.2.1. Hücre Kültürü**

MDA-MB-231, MCF-7 ve T47D hücreleri % 10 fetal sığır serumu ve antibiyotik (100 U/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin) ilaveli Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu ve F12 (DMEM-F12) içeren flakslarlarda 37°C' de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde büyütüldü. Tripsinize edilen hücreler yuvarlak lameller üzerine ekildi ve iki gün süreyle kültüre edildi.

### **5.2.2. İmmünohistokimya**

#### **5.2.2.1. Bromodeoksiuridin İmmünohistokimyası**

Hücreler lameller üzerinde ekildikten 2 gün sonra PBS ile yıkanıp metanol ile 5 dakika -20 °C'de fikse edildi. Proliferasyon indeksi tayini için S faza özgü bromodeoksiuridin (BrdU) işaretlemesi kullanıldı. Anti- BrdU monoklonal antikoru ile immünohistokimyasal boyama yapılacak hücreler, fiksasyon öncesi 5-bromo-2'-deoksiuridin (1mM) ile 1 saat 37°C'de inkübe edildi. PBS yıkamalarını takiben hücrelerin çift zincirli DNA'sı 2N HCl ile 37°C'de 30 dakika denatüre edildi. Borat tampon ile (pH 8) nötralize edildikten sonra, PBS yıkamalarını takiben spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için bloking işlemi uygulandı (Histostain Plus Kit, Zymed). Anti-BrdU mouse monoklonal antikoru (NeoMarkers) ile 1 saat oda ısısında (1.5/300) inkübe edildi. Sırasıyla streptavidin ve biyotin-HRP bağlı sekonder antikorlarla 20 dakika inkübasyon gerçekleştirildi (Histostain Plus Kit, Zymed). Aminoetilkarbazol (AEC) kromojeni uygulaması sonucu oluşan spesifik kırmızı renk reaksiyonu, Olympus BX 50 ışık mikroskopunda değerlendirildi.

### **5.2.2.2. $\beta$ Katenin ve Fosfo $\beta$ Katenin İmmünotokimyası**

$\beta$  ve fosfo  $\beta$  katenin immünotokimyasal incelemesi için lameller üzerine ekilmiş olan hücreler metanol ile fikse edildi. Bloking işleminden sonra anti-  $\beta$  katenin (Cell Signaling Technology) ve Serin 33/37/Threonin 41 aminoasit bölgelerinin fosforilasyonuna özgü anti-fosfo  $\beta$  katenin primer antikorları (Cell Signaling Technology) 1/300 dilüsyonda, oda sıcaklığında 1 saat uygulandı. Primer antikor uygulamasını takiben, BrdU immünotokimyasında uygulanan aşamalar aynen tekrarlandı.

### **5.2.3. İstatistiksel İnceleme**

BrdU işaretli S fazındaki hücrelerin oranı üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının değerlendirilmesiyle hesaplandı. Proliferasyon indeksi, mikroskop alanındaki pozitif işaretli hücrelerin/ toplam hücre sayısına oranı alınarak bulundu.

İstatistiksel inceleme Sosyal Bilimler için İstatistik Programı (SPSS 9.0) ile Krusker Wallis ve Mann Whitney-U testleri uygulanarak değerlendirildi.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

## 6. BULGULAR

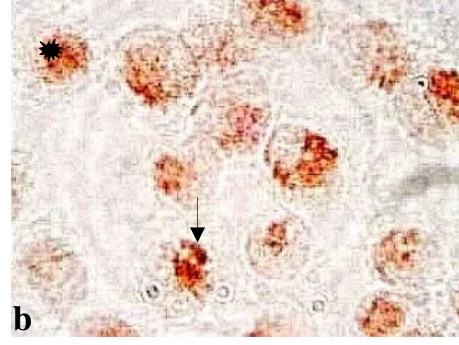
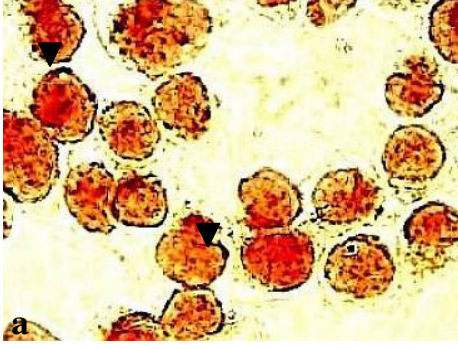
### 6.1. MDA-MB 231, MCF-7 VE T47D MEME KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA $\beta$ KATENİN VE FOSFO $\beta$ KATENİN EKSPRESYONUNUN LOKALİZASYONU

Meme kanseri hücre soylarından MDA-MB-231, MCF-7 ve T47D hücrelerinde  $\beta$  katenin ve fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak inceledik ve karşılaştırdık. Çalışmamızda östrojen negatif ve invazif özelliklere sahip insan meme adenokarsinomundan elde edilmiş olan MDA-MB-231 hücre soyunda,  $\beta$  katenin ( $\blacktriangledown$ ) ekspresyonunun hücrelerin nükleuslarında lokalize olduğu izlendi (Resim 1a). Serin 33/37/Threonin 41 aminoasit bölgelerine özgü fosfo  $\beta$  katenin aktivitesi tüm hücrelerde izlenmedi. Aktivite izlenen hücrelerde fosforilasyonun nükleuslarda ( $\ast$ ) veya sitoplazmik bölgelerde ( $\rightarrow$ ) lokalize olduğu gösterildi (Resim 1b).

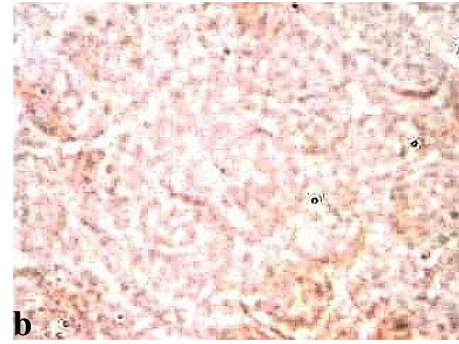
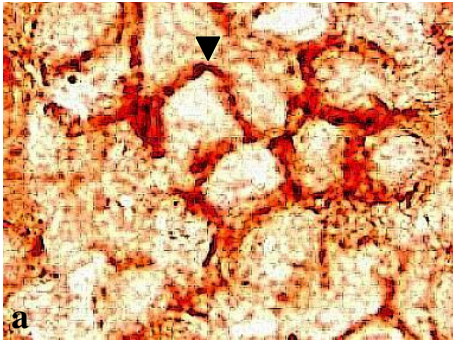
Östrojen pozitif ve invazif özellikte olmayan MCF-7 ile hem östrojen hemde progesteron pozitif olup invazif özellik taşımayan T47D meme kanseri hücrelerinde, MDA-MB-231 hücrelerinde izlenen nükleer lokalizasyonlu  $\beta$  katenin ekspresyonu izlenmedi. MCF-7 hücre soyunda,  $\beta$  kateninin hücrelerin plazma membranlarına ( $\rightarrow$ ) lokalize olduğu gözlemlendi (Resim 2a). Serin 33/37/Threonin 41 anti fosfo  $\beta$  katenin antikoru aktivitesi ise izlenmedi (Resim 2b).

T47D hücre soyunda MCF-7 hücrelerine benzer olarak plazma membranında lokalizasyon gösteren  $\beta$  katenin ekspresyonu ( $\blacktriangleright$ ) saptandı (Resim 3a). Fosfo  $\beta$  katenin ( $\rightarrow$ ) ekspresyonu tüm hücrelerde izlenmemekle birlikte az sayıda hücrenin plazma membranında zayıf olarak, noktasal alanlar şeklinde izlendi (Resim 3b).

$\beta$  katenin ekspresyon düzeyleri ve lokalizasyonları hücre soylarının malignite kriterleri, hormon yanıtları, proliferasyon oranları ve invazyon yetenekleri ile korele bir aktivite göstermiştir.

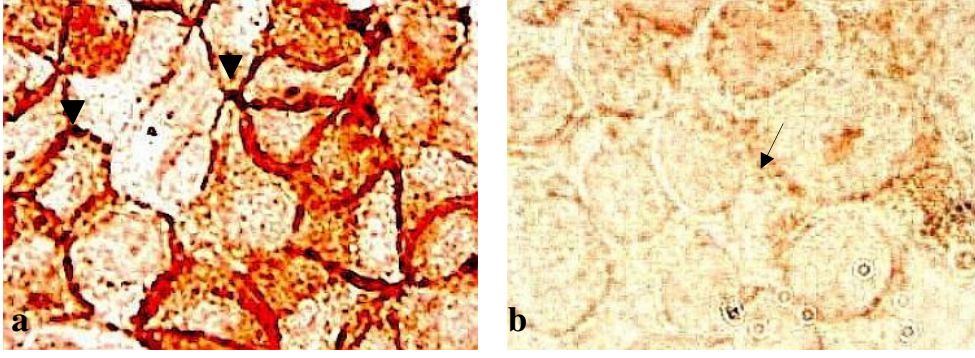


**Resim 1a, b:** MDA-MB 231 hücrelerinde ışık mikroskopik  $\beta$  katenin( $\blacktriangledown$ ) (a) ve fosfo  $\beta$  katenin ( $\rightarrow$ ) immünohistokimyasal aktivasyonu izlenmekte (b). X600.



**Resim 2a, b:** MCF-7 hücrelerinde plazma membranlarında  $\beta$  katenin ( $\blacktriangledown$ ) aktivitesi izlenirken (a) fosfo  $\beta$  katenin aktivitesi izlenmedi (b). X600.



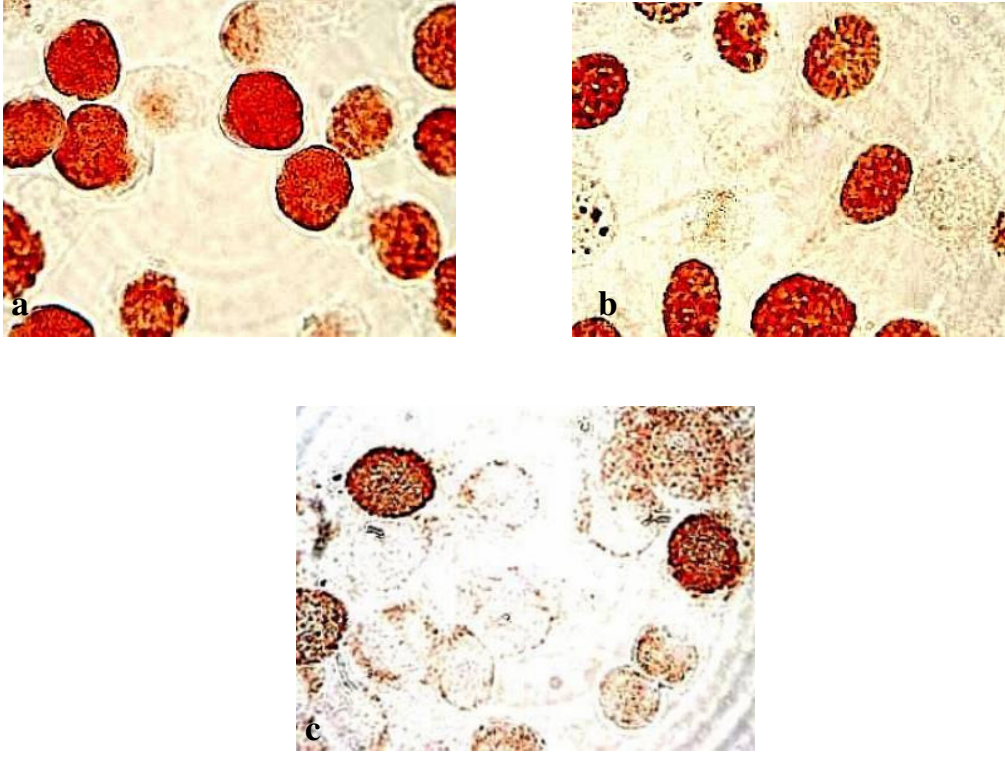


**Resim 3a, b:** T47D hücrelerinin tamamının plazma membranında  $\beta$  katenin (▼) aktivitesi (a) az sayıda hücrenin membranında ise zayıf noktasal fosfo  $\beta$  katenin (→) aktivitesi izlendi (b). X600.

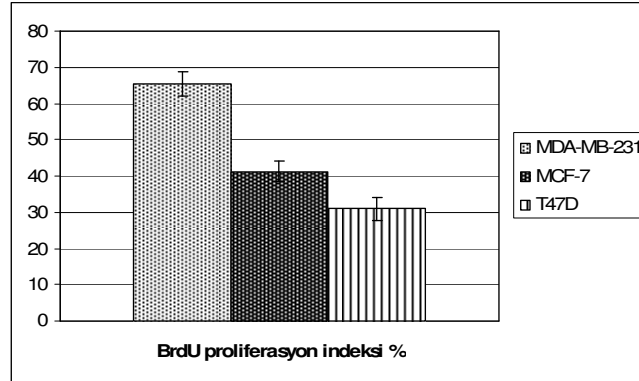
## **6.2. MDA-MB 231, MCF-7 VE T47D HÜCRE PROLİFERASYONUNUN BrdU İLE GÖSTERİLMESİ**

BrdU işaretli S fazındaki hücre oranları MDA-MB-231, MCF-7 ve T47D hücre soylarında immünohistokimyasal olarak anti-BrdU monoklonal antikoru ile gösterildi (Resim 4). Bir timidin analogu olan BrdU; hücre bölünmesinin S fazında DNA'ya bağlanarak işaretlenmesini sağlar.

S fazındaki hücre oranları karşılaştırıldığında östrojen negatif ve invazif özelliğe sahip MDA-MB 231 hücrelerinin proliferasyon oranı  $65.57 \pm 3.35$  olarak bulundu. MCF-7 hücre soyunda S fazı proliferasyon oranı  $41.8 \pm 2.75$  olarak saptandı. T47D hücre soyunda ise BrdU işaretli proliferatif hücre oranı  $30.85 \pm 3.02$  olarak bulundu (Tablo 1).



**Resim 4a, b, c:** MDA-MB-231, MCF-7 ve T47D insan meme kanser hücre soylarında sırasıyla BrdU işaretli S fazındaki hücreler izlenmekte. X600.



**Tablo 1:** Meme kanseri hücre soylarının S fazı proliferasyon indeksi oranları.

Proliferasyon oranlarının üç hücre grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptandı ( $p<0.0001$ ). En yüksek proliferasyon oranına sahip MDA-MB 231 hücre soyu ile MCF-7 ve T47D hücre soylarının proliferasyon oranlarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edildi ( $p<0.001$ ). Östrojen pozitif MCF-7 ile östrojen ve progesteron pozitif T47D hücrelerinin proliferasyon oranları da istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi ( $p<0.001$ ).

## 7. TARTIŞMA

Bu çalışmada, MDA-MB-231, MCF-7 ve T47D insan meme kanser hücrelerinde  $\beta$  katenin, fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonları ve hücre proliferasyonu immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak incelendi.

$\beta$  kateninin hücredeki yerleşiminin fonksiyonunu etkilediği bildirilmiştir.  $\beta$  kateninin membrana lokalize olması hücre adezyonundaki rolüyle, çekirdekte birikmesi ise artmış transkripsiyon ve hedef genlerin aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur. Hücrelerin mutasyonel geçmişi, dediferansasyon derecesi ile artmış serbest  $\beta$  katenin miktarları arasında genel bir korelasyon olduğu ileri sürülmüştür (48). Bunun yanı sıra selim dokularda  $\beta$  kateninin sadece membranda eksprese olduğu, adenoma ve karsinomalarda ise sitoplazma ve çekirdekte eksprese olduğu rapor edilmiştir (49,50). Çalışmamızda,  $\beta$  katenin lokalizasyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde nukleusta, invazif özellikte olmayan MCF-7 ve T47D hücrelerinde ise plazma membranında lokalize olduğu gözlemlendi. Bulgularımız  $\beta$  kateninin, Hao ve arkadaşlarının tanımladığı bening ve karsinom olarak yapılan sınıflamanın dışında kanser hücrelerinin invazif özellikleriyle ilişkili olarak membrana veya çekirdeğe lokalize olduğunu göstermektedir. Tümörün ilerlemesinde kritik önem taşıyan adezyon moleküllerinin kaybı sonucu hücreler motilite kazanmakta ve invazyon gerçekleşmektedir (51). MDA-MB-231 hücrelerinde gözlediğimiz nukleer  $\beta$  katenin lokalizasyonu, E-kaderin aracılı adezyon yapısının bozulmasıyla hücrenin invazif özelliği arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

$\beta$  kateninin 33, 37 ve 41. residüleri GSK3  $\beta$  fosforilasyonu için hedeftirler ve  $\beta$  kateninin yıkımını sağlarlar. Anti fosfo 33/37/41  $\beta$  katenin antikoru,  $\beta$  katenin fosfopeptidinin bu üç residüsüne karşı üretilmiştir. Fosforilize  $\beta$  kateninin GSK3  $\beta$  tarafından tanınması ve ubiquitin aracılı proteozomal yıkım yolu ile hızla yıkılması beklenir. Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde fosfo  $\beta$  katenin aktivitesi izlenmezken, az sayıda T47 hücrelerinin membranında zayıf immünreaktivite izlendi.  $\beta$  kateninin normal plazma membran lokalizasyonu gösterdiği bu hücrelerde fosforilasyonun olmaması ya da düşük seviyelerde fizyolojik oranlarda ve normal lokalizasyonda saptanması bu hücrelerin

az invazif fakat malign karakteristikleriyle paralel bulgu olarak değerlendirildi. MDA-MB-231 hücre soyunda ise bazı hücrelerin nukleus ve sitoplazmasında fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonu saptandı. Nükleer lokalizasyonlu  $\beta$  katenin ekspresyonu, fosforilize  $\beta$  kateninin yıkımıyla dengelenebilecek düzeyin üzerinde ekspresyon gerçekleştiğini düşündürmektedir. Fosfo  $\beta$  kateninin meme kanser hücrelerindeki düzeyi ve lokalizasyonu ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Çekirdekte ve membranda lokalize  $\beta$  kateninin farklı fonksiyonlara sahip olabileceği ve fosforilize formun transkripsiyon aktivitesinden yoksun olmasının mümkün olduğu ileri sürülmüştür. Kolorektal kanserde yapılan bir çalışmada nükleer fosfo  $\beta$  kateninin iyi prognozla ilişkili olduğunu bildirilmiştir (52).

Meme kanserinde hastalığın prognozu, hasta yaşı, hücre tipi, tümör evresi ve proliferasyon hızı gibi biyolojik karakteristikler tarafından belirlenir. S faz belirteci olarak BrdU inkübasyonu sonrası uygun antikor kullanılarak yapılan immünohistokimyasal işaretleme hücre proliferasyonu tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır (53). BrdU pozitif S faz proliferatif hücre oranının tümör evre ve prognozu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (54). Yüksek S faz proliferasyon oranlarının meme kanserinde de kötü prognozla ilişkili olduğu tanımlanmıştır (55). Çalışmamızda da MCF-7 ve T47D hücre soylarıyla karşılaştırıldığında daha malign karakterde hormon negatif ve invazif bir hücre soyu olan MDA-MB-231’de BrdU işaretli S faz proliferasyon oranı en yüksek değerde bulundu. Östrojen pozitif ve invazif olmayan MCF-7 hücrelerinin daha düşük, östrojen - progesteron pozitif ve invazif olmayan T47D hücrelerinin ise en düşük proliferasyon oranına sahip olduğu izlendi. Bulgularımız S faz proliferasyon oranlarının meme kanserlerinde prognozu belirleyici bir parametre olarak önemini desteklemektedir.

$\beta$  kateninin hücre siklusunun kontrolündeki rolü kesin olarak anlaşılamamıştır. Pek çok kolon kanseri tipinde ve melanomalarda APC mutasyonu tanımlanmıştır. APC’nin inaktive olması ile  $\beta$  kateninin yıkım yolunun bozulduğu ve sitoplazmada  $\beta$  katenin miktarının arttığı bildirilmiştir.  $\beta$  kateninin aşırı birikimi c myc gen aktivasyonuna ve tümör gelişimine neden olur. c myc spesifik DNA bağlantı bölgesi içeren bir transkripsiyon

faktörüdür ve hücre siklusunun düzenlenmesinde önemli rol oynar (56). Meme kanseri hücrelerinde de düşük düzeyde APC mutasyonuna rastlanmış fakat  $\beta$  kateninin aşırı ekspresyonu ile c myc protein düzeyinin artması arasında bir korelasyon saptanmamıştır (57).

Hücre proliferasyonu ve  $\beta$  katenin ilişkisini araştıran, çeşitli hücre türleriyle yapılmış çalışmaların bir kısmı,  $\beta$  kateninin G1/S kontrolünde pozitif rol oynadığını (58), bazıları p53'ün stabilize edilmesiyle hücre siklusu arrestine yol açtığını (59), bazıları ise G1/S geçişinden bağımsız olarak apoptoza yol açtığını (60) bildirmektedir. APC'nin kinetokorlarda mikrotubullerle ilişkide olduğu bildirilmiştir. Bu da APC'nin kromozom kararlılığının kontrolünde ek bir role sahip olduğunu fikrini desteklemektedir (61).

Hücre siklusu sırasında  $\beta$  katenin düzeyleri Olmeda ve arkadaşları tarafından, normal ve transforme epitelyal hücre soylarında (fare epidermal keratinosit hücre soyu MCA3D, PB ve HaCa4, kanin böbrek MDCK ve SW480 hücreleri) incelenmiştir (61). Sonuçları  $\beta$  katenin miktarlarının hücre siklusu sırasında devamlı düzenlendiğini göstermektedir. Çalışmalarında,  $\beta$  katenin düzeyinin S fazında yükseldiğini, geç G2/M fazında maksimum düzeye ulaştığını ve G1 fazında ani bir azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna paralel olarak S ve G2 fazlarında sitoplazma ve çekirdekte lokalize  $\beta$  katenin ve APC düzeylerinin arttığını,  $\beta$  kateninin S fazında bazal düzeye göre 5 yada 10 kat artış gösterdiğini açıklamışlardır.

Normal hücreler, hücre hasarını belirleyen korunma mekanizmalarına sahiptirler. Özellikle DNA'daki hasarlar hemen tespit edilir. Tümör supresör genlerdeki bozukluklar, DNA'daki hasarın ortaya çıkarılmasını engeller, kanser oluşumu ve ilerlemesine neden olan mutasyonların çoğalmasına neden olurlar. Hücre bölünmesinin kontrolünün bozulması meme kanseri dahil tüm kanserlerde görülür. İnsan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde p53 geninde mutasyon saptanmıştır. p53 ve  $\beta$  katenin yolları arasındaki etkileşimin tümör oluşumu ve DNA hasarındaki önemi tanımlanmıştır. p53'ün,  $\beta$  kateninin çekirdekteki aşırı birikimini fark ederek hücrenin apoptoza gitmesini sağladığı ve sonrasında  $\beta$  kateninin plazma membranına gönderildiği bildirilmiştir.

p53'ün  $\beta$  katenin üzerindeki inhibitör etkisinin kesin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir fakat ubikitin proteozom sistemi tarafından düzenlendiği ve aktif GSK3  $\beta$ 'ya ihtiyaç duyduğu düşünülmektedir (63,64).

Çalışmamızda, invazif özelliğe sahip MDA-MB-231 hücrelerinde  $\beta$  kateninin nükleer lokalizasyon gösterdiği, invazif özellikte olmayan MCF-7 ve T47D hücrelerinde ise membran lokalizasyonlarının korunduğu gösterildi. BrdU pozitif S faz proliferasyon oranlarının hücrelerin yüksek malignite özellikleriyle paralel artış gösterdiği tespit edildi. Elde edilen bulgular ışığında, gerçekleştirilecek klinik çalışmalar desteğinde  $\beta$  kateninin meme kanserlerinin malignite ve invazyon özelliklerinin tanımlanmasında potansiyel bir belirteç olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

## 8. SONUÇ

- MDA-MB-231 hücre soyunda  $\beta$  katenin ekspresyonunun nukleus lokalizasyonu gösterdiği izlendi.
- MDA-MB-231 hücre soyunda fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonu bazı hücrelerin nukleus ve nukleusa yakın sitoplazmik bölgelerinde gözlemlendi.
- MCF-7 hücrelerinde  $\beta$  katenin ekspresyonunun hücre membranlarında lokalize olduğu gösterildi.
- MCF-7 hücrelerinde fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonu ise izlenmedi.
- T47D hücre soyunda MCF-7 hücrelerine benzer olarak hücre membranında lokalizasyon gösteren  $\beta$  katenin ekspresyonu saptandı.
- T47D hücre soyunda fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonu tüm hücrelerde izlenmemekle birlikte bazı hücrelerin plazma membranında zayıf immünreaktivite gösteren noktasal alanlar olarak izlendi.
- S fazındaki hücre oranları karşılaştırıldığında MDA-MB 231 hücrelerinin proliferasyon oranının en yüksek, T47D hücrelerinin ise en düşük oranda olduğu izlendi.
- Çalıştığımız meme kanseri hücre soylarında,  $\beta$  katenin ve fosfo  $\beta$  katenin ekspresyonları ve S faz proliferasyon oranlarının hücrelerin invazif özellikleri ve hormon duyarlılıkları ile paralellik gösterdiği sonucuna varılmıştır.



## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarında bana yol gösteren çok değerli hocam Doç. Dr. Meral Koyutürk'e çok teşekkür ederim. Seminerlerimizde bize destek olan sayın Doç. Dr. Nedret Altıok'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında benden yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen Laboratuvar Sorumluları Melike Ersöz ve Türkan Sarıoğlu'na teşekkür ederim. Sevgili Enstitü Sekreterimiz İlknur Karaosmanoğlu'na sevimliliği, telefonla hatırlatmaları ve yardımseverliği için teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimi yapmamı canı gönülden isteyen ve bu konuda beni heveslendiren babam Sedat Karan ve annem Laika Karan'a, sadece eğitim konusunda değil her konuda bana destek, yardımcı ve yol gösterici olan ablalarım Özden Şenkoyuncu ve Esin Karan'a sonsuz teşekkür ederim.

Tezimin son aşamalarında bana yardımcı olan yakın arkadaşım Uzman Tıbbi Biyolog Gözde Erkanlı'ya hep yanımda olduğu için teşekkürlerimi sunarım.

Nişanlım Canbek Korkmaz'a iki yıl önce karşıma çıktığı için, o günden beri bana sevgisini verdiği için ve düşünceli olduğu için çok teşekkür ederim.

## 10. KAYNAKLAR

1. Hagen T, Sethi J, Foxwell N. Signaling activity of catenin targeted to different subcellular compartments. *Biochem J.* 2004, 379: 471-477.
2. Iwamoto M, Ahnen JD, Franklin W, Maltzman T. Expression of beta catenin and full length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis.* 2000, 21: 1935-1940.
3. Behrens J. The role of the wnt signaling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem Soc Trans.* 2005, 33: 672-675.
4. [www.emedicine.com](http://www.emedicine.com)
5. Dale TC. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J.* 1998, 329: 209-223.
6. Staal F.J, Noort MMv, Strous GJ, Clevers HC. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated  $\beta$  catenin. *EMBO Reports.* 2002, 3: 63-68.
7. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 1998, 8: 95-102.
8. <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/CTNNB1ID71.html>
9. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1994, 127: 2061-2069.
10. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science.* 1998, 280: 596-599.
11. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem.* 1995, 270: 5549-5555.
12. <http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/WNTSignPathID20042.html>
13. Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N. Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell.* 2001, 7: 927-936

14. Hamada F. Negative regulation of wingless signaling by D-Axin, a drosophila homolog of axin. *Science*. 1999, 283: 1739-1742.
15. Huber AH, Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*. 2001, 105: 391-402.
16. Kolligs FT, Kolligs B, Hajra KM. Gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Dev*. 2000, 14: 1319-1331.
17. Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
18. Butz S, Kemler R. Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett*. 1994, 355: 195-200.
19. Campbell R.J, Pignatelli M. Molecular histology in the study of solid tumours. *Mol Pathol*. 2002, 55: 80-82.
20. Kemler R, Ozawa M, Ringwald M. Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 1989, 1: 892-897.
21. Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weiss W.I. Alfa catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-b catenin and regulates actin filament assembly. *Cell*. 2005, 123: 903-915.
22. Yap AS, Goodwin M. Cell adhesion by cadherin receptors: a brief primer. *Australian Biochemist*. 2004, 35: 13-16.
23. Chen X, Kojima S, Borisy GG, Green KJ. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol*. 2003, 163: 437-40.
24. Anastasiadis PZ, Reynolds AB. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci*. 2000, 113: 1319-34.
25. Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB. A core function for p120-catenin in cadherin turnover . *J Cell Biol*. 2003, 163: 525-534.
26. McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*. 1991, 254: 1359-1361.

27. Gumbiner BM. Signal transduction of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 1995, 7: 634-640.
28. Wodarz A. Mechanisms of wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Bio.* 1998, 14: 59-88.
29. Cong F, Schweizer L, Varmus H. Wnt signals across the plasma membrane to activate the  $\beta$ -catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development.* 2004, 131: 5103-5115.
30. Enver T, Ashworth A. Receptor and secreted targets of wnt-1/b catenin signaling in mouse mammary epithelial cells. *BMC Cancer.* 2005, 5: 3.
31. [http://www.mol-med.uni-freiburg.de/molmed/ag\\_hecht/images/figure\\_1.html](http://www.mol-med.uni-freiburg.de/molmed/ag_hecht/images/figure_1.html)
32. Everly DN, Kusano S, Traub NR. Accumulation of cytoplasmic  $\beta$ -catenin and nuclear glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in epstein-barr virus-infected cells. *J Virol.* 2004, 78: 11648–11655.
33. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen J.S, Ben Shushan E, Mann M., Ben Neria Y, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of  $\beta$ -catenin at Ser 45: A molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 2002, 16: 1066-1076.
34. Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers J, Kühl M, Schaeffer H. J, Huelsken J, Behrens J, Hammerschmidt M, Birchmeier W. The ankyrin repeat protein diversin recruits casein kinase I $\epsilon$  to the  $\beta$ -catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signalling. *Genes Dev.* 2002, 16: 2073 -2084.
35. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Gyeong-Hun B, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of  $\beta$ -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell.* 2002, 108: 837-847.
36. Miyoshi K, Rosner A. Activation of different wnt/b catenin signaling components in mamary epithelium induces transdifferentiation and the formation of pilar tumors. *Oncogene.* 2002, 21: 5548-5556.
37. Bhatia N, Spiegelman VS. Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling in mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2005, 42: 213-21.
38. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 2002, 109: 987-991.

39. Howe L.R, Brown A.M.C. Wnt signaling and breast cancer, *Cancer Biology and Therapy*. 2004, 3: 36-41.
40. Wu R, Zhai Y, Fearon E.R, Cho K.R. Diverse Mechanisms of  $\beta$ -catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res*. 2001, 61: 8247-8255.
41. Wright K, Wilson P, Morland S, Campbell I, Walsh M, Hurst T, Ward B, Cummings M, Chenevix-Trench G. Beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours. *Int J Cancer*. 1999, 27: 625-629.
42. <http://nobelprize.org/medicine/educational/2001/>
43. Björklund M, Taipale M, Varjosalo M, Saharinen J, Lahdenperä J, Taipale J. Identification of pathways regulating cell size and cell-cycle progression by RNAi. *Nature*. 2006, 439: 1009-1013.
44. <http://www.expertreviews.org>
45. <http://www.harcourt-international.com/e-books/pdf/952.pdf>
46. [http://www.breastcancer.org/tre\\_sys\\_hrt\\_role](http://www.breastcancer.org/tre_sys_hrt_role)
47. Oh DS, Troester MA, Usary J, Hu Z, He X, Fan C, Wu J, Carey LA, Perou CM. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. *J Clin Oncol*. 2006, 24: 1656-64.
48. Jönsson M, Borg AE, Nilbert M, Andersson T. Involvement of adenomatous polyposis coli (APC)/b-catenin signalling in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 2000, 36: 242-248.
49. Nhieu JT, Renard CA, Wei Y, Cherqui D, Zafrani ES, Buendia MA. Nuclear accumulation of mutated beta-catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *Am J Pathol*. 1999, 155: 703-710.
50. Wong SCC, Lo ESF, Chan AKC, Lee KS, Hsiao WL. Nuclear beta catenin as a potential prognostic and diagnostic marker in patients with colorectal cancer from Hong Kong. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 2003, 56: 347-352.
51. Pećina-Šlaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*. 2003, 3: 17-24.

52. Chung GG, Provost E, Kielhorn EP, Charette LA, Smith BL, Rimm DL. Tissue microarray analysis of beta catenin in colorectal cancer shows nuclear phospho beta catenin is associated with a better prognosis. *Clin Cancer Res.* 2001, 7: 4013-4020.
53. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell R, Henderson E. Evaluation of cell proliferation in rat Tissues with brdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem.* 2003, 51: 1681-1688.
54. Charlotte R. Wenger and Gary M. Clark. S-phase fraction and breast cancer -a decade of experience. *Breast Cancer Res Treat.* 1998, 51: 255-265.
55. Kaufmann M. Review of known prognostic variables. *Recent Results Cancer Res.* 1996, 140: 77-87.
56. Seth A, Gupta S, Davis RJ. Cell cycle regulation of the c-Myc transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol.* 1993, 13: 4125-4136.
57. Schlosshauer P, Brown SA, Eisinger K, Yan Q, Guglielminetti E.R, Parsons R, Ellenson L.H, Kitajewski J. APC truncation and increased beta catenin levels in a human breast cancer cell line. *Carcinogenesis.* 2000, 1: 1453-1456.
58. Orford K, Orford CC, Byers SW. Exogenous expresion of beta catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis and radiation induced cell cycle arrest. *J Cell Biol.* 1999, 146: 855-868.
59. Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I. Excess  $\beta$ -catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J.* 1999, 18: 3054-63.
60. Kim K, Pang KM, Evans M, Hay ED. Overexpression of beta catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Mol Biol Cell.* 2000, 11: 3509-3523.
61. Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A. B Catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell.* 2003, 14: 2844-2860.
62. Sadot E, Geiger B, Oren M, Ben-Zee'ev A. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol.* 2001, 21: 6768-6781.
63. Chandar N, Saluja R, Lamar PC, Kolmanand K, Prozialeck WC. P53 and beta-catenin activity during estrogen treatment of osteoblasts. *Cancer Cell Int.* 2005, 5: 24