



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**HER2+ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE PAN-HER
INHİBİTÖRÜ DACOMITINIB'E HÜCRE ÖLÜMÜ CEVABININ
AVEN TARAFINDAN DÜZENLENMESİ**

Sinejan ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA 2018



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**HER2+ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE PAN-HER
INHİBİTÖRÜ DACOMITINIB'E HÜCRE ÖLÜMÜ CEVABININ
AVEN TARAFINDAN DÜZENLENMESİ**

Sinejan ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Özgür KÜTÜK

ANKARA 2018



T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Genetik Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Sinejan Özcan tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/01/2019

Tez Konusu: “HER2+ Meme Kanseri Hücrelerinde pan-HER İnhibitörü Dacomitinib’e Hücre Ölümü Cevabının Aven Tarafından Düzenlenmesi”

TEZ DANIŞMANI: **Dr. Öğr. Üyesi Özgür KÜTÜK**

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Feride İffet Şahin

Başkent Üniversitesi

Prof. Dr. Abdullah Ekmekci

Gazi Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Özgür Kütük

Başkent Üniversitesi

ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun ..31... / ..01... / 2019 tarih ve ...6...10.. Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ
Enstitü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 22/02/2019

Öğrencinin Adı, Soyadı: Sinejan Özcan

Öğrencinin Numarası: 21610217

Anabilim Dalı: Tıbbi Genetik AD

Programı: Tıbbi Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Doç. Dr. Özgür Kütük

Tez Başlığı: HER2+ Meme Kanseri Hücrelerinde panHER inhibitörü Dacomitinib'e Hücre Ölümü Cevabının Aven Tarafından Düzenlenmesi.

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 59 sayfalık kısmına ilişkin, 22/02/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

Onay

22/02/2019

Öğrenci Danışmanı İmzası, Adı, Soyadı,
Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi
Doç. Dr. Özgür KÜTÜK
Dip. Tes. No: 104439
Tıbbi Genetik A.D.

TEŞEKKÜR

Adana’da yaşadığım ve Başkent Üniversitesi’nde görmüş olduğum eğitim süresince araştırmacı kişiliği ve çalışma disipliniyle yoluma ışık tutan, her anlamda desteğini esirgemeyen, aynı zamanda bana rol model olan değerli hocam Doç. Dr. Özgür KÜTÜK’e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tüm sorularımı her zaman ve büyük içtenlikle yanıtlayan, değerli teknik bilgilerini paylaşan, çok kıymetli hocam Doç. Dr. Yunus Kasım TERZİ’ye tüm destekleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca üretken ve çalışkan kişilikleri ile bana örnek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Feride İffet Şahin ve Prof. Dr. Zerrin YILMAZ ÇELİK’e aktarmış oldukları değerli bilgiler için teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca desteğini ve sıcaklığını hiç esirgemeyen, Başkent Üniversitesi’ndeki ilk danışmanım ve çok değerli hocam Prof. Dr. Özlem Darcansoy İŞERİ’ye teşekkür ederim.

Ankara’yı bana evim gibi hissettiren, eğitimimin ilk gününden son gününe kadar arkadaşlıklarıyla ve ablalıklarıyla hayatımı renklendiren, sitogenetik laboratuvarı tecrübelerini titizlikle benimle paylaşan değerli ablalarım Sinem Ataklı, Sinem Güder ve Şeyma Ateş’e; Adana’da olduğum süre boyunca desteklerini eksik etmeyen Yeliz ÖZMAY AKA, Nihal EREN ve Sultan ELKATMIŞ’a teşekkür ederim.

Kendilerini çok kısa sürede çok sevdiğim, destek ve dostluklarını paylaşan, her zaman hayatımda olmalarını çok istediğim naif insanlar olan değerli ablam MSc. Esra Başyigit ve arkadaşım Arş. Gör. Zeynep Kavasoglu’na her şey için teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca bana kapılarını açan ve beni kızları gibi seven, ailemi hasretini dindiren değerli büyüklerim Duriye ŞİMŞEK ve Ünal ŞİMŞEK’e de teşekkürlerimi sunarım.

Benim en büyük destekçilerim, en değerli hazinem biricik annem Nuriye ÖZCAN, canım babam Cahit ÖZCAN, kardeşim Aslıcan ÖZCAN ve canım kızım Barine’ye saygılarımı sunar ve minnettarlığımı belirtmek isterim.

Sabırla, özveriyle ve güçlü duruşuyla hep desteğini ve sonsuz sevgisini hissettiğim Mehmet Ali AYKAÇ’a teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezi Başkent Üniversitesi tarafından DA18/28 proje koduyla desteklenmiştir.

ÖZET

Sinejan ÖZCAN

HER2+ Meme Kanseri Hücrelerinde Pan-Her İnhibitörü Dacomitinib'e Hücre Ölümü Cevabının AVEN Tarafından Düzenlenmesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, 2018

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipidir ve geliştirilen yenilikçi tanı ve tedavi stratejilerine rağmen mortalite oranları halen yüksek seyretmektedir. Bu durumun en önemli nedenlerinden birisi hastanın tedavisinin başlangıcında varolan ya da tedavi sırasında ortaya çıkan terapi direncidir. HER reseptör ailesinin üyelerinin mutasyon ya da amplifikasyon ile aşırı aktif hale gelmesi birçok meme kanseri tipinde malign değişikliklerin nedenidir. HER2 amplifikasyonu meme kanseri hastalarının yaklaşık yüzde 20'sinde görülmektedir ve kötü prognozla ilişkilidir. Trastuzumab ve lapatinib gibi hedeflenmiş terapiler her ne kadar bu tümörlerde etkinlik gösterebilirler de terapi direnci önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle tüm HER ailesi üyelerini eşzamanlı olarak hedefleyen panHER inhibitörleri (neratinib, dacomitinib, afatinib) geliştirilmiştir. Mitokondriyal apoptotik yolak gerek konvansiyonel gerekse hedeflenmiş terapilerin kanser hücreleri üzerindeki öncelikli etki yollarındandır. Mitokondriyal apoptotik yolak BCL-2 protein ailesi tarafından düzenlenir. BAX ve BAK proteinlerinin aktivatör BH3 proteinleri tarafından aktive edilmesi, mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin artışı, sitokrom c'nin sitozole geçişi ve kaspaz aktivasyonu mitokondriyal apoptotik yolağın ana basamaklarıdır.

AVEN, mitokondriyal apoptoz yolağının ve DNA hasar yanıtının düzenlenmesinde kritik rol oynayan sitozolik bir proteindir. BCL-xL proteininin anti-apoptotik aktivitesini destekleyerek ve Apaf-1 proteinin oligomerizasyonunu engelleyerek apoptoz yanıtını inhibe etmektedir. Dahası sahip olduğu sinyal dizisi sayesinde nükleusa geçerek ATM ve ATR proteinleri ile etkileşime girmekte ve hücre döngüsünün regülasyonunda rol oynamaktadır. AVEN'in ifadenmesindeki ve/veya aktivasyonundaki artış kanserleşme ve ilaç direnciyle ilişkilendirilmektedir.

Bu çalışmada amacımız AVEN'in HER2+ meme kanseri hücrelerinde dacomitinib tarafından indüklenen hücre ölümü cevabını nasıl etkilediğini ortaya koymaktı. Bu amaç çerçevesinde HER2+ SKBR3 meme kanseri hücrelerinde AVEN ifadenmesini arttırarak ya da azaltarak hücre ölümü cevabını değerlendirdik. AVEN'in aşırı ifadenmesi dacomitinib tarafından indüklenen mitokondriyal hücre ölümü cevabını azaltırken, RNAi yoluyla sustumu ise hücre ölümü cevabını arttırdı. Gerçekleştirdiğimiz alışma literatürde HER2+ meme kanseri hücrelerinde AVEN'in panHER baskılanmasına cevaben mitokondriyal hücre ölümünü nasıl etkilediğine dair ilk bulguları sağlamıştır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, HER reseptör ailesi, panHER inhibitörleri mitokondriyal hücre lm

Bu yüksek lisans tezi Başkent niversitesi tarafından DA18/28 proje koduyla desteklenmiştir.

ABSTRACT

Sinejan OZCAN

The Modulation of PanHER Inhibitor Dacomitinib-Induced Apoptosis by AVEN in HER2+ Breast Cancer Cells

Medical Genetics Department,

Master's Thesis, 2018

Breast cancer is the most common malignancy in women and the mortality rates are still high despite the development of novel diagnostic and therapeutic strategies. Resistance to therapy is among the leading causes of therapy failure, presenting either initially or emerges during the course of the therapy. Overactivation of HER family of receptor kinases due to mutations or amplifications promotes malign transformation in various breast cancer cases. HER2 amplification is seen in 20% breast cancer patients and related to poor prognosis. Targeted therapies including trastuzumab and lapatinib exerted prominent antitumor effect in these breast cancer tumors, but therapy resistance significantly circumvents their activities. To cope with this issue, several panHER inhibitors (neratinib, dacomitinib, afatinib) have been developed. Mitochondrial apoptotic pathway is among the main mechanisms that modulates the effects of conventional and targeted therapies on cancer cells. BCL-2 proteins regulate mitochondrial apoptotic pathway. Activation of BAX and BAK by BH3-only proteins leads to mitochondrial outer membrane permeabilization, translocation of cytochrome c into cytosol and caspase activation are key steps of mitochondrial apoptotic signaling.

AVEN is a cytosolic protein which regulates mitochondrial apoptotic pathway and DNA damage response. AVEN interferes with apoptotic signaling by enhancing the antiapoptotic activity of BCL-XL and by preventing Apaf-1 oligomerization. In addition, AVEN translocates to nucleus by means of its nuclear localization signal and interacts with ATM and ATR. These interactions regulate cell cycle response. Furthermore, increased AVEN activity or expression have been shown to trigger tumorigenesis and tumor maintenance.

In this study, we aimed to identify how AVEN regulates dacomitinib-induced cell death response in HER2+ breast cancer cells. To explore these responses, we overexpressed or silenced AVEN in HER2+ SKBR3 breast cancer cells. AVEN overexpression led to attenuation of dacomitinib-induced mitochondrial apoptotic response and RNAi-mediated suppression of AVEN increased dacomitinib-induced apoptosis. Our results provided first findings in the literature regarding the modulation of panHER inhibition-induced apoptosis by AVEN.

Keywords: Breast cancer, HER receptor family, panHER inhibitors, mitochondrial apoptosis

This master thesis was supported by Baskent University by DA 18/28 project code.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
EŞİTLİKLER.....	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptör Ailesi.....	3
2.1.1. ErbB/HER reseptörleri ve yapıları	4
2.1.2. Normal fizyolojik koşullar altında reseptör aktivasyon mekanizmaları	6
2.1.3. Reseptörlerin onkojenik aktivasyon mekanizmaları	10
2.1.3.1. Kanser ve ErbB2/HER2 aşırı ifadenmesi	12
2.2. Kanserde Erbb Reseptör Hedefli Tedavi.....	15
2.2.1. Dacomitinib.....	16
2.3. Apoptoz	17
2.4. AVEN	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereçler.....	27

3.2. Yöntemler	29
3.2.1. Hücre kültürü	29
3.2.2. İlaç uygulaması	29
3.2.3. MTT deneyi	30
3.2.4. Protein İzolasyonu ve protein konsantrasyonu ölçümü	30
3.2.5. İmmünoablottlama	31
3.2.6. Transfeksiyon deneyleri	31
3.2.7. Kaspaz aktivasyon testi	33
3.2.8. Annexin V/PI boyama ve akış sitometrisi	33
3.2.9. İstatistiksel Analizler	33
4. BULGULAR	34
4.1. Hücre proliferasyonu analizleri	34
4.2. Transfeksiyon etkinliği analizi	36
4.3. Apoptotik hücre analizi	37
4.4. Kaspaz-3 ve -9 aktivasyonu analizi	39
4.5. SK-BR-3 meme kanseri ve MCF10 normal meme epitel hücrelerinin ölüm cevabı	42
4.6. Dacomitinib uygulamasıyla AVEN lokalizasyonundaki değişimler	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	51
7. KAYNAKLAR	53
8. EKLER	81
Ek A: CoLocalizer Pro analiz sonuçları	80

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	celsius
µM	Mikro molar
ALL	Akut Lemfoblastik Lösemi
AML	Akut Miyeloid Lösemi
APAF-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
ATM	Ataxia–telangiectasia-mutated (protein kinase)
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BAD	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death
BAK	BCL2 Antagonist/Killer
BAX	BCL2 Associated X
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-w	BCL2 like 2; BCL2L
BCL-xL	B-cell lymphoma-extra large
BH	BCL homoloji
BIK	BCL-2 Interacting Killer
BID	BH3 Interacting Domain Death Agonist
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death
BMF	BCL-2 Modifying Factor
BOK	BCL-2-related ovarian killer protein
Cdk	Cycline- dependent kinase

DIABLO / SMAC	Diablo IAP binding mitochondrial protein / Second mitochondrial activator of caspases
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECD	Extracellular domain
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor Family
ER	Endoplazmik retikulum
ErbB	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase
ERBIN	ErbB2 Interacting Protein
FasL	Fas ligand
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GFP	Green fluorescent protein
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HCl	Hidroklorik asit
HER	Human Epidermal Receptor
HRK	Harakiri, BCL-2 interacting protein
IAP	Inhibitor Of Apoptosis
ICD	Intracellular domain
JAK	Janus kinaz
JMD	Juxtamembrane domain
kDa	Kilodalton
LR-NES	Leucine-rich nuclear export sequence

MAB	Monoklonal antikolarlar
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NCDD	Nomenclature Committee on Cell Death
Nm	Nanometre
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1; PMAIP1
NRG	Nöregülinlerdir
OMM	Outer mitochondrial membrane
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Power of Hydrogen
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PS	Phosphatidil-serine
PTB	Phospho-tyrosine binding
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH2	Src homoloji-2
STAT	Signal transducer and transcription activator
TGF- α	Transforming growth factor- α
TKD	Tyrosine kinase domain
TKI	Tirozin kinaz inhibitörü
TNF- α	Tumor necrosis factor - α

TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
XIAP	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis



ŞEKİLLER

Şekil

1. EGF reseptörlerinin yapısı (Collin ve ark., 2015).....	4
2. EGF reseptörlerinin aktivasyonu (Collin ve ark., 2015)	7
3. EGF reseptörleri ve düzenledikleri hücre içi mekanizmalar (https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-tyrosine-kinase/erbb-her-signaling-interactive-pathway/pathways-erbb)	9
4. ErbB reseptörlerinin hücre ölüm ve sağ kalım ile ilişkili molekülleri ile etkileşimi (Danielsen ve Maihle, 2002)	10
5. ErbB2/HER2 aşırı ifadenmesi ile indüklenen hücre içi yanıtlar (Moasser, 2007)	13
6. Dacomitinib'in kimyasal yapısı (https://www.selleckchem.com/products/pf299804.html)	16
7. Programlı hücre ölüm mekanizmaları (Galluzzi ve ark., 2018).....	17
8. BCL-2 protein ailesi üyeleri ve aralarındaki etkileşimler (Moldoveanu ve ark., 2014)	20
9. Eksinrik ve insinrik apoptoz yolları ile apoptoz sürecinin şematik gösterimi (Ichim ve ark.,2016)	22
10. AVEN'in BCL-xL, Apaf-1, ATM ve ATR ile etkileşimi (Gross, 2008).....	25
11. pcDNA3 vektör haritası (https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pcDNA3).....	32

- 12.** Şekil 12. Dacomitinib uygulamasıyla zamana-bağlı değişen proliferatif yanıtlar a. SKBR3 ve N-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3, b. SKBR3, C-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3 ve pcDNA3-FLAG+ SKBR3, c. MCF10A hücre gruplarına ait bulgular **34**
- 13.** siRNA ve vektörün transfeksiyon etkinliğinin immünoiblotla kontrolü a. pcDNA3-FLAG-AVEN ve pcDNA3 vektörlerinin transfeksiyon etkinliğinin kontrolü b. AVEN siRNA ve negatif kontrol siRNA transfeksiyon etkinliği **36**
- 14.** Dacomitinib uygulamasıyla ilişkili olarak apoptotik hücre yüzdelerinin Annexin V/ PI boyama ile gösterimi a. SKBR3, pcDNA3-FLAG+ SKBR3, AVEN+ SKBR3 hücre gruplarıdaki apoptotik hücre yüzdeleri b. Negatif kontrol siRNA+ SKBR3 ve AVEN- SKBR3 hücre gruplarıdaki apoptotik hücre yüzdeleri **37**
- 15.** Dacomitinib tarafından indüklenen kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunun AVEN ekspresyonu ile düzenlenmesin a. SKBR3, pcDNA3-FLAG+ SKBR3, AVEN+ SKBR3 hücre gruplarıdaki kaspaz aktivite ölçümleri b. Negatif kontrol siRNA+ SKBR3 ve AVEN- SKBR3 hücre gruplarıdaki kaspaz aktivite ölçümleri c. MCF10 hücre grubundaki kaspaz aktivite ölçümleri **39**
- 16.** HER2+ SKBR3 meme kanseri ve MCF10 normal meme epitel hücrelerinin 1 µM dacomitinib uygulamasına hücre ölümü cevabı **42**
- 17.** Şekil 17. AVEN+ SKBR3 hücrelerinden dacomitinibin kontrol, 4, 8, 16, 24 ve 48 saat uygulama gruplarından alınan konfokal mikroskop görselleri **44**

TABLULAR

Tablo

1. ErbB aile üyelerinin dimer kombinasyonları (Harvey ve ark., 2013).....	5
2. Apoptoz faktörlerinin sembolleri, dahil oldukları sınıflar ve sembollerinin İngilizce'deki karşılıkları	21
3. Kullanılan cihazlar	27
4. Kullanılan medyum ve kimyasallar	27
5. Kullanılan solüsyonlar	28
6. Kullanılan kitler ve SiRNA.....	28
7. Dacomitinib uygulamasın 0-2-4-8-16-24-48'inci saatlerinde AVEN'in nükleer lokalizasyonundaki değişiklikler.....	43

EŞİTLİKLER

EŞitlik 1. H¼cre Canlılığı (%) = (Absorbans (Kontrol Grubu) / Absorbans (Deney Grubu)) x 100..... 35



1. GİRİŞ

Kanser tek bir hastalıktan ziyade birden fazla patolojinin ortaya çıkardığı bir spektrum bozukluk olarak değerlendirilebilir. Hanahan ve Weinberg'in tanımladığı hücre ölümüne direnç, metabolizmanın değişikliğe uğraması, immün sistemden kaçış, replikatif mortalite gibi özellikler bu spektrumu belirler. Çevresel faktörlerin de katkısıyla çok basamaklı bir sürecin sonucunda ortaya çıkan tümörler mutasyon birikimi ile beraber onkojenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcıların inaktivasyonu ile karakterizedir.

Birçok kanser tipinde mortalite ve morbidite oranları düşmesine rağmen, kanser tüm dünyada önemli bir sağlık problem olmaya devam etmektedir. 2012 yılında GLOBOCAN tarafından yayımlanan data setine göre meme kanseri senelik 1.7 milyon yeni vaka ile toplam kanser teşhislerinin yaklaşık yüzde 12'sini oluşturmaktadır.

Kanser tedavisinde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, endokrin terapisi, immünoterapi ve hedeflenmiş terapiler kullanılan başlıca tedavi yaklaşımlarıdır. Hastanın tümöründeki kanser hücrelerinin moleküler düzeyde karakterizasyonu kişiye özgü ya da tümöre özgü hedeflenmiş terapilerin geliştirilmesine, böylece hem etkin hem de daha az yan etkiye sahip, hastalara yüksek yaşam standardı sağlayan bütüncül bir yaklaşımın geliştirilmesini sağlamıştır. Kanser spektrumundaki patolojileri hedefleyebilecek moleküllerin geliştirilmesi ya da geliştirilen moleküllerin etkinliğinin ve seçiciliğinin artırılması sinyal iletisi düzeyinde bu moleküllerin etkilediği yolların ortaya konulması ile mümkündür.

Meme kanseri hücreleri iki temel reseptör ailesi üzerinden sağkalım, proliferasyon ve progresyonlarını devam ettirirler. Östrojen ve progesteron reseptörleri meme kanserinin moleküler patolojisinde tanı, sınıflandırma ve endokrin terapileri ile hedeflenebilme özellikleri ile önemli rol oynamaktadır. HER reseptör kinaz ailesinin önemli bir üyesi olan HER2 invazif meme kanserlerinin yaklaşık yüzde 20'sinde aşırı ifadenme/amplifikasyon gösterir. Trastuzumab gibi HER2 hedefleyici tedavilerin klinik kullanıma girişine kadar HER2+ meme kanseri tümörleri oldukça agresif ve kötü prognozla seyreden tümörlerdi. Nitekim trastuzumab gibi HER2 hedefleyici antikolar, lapatinib gibi küçük molekül tirozin kinaz inhibitörleri klinik etkinlik gösterse de baştan beri varolan ya da sonradan edinilen terapi direnci bu moleküllerin

etkinliğini kısıtlamaktadır. HER ailesinin diğ er üyelerinin aktivasyonu bu direnç mekanizmalarından birisi olduğu için dacomitinib, afatinib, neratinib gibi panHER inhibitörleri geliştirilmiş ve klinik fazlarda denenmektedir.

Bu bağlamda daha önce farklı hüresel kontekslerde apoptoz sinyal iletisi ve DNA hasarı cevabı üzerine etkisi gösterilmiş AVEN'in bir panHER inhibitörü olan dacomitinib'in HER2+ meme kanseri h relerindeki etkisi olup olmayacağını araştırmayı planladık. Meme kanseri h relerinde panHER inhibitörlerine hücre ölümü cevabının moleküler mekanizmalarının ve bu mekanizmaların parçalarının ortaya konulması daha etkin ve akılcı tedavi olanaklarının geliştirilmesi için kritik önemdedir. Çalışmalarımızın sonucunda elde ettiğimiz bulgular AVEN'in HER2+ meme kanseri h relerinde panHER inhibitörü cevabını düzenleyebileceğini ortaya koyarken mitokondriyal apoptotik yolağın düzenlenme mekanizmalarına dair ileri çalışmaların da  n n  a mıştır.

2. GENEL BİLGİLER

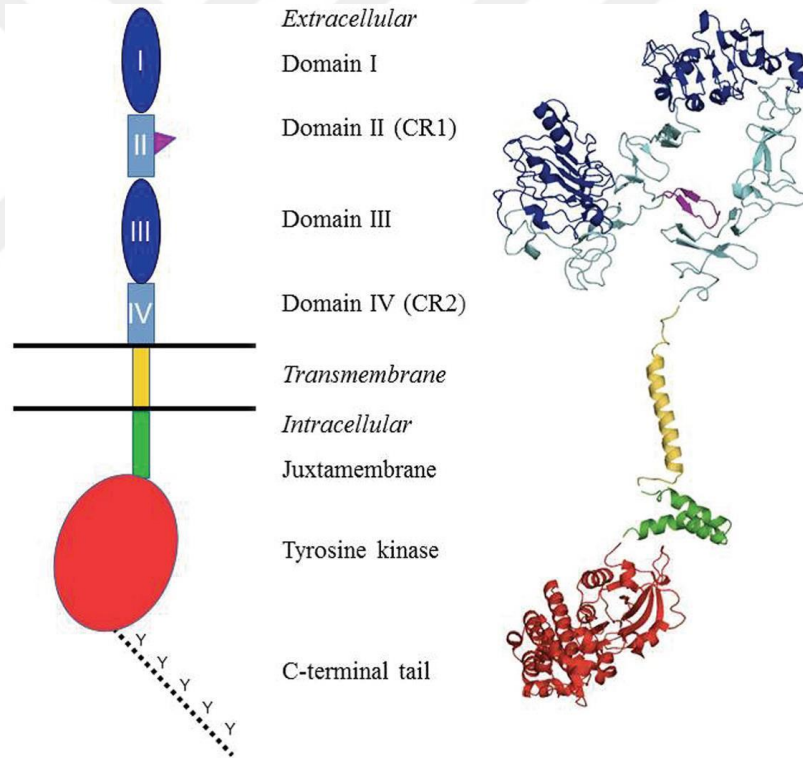
2.1. Epidermal Büyüme Faktör Reseptör Ailesi

EGFR1/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 ve ErbB4/HER4, Epidermal Büyüme Faktör Reseptör Ailesi (ErbB/ EGF/ HER) üyeleridir. EGF'in ardından 1975 yılında reseptörü (EGFR), 1980 yılında ise EGF reseptörünün kinaz aktivitesi keşfedilmiştir (275-277). İlerleyen yıllarda EGFR ile yüksek oranda dizi benzerliği gösteren diğer aile üyeleri sırasıyla c-ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3 ve ErbB4/HER4 keşfedilmiş, bu reseptörlerin yapıları ve işlevleri hakkında detaylı çalışmalar yapılmıştır (4, 5, 7, 10).

ERbB reseptörleri; epitelyal, mezenkimal ve nöronal orijinli çeşitli dokularda ifadelenmektedirler. Reseptörlerin aktivasyonları, epidermal büyüme faktör (EGF) ailesi ligandlarının temporal ve uzamsal ifadelenmesi aracılığıyla uyarılmakta ve hücre dışı sinyallerin net hücre fonksiyonuna dönüştürülmesine aracılık etmektedirler (278-280). Bu dört transmembran reseptör pleotropik hücre yüzeyi sinyalizasyon sisteminin parçasıdır (33). Hücresele seviyede hücre siklusunun ilerlemesi, proliferasyon, hücre ölümü, protein sentezi, metabolizma ve farklılaşma gibi çok sayıda süreci düzenlemektedirler (17-19, 66, 281). ErbB reseptör sinyalizasyonundaki anomaliler kansere neden olmaktadır (90, 282). ErbB reseptörlerinin aşırı aktifleşmesine neden olan mutasyonlar, aşırı ifadelenmeleri ve/veya amplifikasyonları; proliferasyon ve sağkalım yanıtlarının artışına, hücre ölüm yanıtının azalmasına, bunların yanı sıra; hücre metastazı için gerekli olan adezyon, migrasyon, invazyon ve neo-anjiyoneenez mekanizmalarında anormal düzeyde artışına aracılık ederek agresif tümörojenik fenotipin gelişimini desteklemektedir. (283-28).

2.1.1. ErbB reseptörleri ve yapıları

ErbB reseptörlerinin keşfi 20'inci yüzyılın sonlarına doğru ard arda gerçekleşmiştir. Keşfedilen ilk aile üyesi ErbB1/EGFR, 170 kDa ağırlığındaki bir glikoproteindir. Kodlayan gen 186 kB uzunluğunda ve 28 ekzonlu olup 7'nci kromozomun p12 lokusunda bulunmaktadır. (1, 2, 3). ErbB2/HER2, 185 kDa'luk bir protein olarak karakterize edilmiştir. Kodlayan gen 32 ekzonlu olup 17'nci kromozomun q12 lokusunda konumlanmaktadır (4). ErbB3, EGFR/ErbB ailesinin, genomda 12'nci kromozomun q13.2 lokusunda kodlanan yaklaşık 148 kDa ağırlığındaki üçüncü üyesi; ErbB4 ise aynı ailenin 2'nci kromozomunun q34 lokusunda kodlanan yaklaşık 146 kDa ağırlığındaki dördüncü üyesi olarak 1980'lerin sonlarında tanımlanmışlardır (5, 6, 7).



Şekil 1. EGF reseptörlerinin yapısı (8)

ErbB reseptör ailesi üyelerinin iyi korunmuş yapıları yüksek oranda birbirlerine benzerlik göstermektedirler (Şekil 1.). Reseptörler ortak olarak; ligand bağlanma alt birimi ve dimerizasyon kollarının bulunduğu hücre dışı birimi (ECD),

zar geçen birimi (TMD), jukstamembran düzenleyici birim (JMD) ve tirozin kinaz altbirimi (TKD) ile karboksil (C)-terminal kuyruğun bulunduğu hücre içi birimden (ICD) oluşmaktadırlar (5-7, 9-11).

Reseptörlerin hücre dışı birimleri ortak olarak 4 temel alt birimden oluşmaktadır; alt birim-I, -II, -III, -IV. Reseptörler inaktif formdayken hücre dışı birim kompakt konfigürasyondadır; alt birim-II içindeki sisteince zengin β -saç tokası formundaki dimerizasyon kolu, molekül içi oto-inhibitör etkileşimler aracılığıyla alt birim-IV içerisine tamamen gömülü durumdadır. Lösince zengin alt birim-I ve -III ise daha serbest yapıda olup ligand ile etkileşime girmektedir. (12). ErbB2/HER2 monomerinin ECD'si yapısal olarak diğer aile üyelerinden farklıdır; normal fizyolojik koşullarda genellikle aktive edilmiş reseptör formuna benzer, sabit konformasyonda bulunmaktadır. Ayrıca diğer aile üyeleri ile etkileşime giren çok sayıda ligand olmasına rağmen, ErbB2/HER2 ile etkileşime girdiği bilinen bir ligand halen tanımlanamamıştır (13). Sahip olduğu bu özellikleri nedeniyle aile üyelerinin ErbB2/HER2 ile dimerleşme eğilimi, diğer üç aile üyesininkinden daha yüksektir (Tablo1) (14). Dimerleşme ve aktive olma eğilimi yüksek olan ErbB2/HER2'nun bilinen proto-onkogenik ve onkogenik formları da mevcuttur (16).

Tablo 1. ErbB aile üyelerinin dimer kombinasyonları (13).

	ErbB1	ErbB2	ErbB3	ErbB4
ErbB1	1-1	1-2	1-3	
ErbB2		2-2 ^a		
ErbB3	3-1	3-2	3-3 ^b	3-4
ErbB4		4-2		4-4

ErbB reseptörlerinin hücre içi birimini birer adet TKD ve C-terminal kuyruktan oluşmaktadır (17-19). Ligand yokluğunda ICD birim *cis-otoinhibisyon* konformasyondadır. Bu konformasyonda, aktivasyon halkası adı verilen bir alt alt birimin doğrudan enzimatik bölgenin aktif bölgesine bağlanarak ATP ve substratın bağlanmasına engel olmaktadır. Ligand aracılı dimerizasyonla bu *cis-otoinhibisyon* düzeni bozunmakta ve enzimatik bölge aktifleşmektedir (20-23). ErbB3/HER3

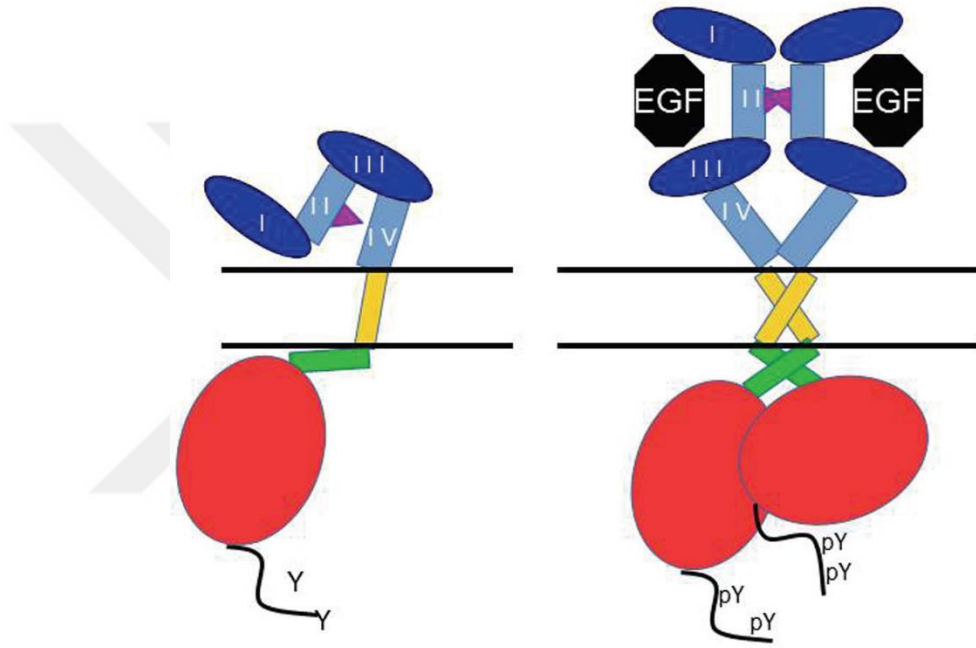
reseptörünün TKD'sının yapısı diğer aile üyelerinden farklıdır; birimin aktivasyonu ile ilişkili önemli tirozin gruplarının bir kısmına sahip değildir. Bu nedenle diğer aile üyelerininkine kıyasla yaklaşık 1-1000 kat daha zayıf kinaz aktivitesine sahiptir (5, 7, 24-26). Buna rağmen ATP bağlayabilmekte ve dimerize olduğu reseptörde trans-fosforilasyonu uyarabilmektedir (12, 27- 29).

2.1.2. Normal Fizyolojik Koşullar Altında Reseptör Aktivasyon Mekanizmaları

Reseptörlerin aktivasyonu, büyüme faktör ligandlarının hücre dışı alt birim -1 ve -3'e bağlanması ile uyarılmaktadır (30). EGF reseptörlerinin aktivasyonu ile ilişkili olduğu bilinen, yaklaşık 40-60 amino asit uzunluğunda ve peptid yapılı, on ikiden fazla monomerik ligand tanımlanmıştır (31,32). Bu ligandlar 3 temel gruba ayrılmaktadır. İlk grup EGFR/ErbB1'e özgül bağlanan; EGF, transforme edici büyüme faktör- α (TGF- α) ve amfiregülünü kapsamaktadır. İkinci grup betasellülin, heparin-bağlı EGF (HB-EGF) ve epiregülinden oluşmaktadır; bu ligandlar çifte-özgüllük göstermekte ve hem EGFR/ErbB1 hem de ErbB4'e bağlanmaktadır. Üçüncü gruba dahil olan ligandlar ise nöregülinlerdir (NRG'ler); bu grubun iki üyesi olan NRG1 ve NRG2 hem ErbB3 hem de ErbB4'e bağlanabilirken diğer iki üyesi olan NRG3 ve NRG4 sadece ErbB4'e bağlanabilmektedir (33). ErbB2/HER2 ile etkileşime girdiği bilinen bir ligand henüz tanımlanamamıştır. Bazı ligandlarla düşük affinite ile etkileşime girebildiği bildirilen çalışmalar da mevcuttur (13).

Ligand, alt birim-I ve -III aynı anda bağlanarak (34) hücre dışı birimde reseptör aktivasyonu için önemli konformasyonel değişiklikleri indüklemektedir. Daha önce gömülü halde bulunan alt birim-II ve IV'ün gevşemesiyle dimerizasyon kolunun açığa çıkmaktadır (35). Dimerizasyon kolunun aracılığıyla reseptörler dimerize olmakta (Şekil 2.) ve kinaz aktivasyonunu gerçekleştirmek üzere hücre içi birimde konformasyonel değişiklikleri indüklemektedir (36, 37).

Rseptör dimerlerinin kinaz alt birimlerindeki anahtar tirozin birimlerinin *trans*-fosforilasyonu indüklemektedir (30, 38, 39). Fosforilasyonla birlikte *cis-otoinhibisyon* konformasyonu bozulmakta ve reseptörler kinaz aktivitesi kazanmaktadır (20, 21, 40). *Trans-fosforilasyon*, dimer çiftlerinden birinin (aktivatör kinaz) karboksil (C)-lobunun diğer kinazın (alıcı kinaz) amino (N)-lobuna temas ederek fosforilmesi ve aktive etmesi olayına verilen addır (37). C-terminal kuyruk kinaz alt biriminin fonksiyonunun düzenlenmesiyle ilişkilidir (40- 44).



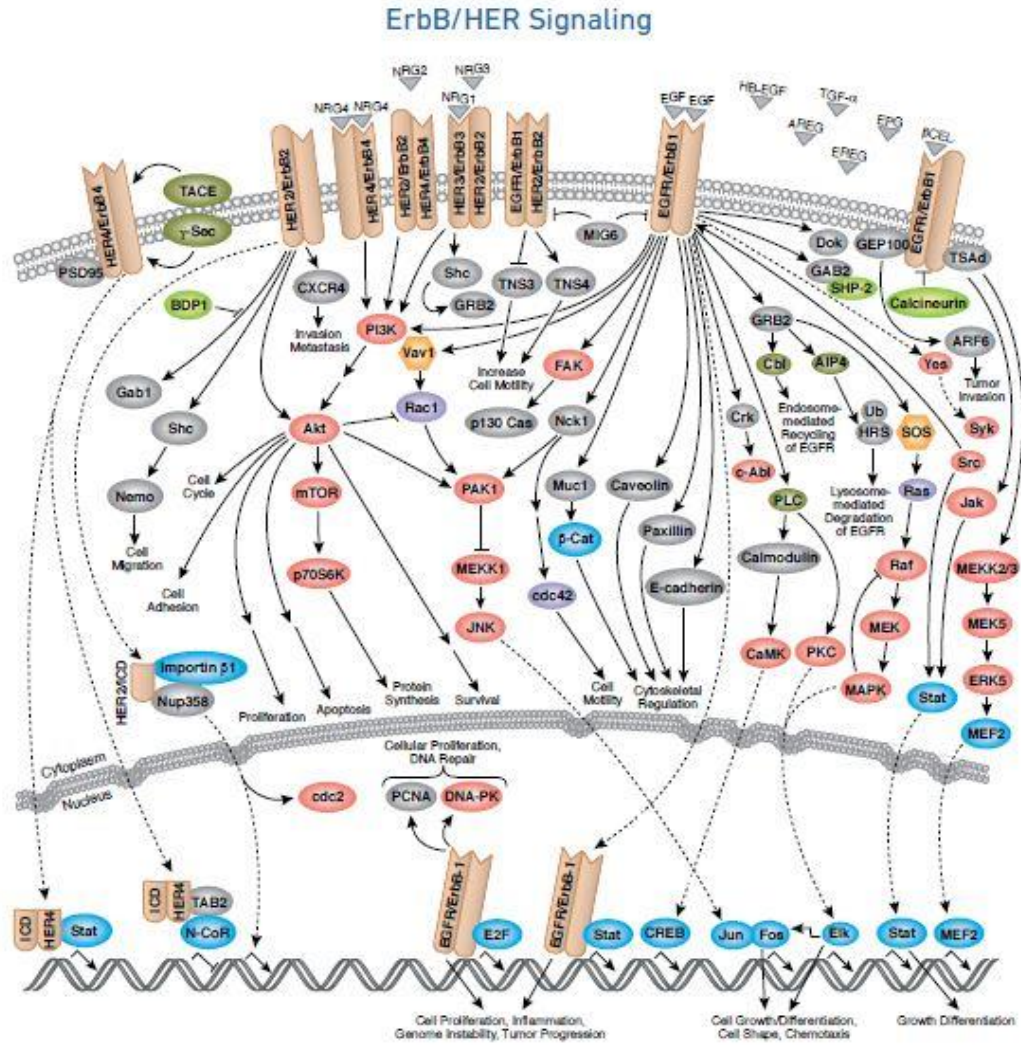
Şekil 2. EGF reseptörlerinin aktivasyonu (8)

ErbB2/HER2 diğer aile üyelerinden farklı olarak gevşek yapılı ECD'ye sahiptir ve ligand-bağımsız dimerize olabilmektedir (45). Bu durum ErbB2/HER2'yu diğer reseptörler için çekici bir dimerizasyon partneri yapmaktadır. ErbB2/HER2 içeren heterodimerler diğer dimerlere kıyasla daha kuvvetli sinyaller üretmektedirler. HER2/HER3 heterodimeri, proliferasyon yanıtını indükleyen en önemli sinyal yollarından biri olan PI3K/Akt sinyal yolağını baskın şekilde aktivasyonundan sorumludur (46, 47).

Src homoloji-2 (SH2) veya fosfotirozin bağlanma (PTB) birimleri içeren adaptör proteinler aktif ErbB reseptörlerinin sinyal yollarını aktive etmelerine

aracılık etmektedir. Mitojen-aktive eden protein kinaz (MAPK), fosfotidilinositol-3-kinaz (PI-3K) / AKT ve Janus kinaz (JAK2) / Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatör (STAT) sinyal yollarının ağırlıklı olarak ErbB reseptörleri tarafından aktive edilmektedirler (40, 48, 49). Sonuç olarak; ErbB reseptörleri hücre çoğalmasıyla ilgili karmaşık bilgileri, hücre dışı ortamdaki hücre içine ileten ve birçok hücresel süreci düzenlemede rol oynayan transkripsiyon yollarını aktive eden bir düğüm görevi görmektedirler (Şekil 3).

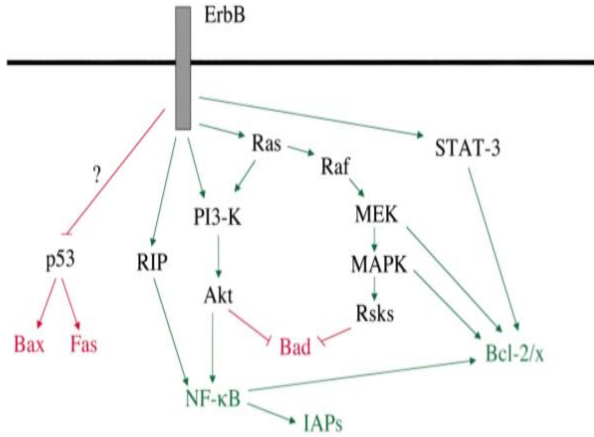
ErbB reseptörlerinin aktivasyonu kadar deaktivasyonlarının regülasyonu da önemlidir. Endozomal internalizasyon mekanizması reseptör aktivasyonlarının sonlandırılmasında rol oynayan temel mekanizmadır (50). Internalizasyon mekanizması ile reseptörler mitokondri, golgi, ER ve nükleusa taşınmaktadır (51, 52). Reseptörün endositik alımı takiben lizozom aracılı degradasyonu, veziküler taşıma ile hücre içindeki belirli lokasyonlara taşınması veya geri dönüşüm ile inaktif monomerin membrana iletilmesi şeklinde ilerleyen bir süreçtir (53-57). Aile üyelerinin internalizasyon dereceleri ve hücre içerisindeki akış farklılık gösterebilmektedir. Aktive olmuş bir reseptörün inaktivasyonu normal şartlar altında bir kaç saat sürmektedir. Internalizasyon aksaması veya engellenmesi sonucu aktif reseptör dimerlerinin olması gerekenden uzun süre membranda bulunmaları ve ilişkili yolları aşırı aktive etmeleri kanserleşme nedenlerindedir (58).



Şekil 3. EGF reseptörleri ve düzenledikleri hücre içi mekanizmalar (<https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-tyrosine-kinase/erbb-her-signaling-interactive-pathway/pathways-erbb>)

2.1.3. Reseptörlerin onkojenik aktivasyon mekanizmaları

ErbB reseptörlerinin aktivasyonlarındaki anormak artış kanserleşme süreci ile yakından ilişkilidir. Meme, ovaryum, beyin, prostat, akciğer ile baş ve boyun kanserlerinin gelişiminde rol oynamaktadır (59, 60). Aktivasyondaki artış; mutasyon, artan reseptör / ligand / adaptör protein ifadenmelerinde artış ve sinyal yolağı elemanlarının hücresel konumlarının değişmesi vb. sonucu gerçekleşebilmektedir. Ras, PI3K, Akt, ve Bcl-x/-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin aktivasyonunu uyararak da hücre ölümü baskılayabilmektedirler (Şekil 4). Özetle, anormal ErbB reseptör aktivasyonları hücrenin sağ kalım yanıtında artışa ve hücre ölümü yanıtında azalmaya neden olarak kanserleşmeyi desteklemektedir. Dahası kemoterapötik ajanların etkilerine karşı direnç gelişiminde de rol oynamaktadır (61-65).



Şekil 3. ErbB reseptörlerinin hücre ölüm ve sağ kalım ile ilişkili molekülleri ile etkileşimi (66)

ErbB reseptörlerinin aşırı ifadenmeleri ve/veya amplifikasyonları kanserleşmede rol oynayan temel mekanizmalardandır. Meme kanserlerinin %25-30'unda (67) ve ovaryum, mide ve agresif uterin kanserlerinde ErbB2/ HER2 geni amplifikasyonu mevcuttur (68). ErbB2/ HER gen amplifikasyonu ve/veya aşırı ifadenmesi, proliferasyon yanıtının artmasına ve apoptozun inhibisyonuna aracılık ederek kanser gelişiminde ve terapötiklere karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır

(69). ErbB2/ HER2 geni amplikasyonu ve kanserle ilişkisi, “Kanser ve ErbB2/HER2 aşırı ifadenmesi” başlığı altında detaylıca verilmiştir.

EGF reseptör aşırı ifadenmesi ve mutasyonları da güçlü kanserojenik etki yaratmaktadır ve akciğer, glioblastoma, ovaryum, meme kanserlerinin oluşumu ve gelişiminde rol oynamaktadır. (70, 71).

Aktive edici mutasyonlar, EGF reseptörlerinin moleküler konformasyonunda ve yük dağılımında değişikliklere neden olmaktadır. Reseptörlerin substrat bağlama eğilimlerini veya enzimatik aktivitelerinin arttırarak sinyal iletim becerilerini güçlendirmektedir (4, 15, 16, 72). EGFR ve HER-2 reseptörlerinin ECD, TMD ve TKD’sında meydana gelen ve kinaz aktivitelerini etkileyen çeşitli tipte mutasyonlar tanımlanmıştır. Kanserleşme ve kemoterapötiklere karşı direnç kazanımında rol oynamaktadırlar. Örneğin; EGF reseptörün ECD’sinde meydana gelen ve glioblastomalarda görülen bir grup mutasyon, reseptörün inaktif konfirmasyonunu destabilize ederek ligand-bağımsız reseptör aktivasyonuna neden olurken (Ferguson, 2008); ICD’indeki katalitik cepte görülen in-frame delesyon ve L834 nokta mutasyonu doğrudan reseptörün kinaz aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Aşırı aktive olan EGFR ile Akt ve STAT5 sinyal moleküllerinin de fosforilasyonu da artmaktadır (37, 73).

ErbB reseptörlerinin aktivasyonu ve miktarındaki değişimlere ek olarak endositozları sonrası konumlandıkları hücre kompartmalarının değişimin de kanserleşmede etkili olduğu bildirilmiştir. Meme ve ovarian tümörlerine EGFR ve HER2’nun nükleusa transportunda artış gözlenmiştir. Nükleusa konumlanan reseptörlerin, transkripsiyon faktörü (STAT3 gibi) proteinleri ile etkileşime girerek bazı genlerin (iNOS ve COX-2 gibi) ifadenmelerini düzenlediği ve kötü prognozda rol oynadıkları bilinmektedir (74-84). HER2’nin hücre içerisinde mitokondri lokalizasyonundaki artışın sitokrom c oksidaz alt birim 2 aracılı apoptoz düzenlenmesinde rol oynadığı keşfedilmiştir (51).

Ligand ve adaptör protein seviyelerinde meydana gelen değişiklikler de karsinogeneze ilişkilendirilmektedir. Özellikle TGF- α , amfiregülin ve HB-EGF ligandlarının konsantrasyonundaki artışın Erb reseptörleri üzerinde aktive edici bir baskı yarattığı ve tümör gelişimini daha agresif hale getirdiği, dahası terapötiklere

karşı direnç gelişimiyle pozitif korelasyon gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (85-87). Brk adaptör proteininin sitoplazmik konsantrasyonundaki artış benzer şekilde kanserojenik bulunmuştur (88). ErbB sinyal efektör proteinlerinin aynı zamanda IGF sinyal yolağı gibi farklı yolakların aktivasyonu üzerindeki bulunmaktadır (89); bu durum sinyal kontrolünde bağımsız iki yolak arasındaki etkileşimin (cross-talk) meydana geldiğine işaret etmektedir.

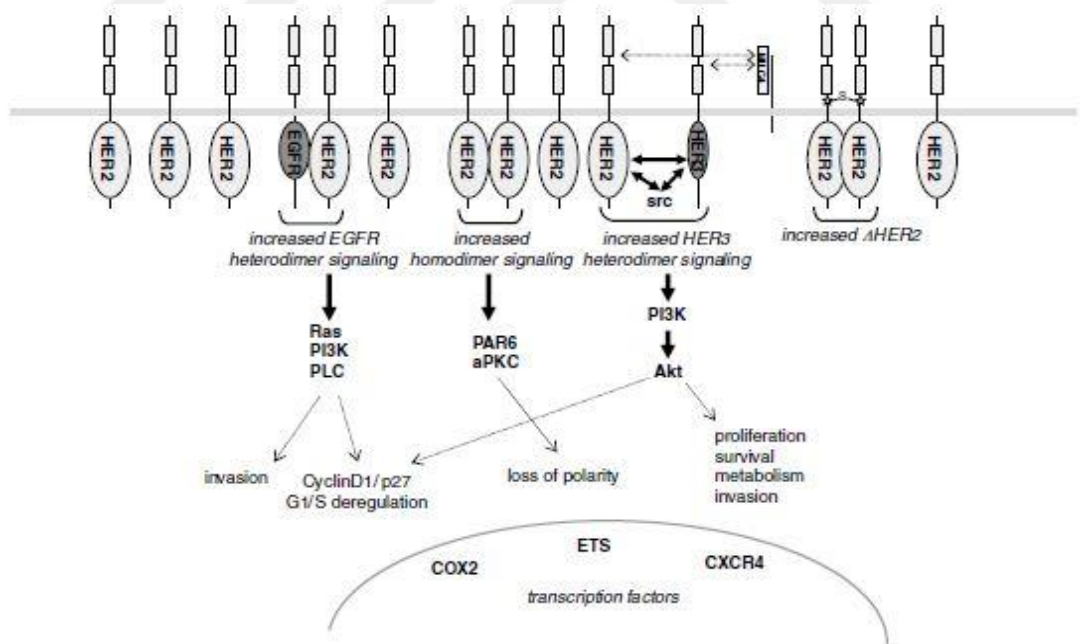
2.1.3.1. Kanser ve ErbB2/HER2 aşırı ifadenmesi

ErbB2/HER2'nin ligand ilgisi düşük, hızla dimerleşmeye eğilimli ECD birimine ve alt yolaklar üzerindeki güçlü uyarıcı etkiye sahiptir. Aktivasyonun aşırı artması ile sağlıklı bir hücrenin tümörojenik fenotip kazanabilmektedir (90, 91). HER2 reseptörünün ifadenmesindeki aşırı artış, amplifikasyonu ve aktifleştirici mutasyonları sonucu reseptör faaliyetinde artış meydana gelmektedir. (28, 45, 92, 93). Bununla birlikte önemli proliferatif sinyal yolaklarının aşırı aktivasyonu ve apoptotik yolakların inhibisyonu uyarılmaktadır (94). Çoklu sinyalizasyon mekanizmasında eş zamanlı meydana gelen anomaliler hücrenin kanserleşme sürecini desteklemektedir (Şekil 5).

HER2 reseptör aktivitesinin artışına, görülme sıklığı oldukça düşük olan aktifleştirici HER2 mutasyonlardan ziyade HER2 geni amplifikasyonu ve/veya aşırı ifadenmesi neden olmaktadır. HER2 pozitif (HER2+) olarak adlandırılan kanser hücrelerinde HER2 geni kopya sayısında 25 ila 50 kat, hücre yüzeyindeki HER2 reseptör sayısında ise 40-100 kat artış görülebilmekte ve hücrenin sahip olduğu reseptör sayısı 2 milyondan fazla rakamlara ulaşabilmektedir (95).

Meme kanseri hastalarının yaklaşık %25-30'una HER2+ tanısı konulmaktadır. HER2 aşırı ifadenmesi meme, gastrik, özofagal ve endometriyal kanserlerinde erken veya ileri evrede gerçekleşebilmektedir (67, 96-98). HER2+ tümörlerde; agresif yayılım, metastaz ve invazyon eğilimine ek olarak tedaviye karşı direnç gelişimine sebep olmaktadır (99-102). Öte yandan HER2+ tümörlerde HER reseptörünün hedeflenmesiyle tedavide başarı oranı artırılabilir (95, 103).

HER2 aşırı ifadenmesi çok sayıda ilişkili mekanizma üzerinden karsinojenik transformasyona neden olmaktadır. Bu mekanizmalardan ilki HER ailesi dimerlerinin kompozisyonunda neden olduğu değişimdir. EGFR ve HER3 ile oluşturulan HER2 heterodimerlerinin ve HER2 homodimerlerinin sayısı, HER2 ifadenmesindeki artışına paralel olarak artmaktadır (104, 105). EGFR ve HER, MAPK, JAK/STAT, PI3K /Akt gibi önemli proliferasyon ve sağ kalım yollarının aktivasyonundan sorumludurlar. Bu sinyal yollarının HER2 içeren dimerler aracılığıyla etkili ve kısmen daha uzun süreli aktivasyonu söz konusudur. Aktif EGFR homo- ve heterodimerlerinin endositik bir mekanizma ile hızla membrana geri dönüşümü yapılarak sinyalizasyon süresi ve etkinliğinin arttırılabildiği bilinmektedir. HER2/EGFR dimerlerinin endositik geri dönüşümü karsinogenezle ilişkilendirilmektedir. Endositik mekanizma ile proliferasyon yolları üzerindeki HER2 sinyal etkinliği artmaktadır (106, 107). HER2 ile birlikte EGFR'ın aktivasyonundaki artış, MAPK and JAK/STAT yollarının güçlü şekilde aktivasyonuna dolayısıyla karsinogenezin uyarılmasına sebep olmaktadır (104-110).



Şekil 5. ErbB2/HER2 aşırı ifadenmesi ile indüklenen hücre içi yanıtlar (113)

Benzer şekilde HER2 aşırı ifadenmesindeki artışla birlikte HER2/HER3 heterodimerlerinin sayısında da artmaktadır. HER3 reseptörü en önemli proliferatif

sinyal yolaklarından olan PI3K ve Akt yolağının en güçlü aktivatörüdür (111, 112). Aktif HER2/HER3 dimerlerindeki artışa bağlı olarak bu yolağın anormal düzeyde aktivasyonuna karsinogenezle ilişkilendirilen bir diğer mekanizmadır (111, 112, 114-116).

HER2+ tümörlerde, transkripsiyon sonrası düzenlenme ve/veya alternatif kırılma sonucu JMD'de 16 amino asitlik bir bölgesi eksik HER2 varyantı, ΔHER2, ifadelenebilmektedir. ΔHER2, ligand-bağımsız sinyal iletim aktivitesi olan onkogen varyant olarak tanımlanmaktadır (117, 118). Kırılma ile sistein birimleri çıkarılmakta ve proteinin disülfid bağ yapısı bozulmaktadır. Bu sayede daha yüksek dimerizasyon ve fosforilasyon eğilimi kazanan ΔHER2, HER2'ya kıyasla çok daha yüksek karsinojenik aktiviteye sahip olmaktadır (117-119). HER2 ve ΔHER2 ifadelenmelerinin birlikte artışı karsinogenez sürecini hızlandırmaktadır.

Src kinazlar, HER2'nin önemli ikincil sinyal iletim molekülleridir. Src kinazlar, fosforilasyonlarındaki artışa paralel olarak, transforme edici ve karsinojenik faaliyet göstermektedirler (120). HER2 aşırı ifadelenmesi src kinazlarının fosforilasyonunu artırmaktadır (121, 122). Artan src fosforilasyonu tümör hücrelerinde fokal adezyon, integrin ve aktin sitoskeleton sinyalizasyonlarını bozarak hücre polarizasyonunun kaybına, hücre-hücre bağlantılarının bozulmasına, tutunmadan bağımsız hücre büyümesine, migrasyona, invazyona ve metastaza neden olmaktadır (123, 124). Src kinazlardan bağımsız olarak, HER2 aşırı aktivasyonu ERBIN (ErbB2 interacting protein) proteinlerinin fonksiyonlarını baskılayarak da hücre polaritesini ve adezyonunu bozabilmektedir (125). Normal koşullarda epitelyal hücrelerin dış yüzünde bulunan ERBIN proteinleri, ligand salgılayan stroma hücreleri ile iletişim kurmaya aracılık etmektedir (126-128). HER2 aşırı ifadelenmesi bu bağlamda hücre adezyonunu engelleyerek karsinogenezini desteklemektedir.

Artan HER2 ifadelenmesi, hücre döngüsü kontrol noktalarındaki, özellikle G1/S noktasındaki, işleyişi bozarak proliferatif yanıtı arttırmaktadır. HER2 aşırı ifadelenmesi doğrudan siklin-D1, -E ve cdk6'nın regülasyonunda artışa ve p27'nin bozunmasına neden olarak veya özellikle HER3 ile oluşturduğu dimerler aracılığıyla Akt yolağı üzerinden p27 inhibisyonunu uyararak epitelyal hücrelerde G1/S kontrol noktasından kaçışı mümkün kılmaktadır (129-132). HER2+ hücrelerde HER2

homodimerlerinin de sayısı yükseltmektedir. Birim alandaki HER2 miktarının artmasıyla reseptörler iyice birbirlerine yakınlaşmakta ve etkileşime girerek homodimerler oluşturmaktadırlar. Aktif HER2 homodimerleri ile hücre sağ kalımını desteklemekte ve böylece tümör hücreleri agresif hale gelmektedir.

HER2 ifadelenmesindeki artışın anormal aktivasyonlara neden olduğu sinyal iletim yollarının ve bu yollarda rol oynayan kilit moleküllerin iyi anlaşılması, karsinogenezle ilişkisini anlamak açısından önem arz etmektedir. Kilit moleküllerden bir veya bir kaçının hedefli inhibisyonu mümkün olabilmektedir. Hedefli kanser tedavilerindeki başarı şansı böylece artmaktadır.

2.2.ErbB Hedefli Tedavi

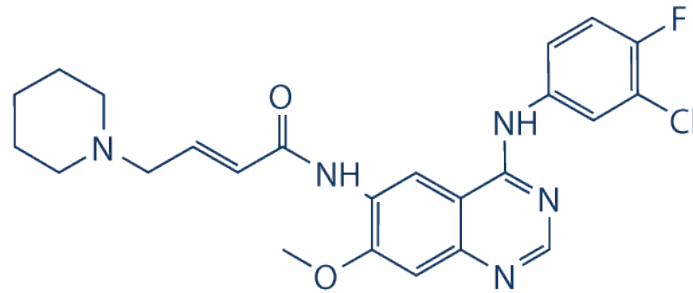
ErbB ailesi reseptörlerinin sayılarının artması ve/veya aktive edici mutasyonları taşımaları sonucu aktivasyonlarında görülen anormal artış, hücrenin temel sağ kalım yollarından olan Ras/Raf/Mek/Erk ile PI3K/Akt yollarının aşırı aktivasyonuna öncülük etmektedir. Bu yollardaki anormal aktivasyonlar başta akciğer, meme, ovaryum kanseri olmak üzere birçok kanser türünde tümör oluşumu, gelişimi ve metastaz sürecinin leyhine; profilerasyon, anjiyogenez, adezyon, invazyon ve apoptotik yanıtlarda değişikliklere neden olmaktadır (133-136). İnsan kanserlerinin oluşumunda ve gelişiminde oynadıkları bu kritik roller nedeniyle tedavi hedefi haline gelmişlerdir (137).

Tarihte ilk defa Greene laboratuvarınca, hücrenel transformasyon süresinde rol oynayan bir proteinin hedeflenmesi sayesinde aşağı akım sinyal yollarının bloklanması üzerinden malignan fenotipin baskılanabileceğini gösterilmiştir (138, 139). Bu çalışma neticesinde monoklonal antikorlar (MAB) ve/veya tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) geliştirilerek, ailenin bir ve ya daha fazla sayıda üyesinin hedefli olarak inhibe edilebildiği tedaviler geliştirilmiştir. Trastuzumab (Herceptin) ve Pertuzumab (Perjeta), klinikte doğrudan anti-HER2 ajanı olarak sık kullanılan monoklonal antikorlardır. İkisi de HER2 dimerizasyonunu önleyerek aktivitesini bloklamaktadır. Sonraki yıllarda küçük molekül yapıları TKI geliştirilmiştir. Birinci nesil tersinir ‘selektif’ özellikli TKI’lerden erlotinib ve gefinitinib EGFR’ı inhibe edenlerken (140) lapatinib gibi bazıları da hem EGFR hem de HER2’yi inhibe edebilmektedir (141). Tek reseptörün hedeflendiği tedavilerde

tümör hücrelerinde diğer reseptör dimerlerinin sayı ve aktivasyonunun arttığı ve gelişen bu direnç mekanizmasının tedavideki olumlu yanıt oranını düşürdüğü gözlemlenmiştir (142-144). Pan-HER inhibitörleri olarak adlandırılan ikinci nesil TKI'ler; afatinib, dacomitinib ve neratinib ise tersinir olmayan etkileşimlerle tüm ErbB ailesi üyelerinin eş zamanlı inhibisyonunu mümkün kılacak şekilde geliştirilmişlerdir (145). Adı geçmekte olan tüm terapötikler FDA onayı almış olup günümüzde klinikte kullanılmaktadırlar.

2.2.1. Dacomitinib

Dacomitinib (Şekil 6)(PF-00299804), ikinci nesil küçük molekül yapıları panHER tirozin kinaz inhibitörlerinden biridir. Birinci nesil inhibitörlerden farklı olarak; ErbB1, ErbB2 ve ErbB4'ün tirozin kinaz alt birimlerine kovalent olarak bağlanmakta ve reseptörlerin fonksiyonlarını kalıcı olarak inhibe etmektedir. Reseptörlerin otofosforilasyonunu engelleyerek aşağı akım sinyalizasyonunu bloklamakta ve güçlü antitümör etki göstermektedir. Hücre döngüsünü bozarak proliferasyonu azaltmakta ve apoptoza neden olmaktadır (Zhu ve ark., 2015; Gonzales ve ark., 2008). Dacomitinib, reseptörlerin TKD'sinde yer alan ATP bağlanma cebi ile spesifik sistein birimlerinin aracılığıyla etkileşime girmektedir. ErbB reseptörleri arasında korunmuş bu sistein birimleri sayesinde reseptörler dacomitinib hedefi olma özelliğini paylaşabilmektedirler (146-148).

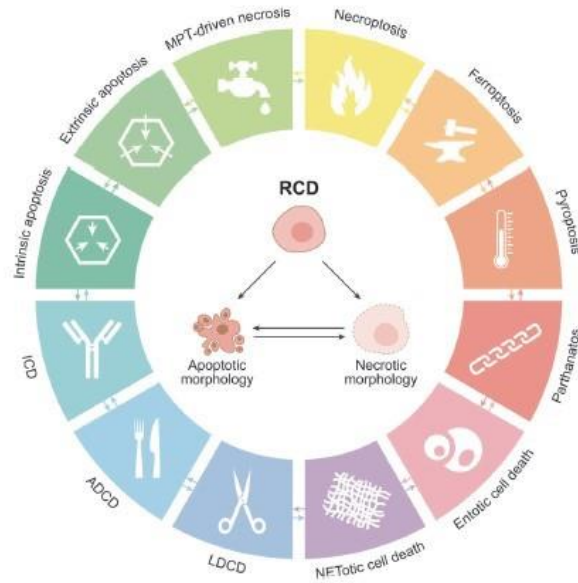


Şekil 6. Dacomitinib'in kimyasal yapısı (<https://www.selleckchem.com/products/pf299804.html>)

Dacomitinib'in anti-proliferatif etkinliğinin, ErbB reseptör amplifikasyonu ve aşırı aktivasyonu olan meme, akciğer ve uterus kanseri hücre hatları ile yapılan klinik öncesi çalışmalarda birinci nesil TKI'lere kıyasla yüksek olduğu bildirilmiştir (146, 149-156). Benzer şekilde gefitinib/erlotinib dirençli akciğer kanseri hastalarında dacomitinib tedavisine yanıt alınabildiği gösterilmiştir (157-160) Aktive edici EGFR mutasyonu taşıyan metastatik NSCLC (non-small cell lung cancer) hastalarında başlangıç tedavisi için 27 Eylül 2018 tarihinde FDA onayı almıştır (155, 161).

2.3.Apoptoz

Apoptoz; çok hücreli organizmalarda doku homeostazisinin sağlanmasına ek olarak geri döndürülemez şekilde hasar görmüş ve/veya potansiyel olarak zararlı hücrelerin hedefli olarak ortadan kaldırıldığı bir dizi genetik kodla ilişkili, programlı hücre ölümü mekanizmasıdır (162-165). Hücre Ölümü Adlandırma Komitesi (Nomenclature Committee on Cell Death -NCDD)'e göre programlı hücre ölümü mekanizmalarını; patofizyolojik uygunluğunun yanı sıra hücre ölümünün başlatılmasında, yürütülmesinde ve yayılmasında rol oynayan sinyal iletim mekanizmalarının referans alınarak apoptozla birlikte on farklı gruba ayırmıştır (Şekil 7) (166). Apoptoz, Alman bilimci Carl Vogt tarafından 1842 yılında tanımlanmıştır ve ismi sonbaharda ağaçların yapraklarını döküşü, yaprakların düşmesi anlamına gelen Yunanca ““απόπτωσης” kelimesinden türetilmiştir. Apoptoz terimi ilk defa 1972



Şekil 7. Programlı hücre ölüm mekanizmaları (166)

yılında John Foxton Ross Kerr ve grubu tarafından kullanılmıştır. Apoptoz çalışmaları Sydney Brenner, Horvitz ve John E. Suster'a 2002 yılında tıp alanında Nobel Ödülü kazandırmıştır. Sonraki yıllarda insanda homologları bulunan apoptozla ilişkili sinyal molekülleri temelde *C.Elegance* ile yapılan çalışmalarda keşfedilmişlerdir.

Hücresel çevresel veya içsel normal durumuyla çelişen uygunsuz sinyallerin varlığı neticesinde hücre ciddi bir stres yükünün altına girmektedir. Söz konusu olaylarda stresle başa çıkmak ve hücre homeostaziyi restore etmek üstesinden gelinemeyecek kadar çok enerji gerektirdiğinde hücre apoptoz yolunu seçmektedir (167). Hücre döngüsü durdurulmakta ve süreç hücrenin eliminasyonu ile sonuçlanmaktadır. Apoptotik mekanizmaların disfonksiyonu kanser ve otoimmün hastalıklar gibi birçok patolojik duruma neden olmaktadır. Nörodejeneratif bozukluklar, AIDS ve iskemik hastalıklar artmış, kanser ise azalmış apoptotik aktivite ile ilişkilendirilmektedir (168).

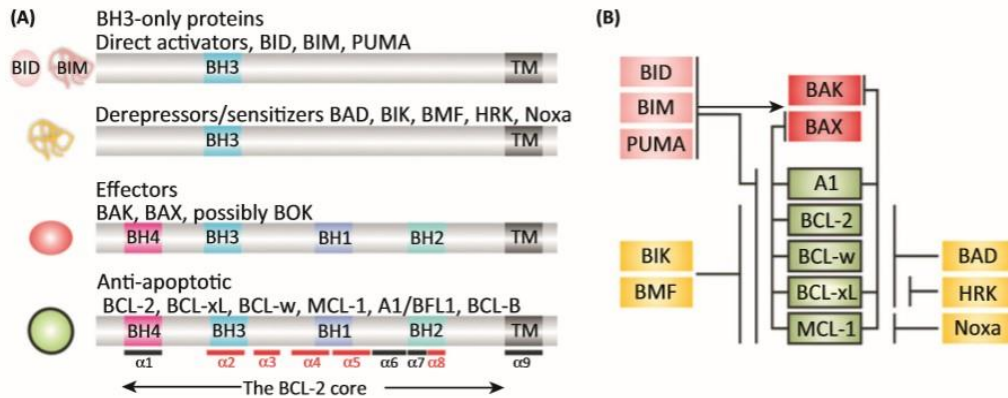
Apoptoz süreci, belli başlı birkaç morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile kendini göstermektedir. Hücrenin büzülmesi ve komşu hücrelerle temasın azalması, hücre yüzeyinde tomurcukların oluşumu, kromatin kondensasyonu (pyknosis) ve nükleer fragmentasyon (karyorelaksis) apoptotik bir hücrede gözlemlenen temel morfolojik değişikliklerdir. Bu morfolojik değişiklikler DNA'yı oligonükleozomal fragmanlara bölen ve sitoplazmanın ve hücre organellerinin bütünlüğünü ve şeklini belirleyen spesifik protein substratları üzerinde etki gösteren proteolitik enzimlerin aktivasyonunun sonucu gerçekleşmektedir (169). Apoptoz süreci makrofajlar veya fagositik aktiviteye sahip diğer hücreler tarafından ortadan kaldırılan (eferositoz) ve lizozomlar içinde bozulan apoptotik cisimciklerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır (170-177). Normal fizyolojik şartlarda plazma membranının sitosolik yüzeyinde konumlanan fosfolipid fosfatidilserin (PS) molekülleri, hücre yüzeyinde açığa çıkarak apoptotik cisimciklerin apoptozun henüz başlangıç evresinde tanınmalarını mümkün kılmaktadır. Apoptotik hücreler, sürecin tamamlanmasına kadar plazma membran bütünlüğünü ve metabolik aktivitelerini bir dereceye kadar korumaktadırlar. Bu durum ek olarak fagositik hücrelerin ve komşu dokuların salgıladığı sitokinler (IL-10 ve TGF- β gibi) *in vivo*'da apoptotik hücrelerin, en azından ciddi düzeyde, enflamatuar tepkiye neden olmaksızın ortadan kaldırılmalarını sağlamaktadır (178).

Apoptoz; büyüme/sağ kalım faktörlerinin eksikliği, hipoksi, UV ışınları ve hücre-matriks interaksyonunda zayıflama gibi hücre dışı uyaranların dışında, eksojenik toksinler veya hücre döngüsü kontrol noktası bozukluklarından kaynaklanabilen DNA hasarı, telomer malfonksiyonu, onkojenik mutasyonlardan kaynaklanan uygunsuz proliferatif sinyaller gibi içsel uyaranlar sebebiyle tetiklenebilmektedir. Hücre dışı uyaranların sebep olduğu apoptoza ekstrinsik/dış kaynaklı apoptoz denilmektedir. Dış kaynaklı apoptoz; hücre yüzeyindeki Fas/CD95, TNFR1, DR3, DR4 ve DR5 gibi ölüm reseptörlerine, sitokin süper ailesi üyelerinden tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ve Fas ligand (FasL) gibi aktivatörlerin bağlanmasıyla tetiklenmektedir. Hücre içi uyaranların tetiklediği apoptoza ise intrinsik /iç kaynaklı/ mitokondriyal apoptoz denilmektedir. İntrinsik apoptoz süreci BCL-2 protein ailesi tarafından düzenlenmektedir. (Şekil 9) (179). Apoptozun indüklenmesi ile hücre içerisinde çok sayıda apoptozla ilişkili faktörün hızla ifadenmesi ve aktivasyonu gerçekleşmektedir. Çevresel şartların hücre lehine olması durumunda ise yine yüzey reseptörleri aracılığıyla Ras kinaz, PI3 kinaz ve Akt gibi hücre proliferasyonu ile ilişkili yollar uyarılmaktadır. Proliferatif yolların aktivasyonu, BAD ve kaspaz-9 gibi pro-apoptotik faktörleri inhibe ederek apoptozu baskılayabilmektedir (180, 181).

Apoptotik sürecin işleyişinde rol oynayan; sistein proteaz ailesi kaspazları, BCL-2 protein ailesi, p53 proteini, endonükleazlar ve ısı şoku proteinleri gibi çoğunlukla protein yapılı birçok faktör mevcuttur. Söz konusu kaspazlar, aspartil özgü sistein proteazları ailesi üyeleridir. İngilizcedeki karşılığı “Caspase” olan terim, “cysteine-dependent aspartate-specific proteases/sisteine-bağımlı aspartat özgül proteazlar”ın kısaltmasıdır. Hücrede aktif olmayan öncü-formlar (pro-caspaslar) olarak ifadelenen bu enzimler apoptozun uyarılmasını takiben aktif forma dönüştürülmektedir. Bir N-terminal “prodomain”,bir büyük alt birim ve bir de küçük alt birim içermektedirler. Prodomain genellikle aktivasyon sürecinde çıkarılmaktadır. Kaspaz-2, -3, -6, -7, -8, -9 ve -10 apoptoz sırasında aktive olanlar aile üyeleridir. Başlatıcı kaspaz olarak adlandırılan kaspaz-8, -9 ve -10; cellat/efektör kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz-3 ve -7'nin aktivasyonuna aracılık etmektedirler. Dış kaynaklı apoptoz yolağında ilk olarak kaspaz-8 ve -10, intrinsik apoptoz yolağında ise kaspaz-9 aktive edilmektedir. Efektör kaspazların peş peşe aktivasyonu ile apoptotik sürecin

devamlılığını sağlamaktadır. Apoptotik süreç, kaspaz bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki ana mekanizma üzerinden yürütülebilmektedir (182).

Kaspazlara ek olarak, yaklaşık 15 üyeden oluşan BCL-2 (B-hücresi lenfoma / lösemi-2 geni) protein ailesi de apoptozu düzenlenmesinden sorumludur. Bu protein ailesini pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri bulunmaktadır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler, aralarındaki etkileşimlerinin aracılık ettiği, sıkı düzenlenmiş bir kontrol ve denge sistemi aracılığıyla apoptoz sürecini kontrol etmektedirler (183-185). Hücrenin kaderinin belirlenmesinde rol oynayan BCL2 proteinleri apoptoz için kritik adım olan mitokondriyal dış membran geçirgenliğinin (MOMP) düzenlenmesinden sorumludurlar (186, 187). BCL-2 proteinleri konformasyonlarının ve dinamiklerinin allosterik kontrolünü kapsayan protein-protein etkileşimleri vasıtasıyla işlev görmektedirler.



Şekil 8. BCL-2 protein ailesi üyeleri ve aralarındaki etkileşimler (188)

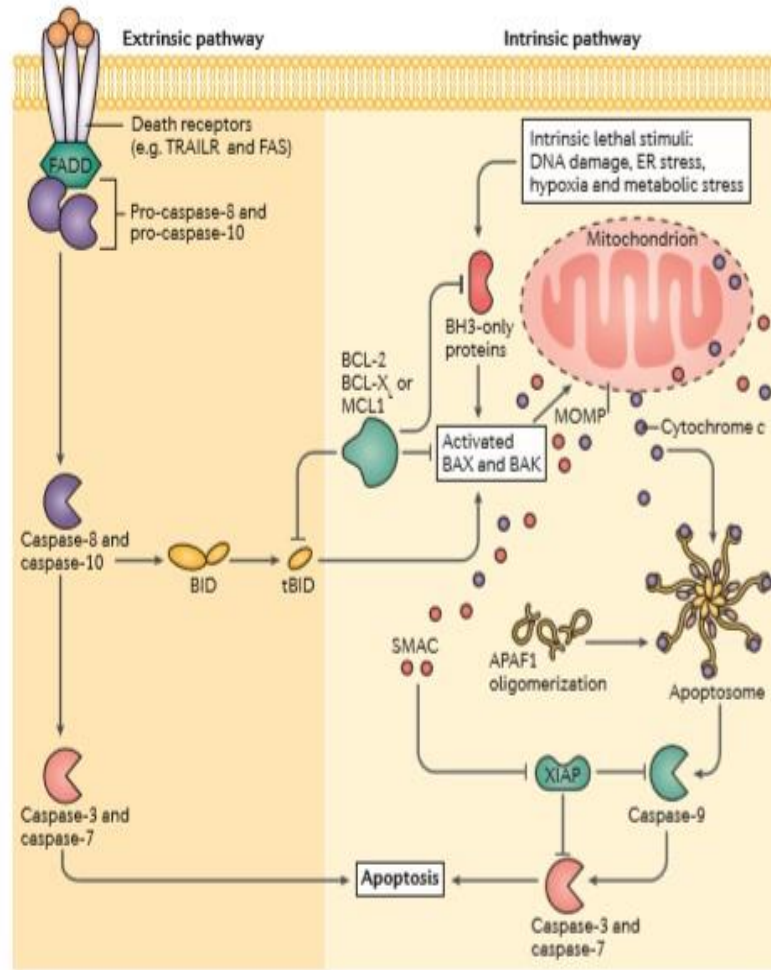
Ailenin tüm üyeleri, BCL-2 homoloji birimi (BH1, BH2, BH3 ve BH4) olarak adlandırılan bazı dizi motiflerinden (Şekil 8) en az birini taşımasıyla tanımlanabilmektedir (183, 184, 189). Pro-apoptotik proteinler, temel işlevlerinin merkezi olan BH3 birimine mutlak olarak sahiptirler (190). Apoptotik sürecin pozitif yönlü düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar ve fonksiyonlarına göre üç alt sınıfa ayrılmaktadır; efektörler, doğrudan aktivatörler ve derepresörler / hassaslaştırıcılar (191-197). Sadece BH3 birimini içeren doğrudan aktivatörler ve derepresörler / hassaslaştırıcılar alt sınıfları ise özel olarak “BH3-only proteinleri” olarak

adlandırılmaktadırlar (190). Anti-apoptotik aile üyeleri ise isimlerinden anlaşıldığı üzere apoptotik sürecin negatif yönlü düzenlenmesi ile ilişkilidir; fonksiyonları gereği apoptozun başlamasını engellemektedirler. Anti-apoptotik proteinler ve efektörler ise BH3-only proteinlerinde farklı olarak dört BCL-2 homoloji bölgesinin tamamını içermektedirler (183, 198-203).

Tablo 2. Apoptoz faktörlerinin sembolleri, dâhil oldukları sınıflar ve sembollerinin İngilizce'deki karşılıkları

Sembol	Alt sınıfı	Açıklama
BCL-2	Anti-apoptotik	B-cell lymphoma-2
BCL-xL	Anti-apoptotik	B-cell lymphoma-extra large
BCL-w	Anti-apoptotik	BCL2 like 2; BCL2L2
MCL-1	Anti-apoptotik	Myeloid Cell Leukemia 1
BAK	Pro-apoptotik/ efektör	BCL2 antagonist/killer 1
BAX	Pro-apoptotik/ efektör	BCL2 associated X, apoptosis regulator
BOK	Pro-apoptotik/ efektör	Bcl-2-related ovarian killer protein
BID	Pro-apoptotik/ BH3-only/ doğrudan aktivatör	BH3 interacting domain death agonist
BIM	Pro-apoptotik/ BH3-only/ doğrudan aktivatör	BCL2-interacting mediator of cell death
PUMA	Pro-apoptotik/ BH3-only/ doğrudan aktivatör	p53-upregulated modulator of apoptosis
BAD	Pro-apoptotik/ BH3-only/ derepresör	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death
BIK	Pro-apoptotik/ BH3-only/ derepresör	BCL2 Interacting Killer
BMF	Pro-apoptotik/ BH3-only/ derepresör	Bcl2 Modifying Factor
HRK	Pro-apoptotik/ BH3-only/ derepresör	harakiri, BCL2 interacting protein
Noxa	Pro-apoptotik/ BH3-only/ derepresör	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1; PMAIP1
APAF1	Pro-apoptotik	Apoptotic protease activating factor 1
DIABLO: SMAC	Pro-apoptotik	Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein: Second mitochondrial activator of caspases
IAP	Anti-apoptotik/ kaspaz inhibitörü	Inhibitor of apoptosis
XIAP	Anti-apoptotik	X-linked inhibitor of apoptosis

Efektör aile üyeleri (BAK, BAX VE BOK) MOMP'ın düzenlenmesinde doğrudan rol oynarken anti-apoptotik aile üyeleri (BCL-2, BCL-xL, BCL-w ve MCL-1) bu süreci doğrudan ve/veya BH3-only proteinleri üzerinde dolaylı olarak inhibe etmektedir. Doğrudan aktivatör özellikli BH3-only proteinleri BID, BIM ve PUMA pro-apoptotik efektörler proteinleri doğrudan aktivasyonunda rol oynamaktadırlar. Derepresör veya hassaslaştırıcı özellikli BH3-only proteinleri BAD, BIK, BMF, HRK ve Noxa ise dolaylı olarak anti-apoptotik proteinleri aktive ederek, mevcut anti-apoptotik kompleksleri bozarak veya anti-apoptotik proteinlerdeki bağlanma bölgelerini bloklayarak dolaylı yoldan aktivasyonlarını engelleyerek MOMP'a engel olmaktadır. Pro-ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengenin hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceği kararının verilmesine aracılık etmektedir (183, 184, 189, 203, 204).



Şekil 9. Eksinrik ve insinrik apoptoz yolları ile apoptoz sürecinin şematik gösterimi (205)

Fizyolojik koşullarda BAX sürekli olarak mitokondriyal dış membran (OMM) ve sitozol arasında döngü yapmakta ve inaktif bir monomerik veya inaktif dimerik konformasyonda bulunmaktadır. BAK ise sürekli olarak OMM'ye yerleşik durumda bulunmaktadır (206-210). BCL-2, BCL-xL, BCL-w ve MCL-1 proteinlerinin rol oynadığı anti-apoptotik yanıtın üstesinden gelmeye yetecek kadar pro-apoptotik protein aktivasyonun gerçekleşmesi ile apoptoz süreci başlamaktadır (191, 211-214). BID, BIM, PUMA ve NOXA mitokondriyal BAX ve/veya BAK havuzu ile geçici fiziksel etkileşimlere girerek fonksiyonlarını desteklemektedirler (215-217). Günümüzde kabul gören modele göre; aktive edilmiş BAX ve BAK mitokondri zarında öncelikle homo- ve heterodimerler ardından oligomerler oluşurmaktadır (218-222). Oligomerizasyon, mitokondriyal dış membran geçirgenliğini (MOMP) değiştiren lipidik gözeneklerin kurulmasına yol açmaktadır (223-227)

MOMP ile normalde mitokondriyal intermembran boşluğunda bulunan sitokrom c, Smac/Diablo, apoptoz inhibitörü protein ailesi (IAP) gibi apoptojenik ve anti-apoptojenik faktörlerin sitosole salınımı gerçekleşmektedir (186, 228, 229). Sitokrom c, genellikle mitokondriyal solunum zincirinde elektron taşınmasında rol oynayan mitokondriyal proteindir (172, 230-232). Sitoplazmaya geçişi ile Sitokrom c, kaspaz 9 aktivasyonundan sorumlu olan apoptozom olarak bilinen upramoleküler bir kompleksin oluşumuna aracılık etmektedir. ATP'ye bağlı bir şekilde, apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (APAF1) ve pro-kaspaz 9'a bağlanmaktadır (230). Apoptozom kompleksi kaspaz-9'un otokatalitik fonksiyonuyla aktivasyonu aracılık etmektedir (231, 233-235). Aktif kaspaz 9, apoptoz sırasında hücre yıkımından sorumlu enzimler olan kaspaz-3 ve -7'nin proteolitik aktivasyonunu katalize etmektedir (236, 237). Sitosolik SMAC ise, anti-apoptojenik IAP protein ailesi üyelerini, X'e bağlı apoptoz inhibitörü; XIAP gibi, doğrudan etkileşimlerle inhibe ederek apoptoz sürecini hızlandırmaktadır (238-240) (şekil 9). MOMP, mitokondriyal transmembran potansiyelinin ($\Delta\psi_m$) hızla kaybına ve hücrenin enerji santralleri olan mitokondrilerin işlevini yitirmesi neden olmaktadır (241-244). Bunun sonucunda hücrenin bütünlüğünü korumaya devam etmesi zorlaşmakta ve hücre sağ kalımı için gerekli hücrenel mekanizmaların işleyişi aksamaktadır. Bu sebeple MOMP'daki artış apoptotik sürecin geri dönüşü olmayan basamağı olarak tanımlanmaktadır.

Karnserleşme süreci, hasarlı ve potansiyel olarak zararlı hücrelerin eliminasyonunda rol oynayan apoptozun baskılanması ile desteklenmektedir. Apoptoz sürecinin çeşitli basamaklarında meydana gelen anormal aktivasyonlar ve inhibisyonlar apoptozun baskılanmasına neden olarak hücrenin sağ kalım süresini uzatmakta ve üremeye devam etmesine imkân vermektedir. Örneğin bir anti-apoptotik protein BCL-2 ve BCL-xL'nin ifadenmesindeki ve/veya aktivasyonundaki artış, pro-apoptotik protein BAX'ın ve tümör baskılayıcı gen olan p53'ün aktivasyonundaki azalış hücresel düzeyde apoptozun bloklanmasına neden olmaktadır (184, 245-255). Hücre ölüm mekanizmalarından yalnızca biri olan ve kendi içinde alt tiplere ayrılan apoptoz mekanizmasının iyi anlaşılması karsinogenez sürecini anlayabilmek açısından önemlidir. Apoptozla ilişkili hücresel faktörlerin yapı ve fonksiyonlarının bilinmesi kanser tedavisinde ilaçlarla hedeflenmelerine imkân sağlayabilmektedir.

2.4. AVEN

AVEN, Chau ve arkadaşları tarafından 2000'li yılların başlarında keşfi yapılan ve apoptoz inhibitörü olarak tanımlanan, enzimatik aktivitesi bulunmayan bir yapısal proteindir. Bu bilgiye ek olarak, biyoinformatik analizler neticesinde BH3-birimi içeren proteinler sınıfına dahil edilmektedir (256, 257). Roma'daki Aventine kalesinden ilham alınarak adlandırılmıştır. Diğer memeli türlerinde de korunmuş olan AVEN geninin insanda; başta kemik iliği ve pankreas olmak üzere testis, ovaryum, prostat, karaciğer, timüs, böbrek gibi çok sayıda dokuda yüksek düzeyde ifadenmektedir. Genomda 15'inci kromozomun q14 kolunda konumlanan gen, 362 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 38 kDa ağırlığında olan AVEN proteinini kodlamaktadır. Hücre içerisinde endomembran sistemle ve Bcl-xL ile kolokalize biçimde ağırlıklı olarak sitoplazmada ve nukleusta bulunmaktadır (Gene Cards, GC15M033866; 258). Antiapoptotik fonksiyonunu yerine getirebilmesi için N-terminalinin (L144/196 konumundan), bir sitosolik proteaz olan ve AKT sinyalizasyonu ile aktivitesi düzenlenen Katepsin-D tarafından proteolitik olarak kırılması gerekmektedir. (259, 260).

AVEN, Bcl-2 protein ailesinin antiapoptotik üyelerinden olan Bcl-xL ve mitokondriyal apoptoz sürecinde kritik rol oynayan bir adaptör protein olan APAF-1 ile etkileşime girerek apoptoz inhibisyonunu gerçekleştirmektedir. Bcl-xL'in BH1 alt

edilmiştir. Ancak bu proteinlerin AVEN ile etkileşim mekanizmaları hala anlaşılammıştır (269, 271-274).

Özetle; hücre içi apoptoz inhibisyonunda ve DNA hasar yanıtının düzenlenmesinde kritik rol oynaması, dolayısıyla hem bir onkoprotein hem de direnç ilişkili molekül adayı olması sebebiyle AVEN'in moleküler yapısının ve ilişkili olduğu moleküler mekanizmaların iyi anlaşılması önem arz etmektedir. Edinilecek bulguların tümöröenez ve/veya ilaç direnci mekanizmalarındaki kritik basamakları aydınlatma potansiyeli mevcuttur.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

Deneyle sırasında kullanılan cihazlar, medyum ve kimyasallar, solüsyonlar, kitler ve siRnalar sırasıyla Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5 ve Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar

Laminar kabin (Thermo scientific)
İnverted mikroskop (Leica)
İnkübatör (Eppendorf, New Brunswick)
Vacunsafe aspiratory vaccum (Integra-Bioscience)
Mini santrifuj (Eppendorf)
Soğutmalı santrifuj (Eppendorf)
EVOS Fluid Cell Imaging Station (invitrogen)
iMARK Microplate Reader (BioRad)
LAS4000 Image Analyzer (ImageQuant)
Gemini XS mikrolate reader (Spectramax)
BD FACSCanto akış sitometrisi (Bioscience)
LSM 710 Confocal Laser Scanning Microscopy (Zeiss)

Tablo 4. Kullanılan medyum ve kimyasallar

DMEM/F12	Gibco by life technologies, (+)L-glut
FBS	Sigma, St Louis, MO, USA
Penisilin/streptomisin	Gibco by life technologies
PBS	Gibco by life technologies
Tripsin-EDTA	PAN BIOTECH
Dacomitinib	Selleck Chemicals
DAPI	Molecular Probes ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI
PBS-Tween20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany

Tablo 5. Kullanılan solüsyonlar

%1 Chaps solüsyonu	5 mM MgCl ₂ , 137 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, %1 Chaps (w/v), 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) ve proteaz inhibitörleri (Roche, Mannheim, Germany).
Yükleme tamponu	62.5 mM Tris-HCl pH:6.8, 2% SDS, 10% gliserol, 0.005% bromofenol mavisi, 5% 2-merkaptoetanol

Tablo 6. Kullanılan kitler ve SiRNA

Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche
Quickstart Bradford Assay	Bio-Rad, Munich, Germany
ECL Advance	GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA
HRP-konjuge ikincil antikor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany
X-tremeGENE 9	Roche
AVEN siRNA	Hs_AVEN_5 FlexiTube siRNA, SI03019058, Qiagen
Negatif kontrol (scrambled) siRNA	AllStars Negative Control siRNA, Qiagen
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen
BioVision Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Caspase-Glo® 9 Assay	Promega, Madison, Wisconsin, USA

3.2. Yöntemler

Bu çalışmada uygulanan tüm yöntemler aşağıdaki gibidir;

3.2.1. Hücre kültürü

Dondurulmuş SKBR3 hücre hattı hızla çözdürüldükten sonra 75 cm²'lik filtrelili kapaklı flask içerisinde 15 ml %10 inaktif FBS ve %2 penisilin/streptomisin eklenen DMEM/F12 medyumunda büyütüldü. Dört günde bir kültürlerin medyumunu değiştirildi. MCF10A hücreleri ise 5% at serumu, EGF (20 ng/ml), insulin (10 µg/ml), hidrokortizon (0.5 mg/ml), kolera toksini (100 ng/ml) ve penisilin/streptomisin eklenen DMEM/F12 medyumunda büyütüldü. Kültürler 37°C sıcaklığındaki, nemli ve %5 CO₂ ihtiva eden kültür koşullarında inkübe edildi.

Deney programımız doğrultusunda; 6 kuyucuklu kültür kabına(1x10⁶ hücre/kuyucuk), 96 kuyucuklu kültür kabına (1x10⁴ hücre/kuyucuk), 60 mm çaplı Petri kabına (1x10⁷ hücre/kuyucuk), ve 8 kuyucuklu cam lamlara pasajlandı. Hücreler pasajlanırken; eskiyen medyum atıldıktan sonra hücre yüzeyi 1X PBS ile yıkandı. 3 ml Tripsin-EDTA ile 10 dakika inkübe edilerek hücreler tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Daha sonra 3 ml büyüme medyumuyla Tripsin-EDTA inhibe edilip hücreler resüspanse edilerek ekimi yapıldı.

Hücreleri dondurmak için; ilk olarak hücreler yukarıda anlatıldığı gibi tripsinize edilip resüspanse edildikten sonra 15 ml hacimli falkon tüplere alındı. 300g/3 dakika santrifüjlenerek hücre pelleti ve süpernatanın ayrıştırıldı. Süpernatanın atıldıktan sonra pellet %20 DMSO:FBS içerisinde (dondurma medyumunu) yeniden süspanse edildi. Conta kapaklı dondurma tüplerine 1 ml hacimle paylaştırılarak hücre stokları (-) 80°C'de donduruldu.

3.2.2. İlaç uygulaması

DMSO içerisinde çözdürülerek hazırlanmış olan 10 mM konsantrasyonundaki dacomitinib stok solüsyonu büyüme medyumunu ile seyreltilerek hücrelere uygulandı.

3.2.3. MTT testi

Her kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kabına 100 uL büyüme medyumunu ile ekildi ve hücreler ilaç uygulamasına kadar 48 saat inkübe edildi. Çalışma gruplarına ayrılan hücreler belirlenen doz ve sürede dacomitinibe maruz bırakıldı. İlaç uygulamasının ardından hücrelerin üzerine 10 µL MTT tuzu eklendi ve hücre kültürleri 4 saat süreyle uygun koşullarda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından formazan kristallerinin çözünmesi ve mor rengin açığa çıkması için 100 µL hacimle çözücü solüsyon kuyucuklara eklenmiş ve bir gece boyunca inkübatörde bırakıldı. Spektrofotometrik ölçümler iMARK Microplate Reader (BioRad) cihazında 595 nm de yapılmıştır. Dacomitinibin etkin dozu ve etkin süresini belirlemek amacıyla yapılan test 3 bağımsız deney ile tekrarlandı.

3.2.4. Protein İzolasyonu ve protein konsantrasyonu ölçümü

Hücrelerden total protein izolasyonu için, hücreler 10 cm hücre kültürü kaplarında büyütülerek hücre kazıyıcı (scraper) yardımıyla soğuk PBS 1x ile yıkatarak toplandı. Hücreler eppendorf tüplere alınarak 13200 rpm de 30 saniye santrifüj edildi. Hücre pelleti proteaz and fosfataz inhibitörleri içeren CHAPS 1% liziz tamponunda (5mM MgCl₂, 137mM NaCl, 1mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Chaps, 20 mM Tris-HCl [pH =7.5]) 4°C'de, 15 dakika inkübe edildi ve sonrasında 4°C'de, 13200 rpm, 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant toplanarak proteinler -80°C'de immunoblot deneyleri için saklandı. Protein konsantrasyonu için Quickstart Bradford Assay kiti kullanıldı (Bio-Rad, Munich, Germany). Protein standart eğri çizimi için Quickstart Bovine Gamma Globulin (BGG) standartlarını içeren kit kullanıldı. Örnekler 1:5 dilüe edilerek 96-kuyucuklu plate formatında duplike olarak yüklendi ve 595nm de spektrofotometre cihazında absorbans ölçümü alındı. Protein konsantrasyonu daha önce oluşturulan standart eğri kullanılarak linear fit yöntemiyle tespit edildi.

3.2.5. Immunoblotlama

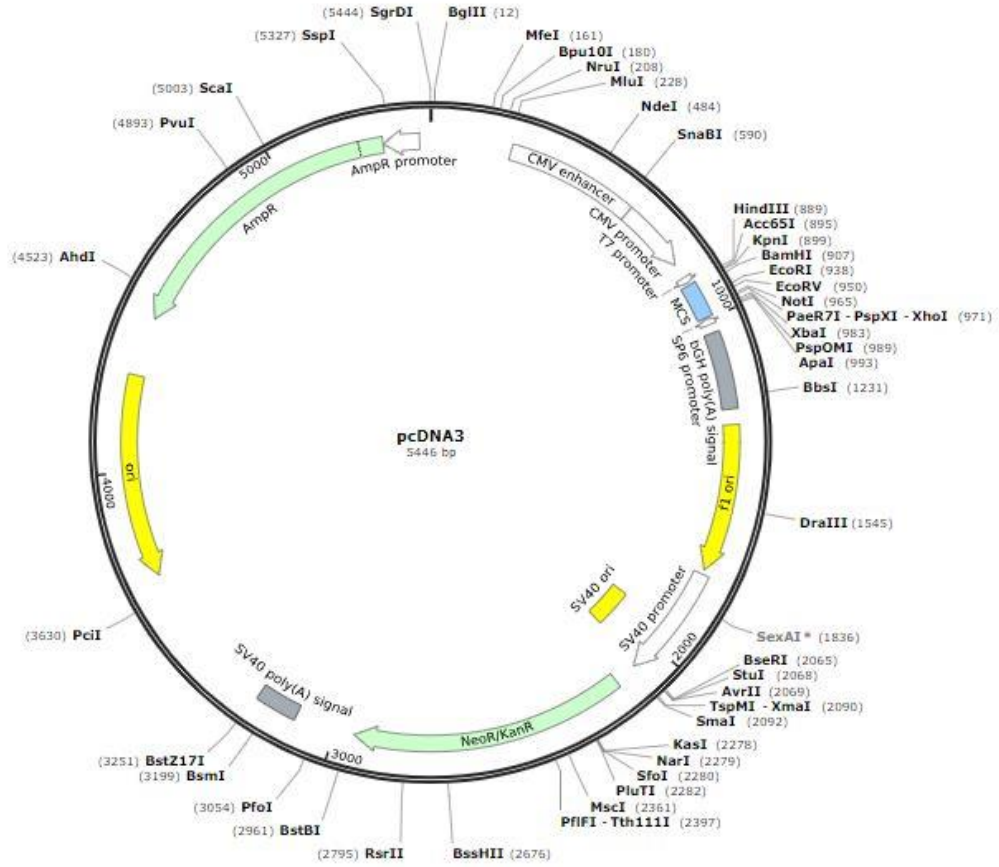
Hücrelerden izole edilen total protein (30 µg), yükleme tamponuyla (62.5 mM Tris-HCl pH:6.8, %2 SDS, %10 glycerol, % 0.005 bromophenol blue, %5 2-mercaptoethanol) karıştırıldı ve %10-15'lik SDS-PAGE jelde ayrıldı ve PVDF membrana transfer edildi. Membranlar %5 yağsız süt tozu-PBS-Tween20 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) ile bloklandıktan sonra, AVEN veya Aktin birincil antikoru ile (1:1000) gece-boyu muamele edildi ve PBS-Tween20 ile 3 kez 10'ar dakika yıkandı. Sonrasında HRP-konjuge ikincil antikor ile (1:4000) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) %10 (v/v) Milk Diluent/Blocking tamponuyla hazırlanarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. PBS-Tween20 ile 3 kez 10'ar dakika gereken son yıkamalar da yapılarak ECL Advance (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA) kiti ile LAS4000 Image Analyzer cihazı kullanılarak proteine ait luminesan sinyal tespit edildi.

3.2.6. Transfeksiyon deneyleri

Hücreler deney planına uygun olarak pcDNA3 (Şekil 11) ve pcDNA3-FLAG-AVEN plazmidleri ile X-tremeGENE 9 DNA transfeksiyon solüsyonu (Roche) kullanılarak 48 saat süreyle transfekte edildi. Hücreler üretici firmanın yönergelerini takiben, AVEN siRNA (Hs_AVEN_5 FlexiTube siRNA, SI03019058, Qiagen), negatif kontrol (scrambled) siRNA (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen) ile Hiperfect transfeksiyon solüsyonu (Qiagen) kullanılarak transfekte edildi. Gen susturum etkinliği immunoblotlama ile protein seviyesinde transfeksiyondan 48 saat sonra kontrol edildi.

İlaç uygulamasını takiben GFP-etiketli AVEN lokalizasyonundaki değişiklikleri görüntülemek amacıyla hücreler 6-kuyucuklu cam lam üzerinde kültürlendi. Soğuk absolut metanol ile fikslenip -20°C'de stoklandı. Görüntülemeye 15 dakika önce DAPI (Molecular Probes) ile boyandı. Zeiss LSM 710 konfokal mikroskop ile

görüntüleme yapıldı. Görseller ZEN tool ile işlendi. Kolokalizasyon analizleri CoLocalizer Pro yazılımı ile yapıldı.



Şekil 11. pcDNA3 vektör haritası (https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=basic_cloning_vectors&plasmid=pcDNA3)

3.2.7. Kaspaz aktivasyon testi

Kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesi daha önce tariflendiği üzere (266) ve üretici firmanın protokolüne uygun biçimde yapıldı. Kaspaz aktivitesi neticesinde oluşan florokrom AMC oluşumu 380 nm eksitasyon, 460 nm emisyon parametrelerinde Spectramax Gemini XS mikroparka florometri cihazında tespit edildi. Test 3 bağımsız deney şeklinde tekrarlandı. Standart sapma 3 bağımsız deney verilerinin ortalaması alınarak hesaplandı ve her mg proteinde göreceli floresan ünitesi biriminde ifade edildi (RFU).

3.2.8. Annexin V/PI boyama ve akış sitometrisi

Hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında büyütüldükten sonra dacomitinible muamele edildi. Hücreler santrifüj ile toplandı, 1x PBS ile yıkandı ve BioVision Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit protokolünde tariflendiği üzere 500 µl 1X Binding Buffer içerisinde resüspense edildi. 5 µl Annexin V-FITC ve 5 µl propidium iodide (PI) eklendikten sonra 5 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler FACSCanto akış sitometrisinde FITC ve PI kanallarında okutuldu, sonuçlar FlowJo analiz programı ile değerlendirildi.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Tüm in vitro ölçüm sonuçları 3 deneysel tekrar değerlendirilerek hesaplandı. Veriler GraphPad 5.0 yazılımı kullanılarak değerlendirildi, sonuçlar ortalama± ortalamanın standart sapması şeklinde ifade edildi. Gruplar arasındaki farkların analizi Student's t-test ile yapıldı. $P < 0.05$ ve $P < 0.01$ anlamlı istatistik fark olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücre proliferasyonu analizleri



Şekil 12. Dacomitinib uygulamasıyla zamana-bağılı değişen proliferatif yanıtlar **a.** SKBR3 ve N-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3, **b.** SKBR3, C-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3 ve pcDNA3-FLAG+ SKBR3, **c.** MCF10A hücre gruplarına ait bulgular

PanHER inhibitörü dacomitinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkinliğini analiz etmek amacıyla, SKBR3, N-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3, C-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3 ve pcDNA3-FLAG+ SKBR3 ve MCF10A hücre gruplarıyla MTT testi yapılmıştır. Bu amaçla tüm hücre grupları 4, 8, 12, 16, 24 ve 48 saat süreyle dacomitine maruz bırakılmış ve zamana-bağlı hücre canlılığı yüzdelerindeki değişimlerin belirlenmesi için Canlılık oranlarının değişimi Eşitlik 1’de belirtilen biçimde hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = (\text{Absorbans (Deney Grubu)} / \text{Absorbans (Kontrol Grubu)}) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

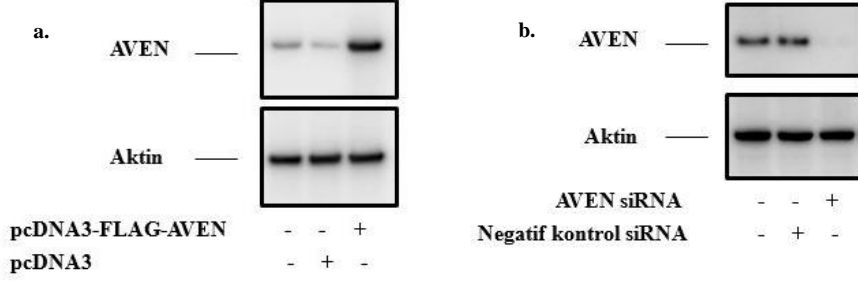
Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi Student’s bağımsız t-testi ile yapılmış ve 0.05’ten küçük anlamlılık değerine sahip ($p < 0.05$) olan sonuçların arasındaki fark anlamlı olarak kabul edilmiştir.

SKBR3 hücre grubunda dacomitine uygulamasının 4’üncü saatinde canlılık yüzdesi % 59’a gerilemiştir. İlk dört saatin ardından süresi ile canlılık yüzdesi paralel olarak artmıştır. Uygulamanın 12’inci saatinde yüzde canlılık oranı %80’e ulaşırken 48’inci saatte %90’ın üzerine çıkmıştır. N-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3 hücrelerinde ise canlılık yüzdesi genel olarak dengeli bir biçimde azalmıştır. İlk 4 saatin sonunda proliferasyonu devam eden hücre oranı yaklaşık %90’a gerilemiştir (Şekil 12a.).

SKBR3 hücre grubunda 4 saatin sonunda proliferasyonda %8 oranında bir artış tespit edilmiştir. 16’inci saatte yaklaşık %130’a ulaşmıştır ve bundan sonra oran doğrusal olarak azalarak 24’üncü saatte %115’e, 48’inci saatte %107’ye kadar gerilemiştir. C-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3 hücre grubunda ise 4’üncü ve 8’inci saatler için okuma yapılamamıştır. Ancak 12’inci saatte canlılık oranının %107’ye ulaştığı tespit edilmiştir. Canlılık oranı 16’inci saatte %110’a, 24’üncü saatte %120’ye ve 48’inci saatte %156 oranına ulaşmıştır. pcDNA3-FLAG+ SKBR3 hücre grubunda ilaç uygulaması ile birlikte 24’üncü saatin sonuna kadar canlılık oranının %100’ün üzerinde seyrettiği gözlemlenmiştir. Uygulamadan sonraki 24’üncü saatte %103 değeri okunabilmişken 48’inci saatin sonunda bu oran %91’e gerilemiştir (Şekil 12b.).

Normal epitel hücre hattı olan MCF10A hücre grubunda ise dacomatinib uygulamasına bağlı canlılık yüzdesinde değişim gözlemlenmemiştir (Şekil. 12c.).

4.2. Transfeksiyon etkinliği analizi

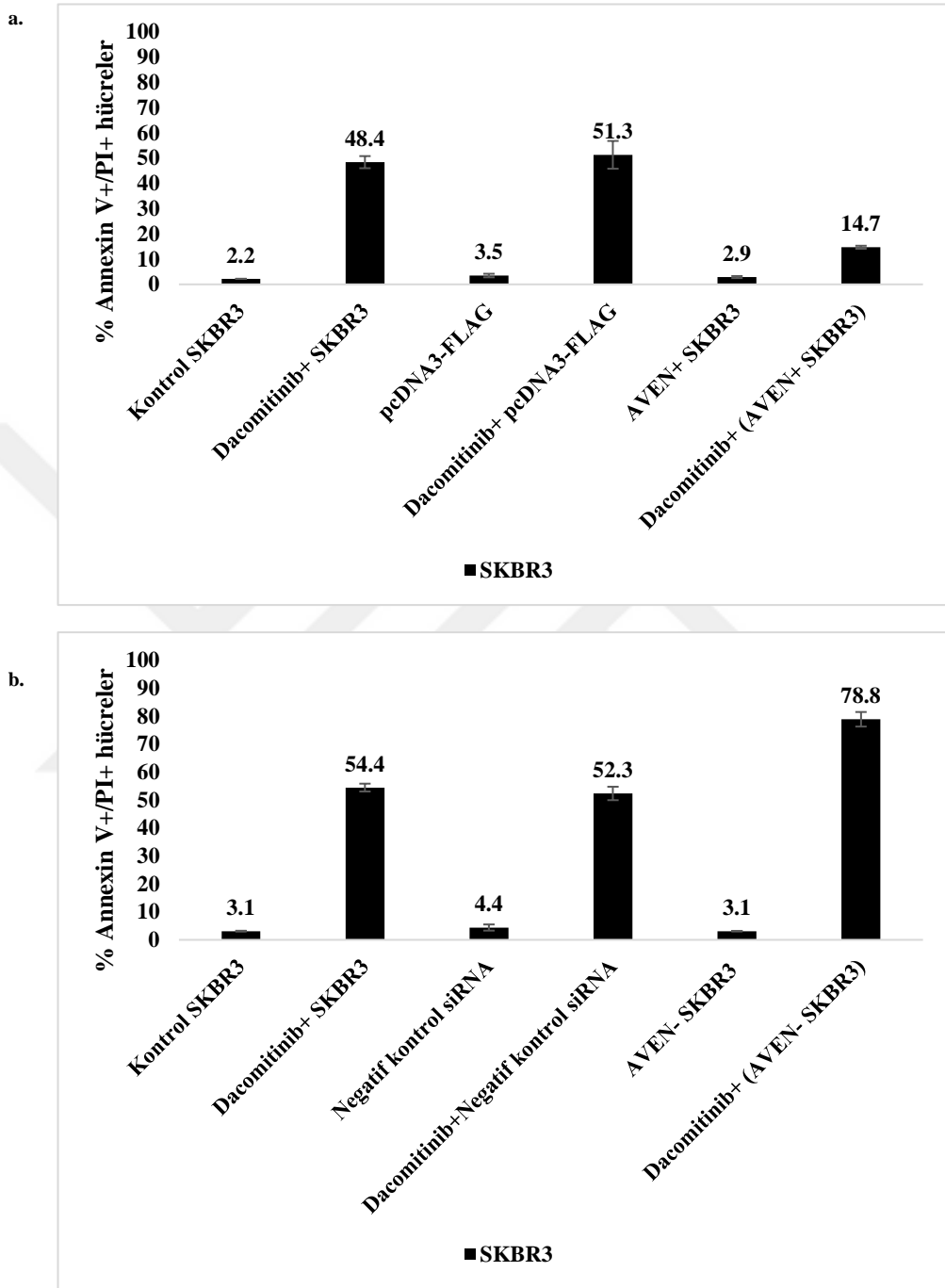


Şekil 13. siRNA ve vektörün transfeksiyon etkinliğinin immünoiblotla kontrolü. **a.** pcDNA3-FLAG-AVEN ve pcDNA3 vektörlerinin transfeksiyon etkinliğinin kontrolü **b.** AVEN siRNA ve negatif kontrol siRNA transfeksiyon etkinliği

SKBR3 hattı Hiperfect transfeksiyon ajanı ile ayrı ayrı 50 nM AVEN RNAi ve negatif kontrol RNAi ile transfekte edilmiştir. 24 saatlik transfeksiyon sonrasında AVEN ekspresyon seviyeleri immunoblot yöntemi ile belirlenmiştir. SKBR3 hücreleri pcDNA3-FLAG-AVEN ve pcDNA3 boş vektör ile X-tremeGENE transfeksiyon ajanı kullanılarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra AVEN ekspresyonu immunoblot ile belirlenmiştir (Şekil 13a). Transfekte edilen ve edilmeyen hücre gruplarında Aktin ifadenmesi düzeyinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. pcDNA3-FLAG-AVEN transfeksiyonu yapılan hücre grubunda ise karşılaştırıldığı diğer hücre gruplarından farklı olarak AVEN ekspresyon düzeyinde artış gözlemlenmiştir. Kontrol gen olarak Aktin kullanılmış ve hiçbir hücre grubunda aktin düzeyinde değişiklik gözlemlenmemiştir.

SKBR3 hücre hattında AVEN siRNA ve negatif kontrol siRNA transfeksiyonu ile AVEN geni susturum etkinliği gösterilmiştir (Şekil 13b). AVEN ekspresyonu, transfekte edilmeyen ve negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen hücre gruplarına kıyasla, AVEN siRNA transfekte hücre grubunda %100' yakın bir oranda azalmıştır. Kontrol gen olarak Aktin kullanılmış ve hiçbir hücre grubunda aktin düzeyinde değişiklik gözlemlenmemiştir.

.3. Apoptotik hücre analizi

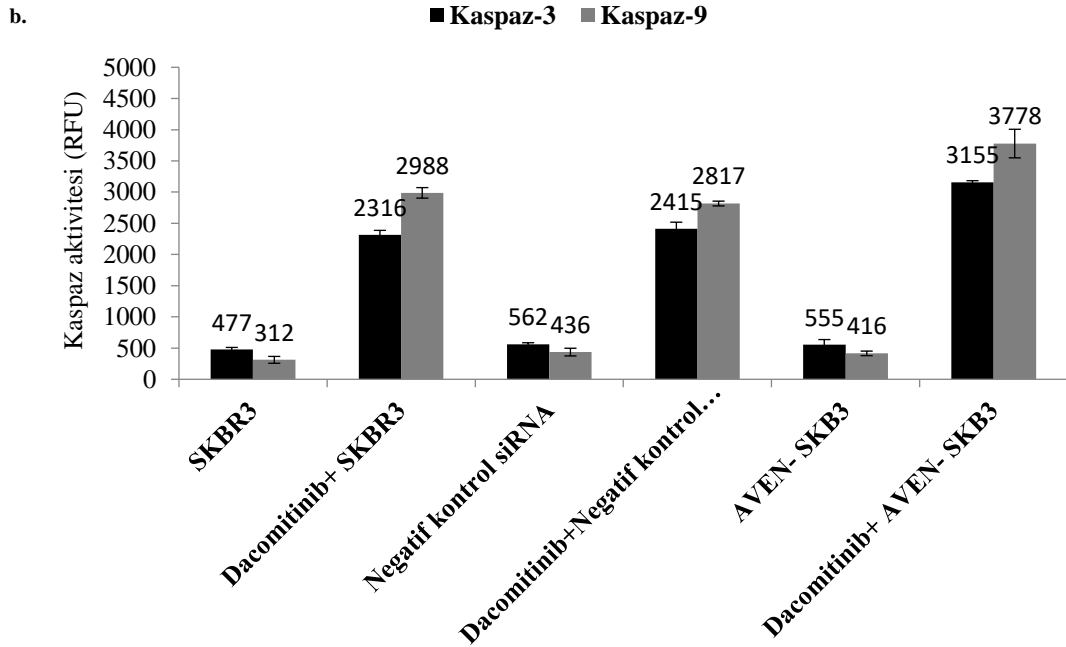
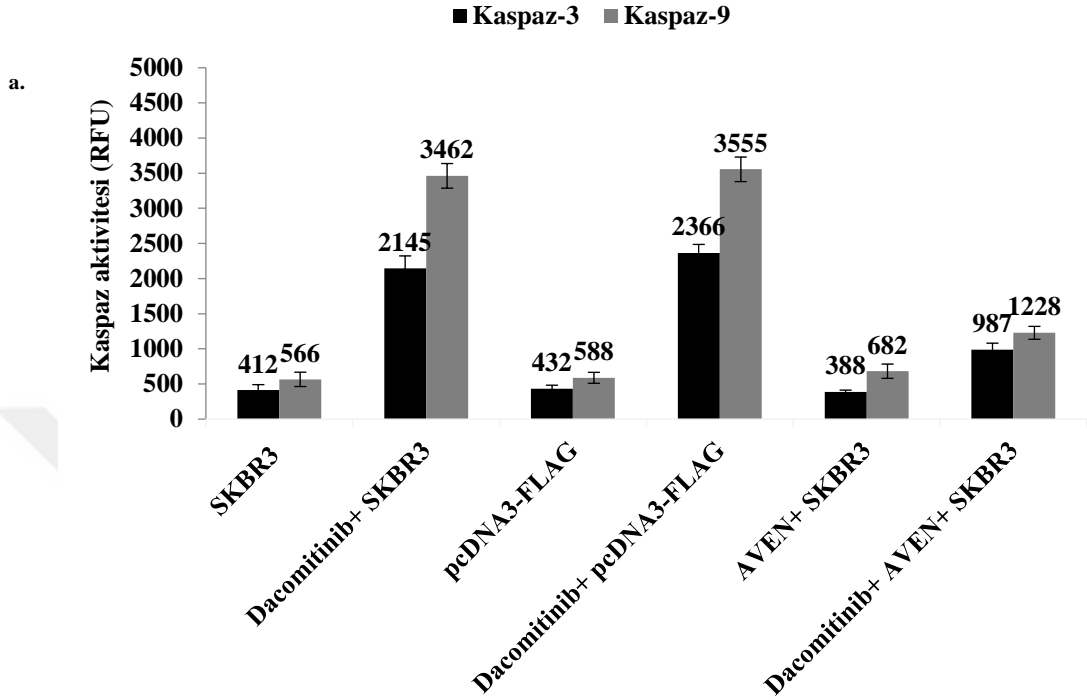


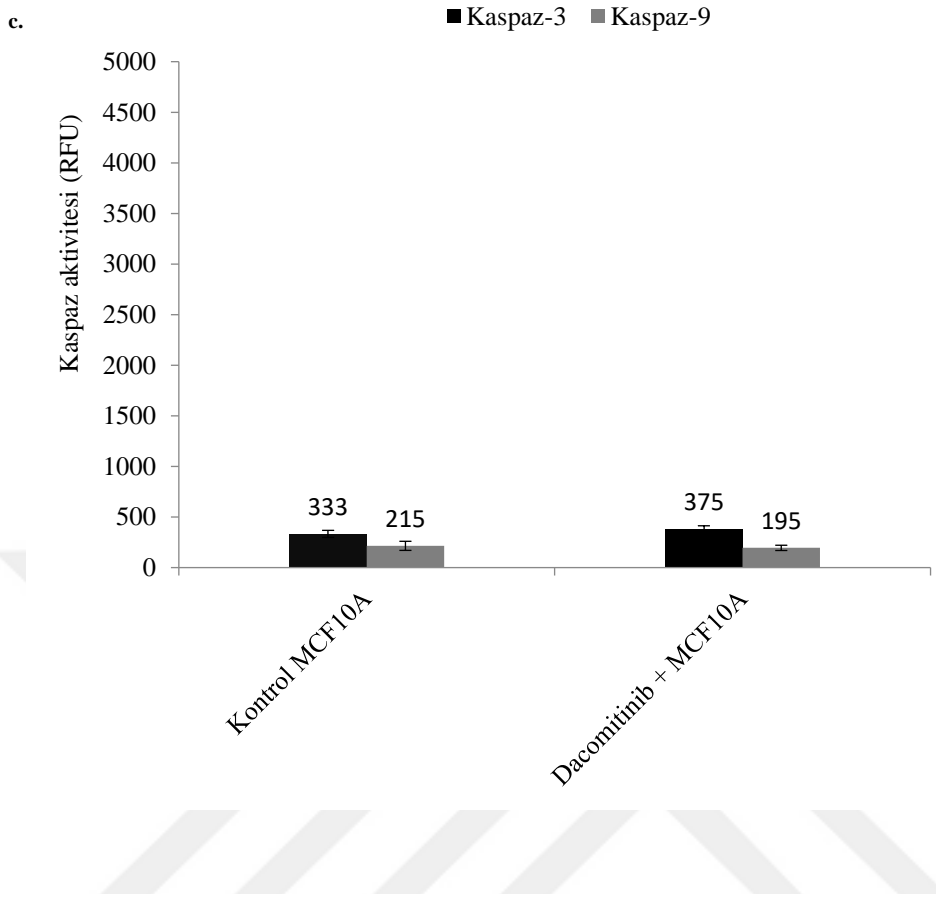
Şekil 14. Dacomitinib uygulamasıyla ilişkili olarak apoptotik hücre yüzdelерinin Annexin V/ PI boyama ile gösterimi **a.** SKBR3, pcDNA3-FLAG+ SKBR3, AVEN+ SKBR3 hücre gruplarıdaki apoptotik hücre yüzdeleri **b.** Negatif kontrol siRNA+ SKBR3 ve AVEN- SKBR3 hücre gruplarıdaki apoptotik hücre yüzdeleri

Kontrol SKBR3, pcDNA3-FLAG+ SKBR3 ve AVEN+ SKBR3 transfekte hücre hatları 1 μ M dacomitinib ile 48 saat inkübe edilmiş, hücre ölümü cevabı Annexin V/PI boyaması ve akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir (Şekil 14a.). Kontrol SKBR3 grubu hücrelerde apoptotik hücre oranı %2.2 iken dacomitinib uygulaması ile bu oran %48.4' e yükselmiştir. Benzer şekilde pcDNA3-FLAG+ SKBR3 hücre grubunda apoptotik hücre oranı dacomitinib uygulaması ile %3.5'tan %51.3'e ulaşmıştır. SKBR3 kontrol hattına kıyasla pcDNA3-FLAG+ SKBR3 hücre hattının kontrol grubundaki apoptotik hücre oranı % 1.3 oranında yüksektir. AVEN+ SKBR3 hücre hattındaki apoptotik hücre ise dacomitinib uygulaması ile % 2.9'dan %14.7'ye anca yükselebilmektedir.

Bir diğer deney setinde ise Kontrol SKBR3, negatif kontrol siRNA+ SKBR3 ve AVEN- SKBR3 hücre grupları 1 μ M dacomitinib ile 48 saat inkübe edilmiş, hücre ölümü cevabı Annexin V/PI boyaması ve akış sitometrisi ile belirlenmiştir (Şekil 14b). SKBR3 hücrelerinin kontrol grubundaki oran balangıçta % 3.1 olup ilaç uygulaması ile % 54.4'e kadar yükseltmiştir. Negatif kontrol siRNA+ SKBR3 hücre hattının kontrol grubunda dacomitinib uygulamasın bağı olarak apoptotik hücre oranı % 4,4 iken dacomitinib uygulaması ile bu oran %52.3'e yükselmiştir. AVEN- SKBR3 hücrelerin kontrol grubunda apoptotik hücre oranı %3.1 iken dacomitinibe uygulanan grupta bu oran %78,8'e kadar artmıştır.

4.4. Kaspaz-3 ve -9 aktivasyonu analizi





Şekil 15. Dacomitinib tarafından indüklenen kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunun AVEN ekspresyonu ile düzenlenmesi **a.** SKBR3, pcDNA3-FLAG+ SKBR3, AVEN+ SKBR3 hücre gruplarıdaki kaspaz aktivite ölçümleri **b.** Negatif kontrol siRNA+ SKBR3 ve AVEN- SKBR3 hücre gruplarıdaki kaspaz aktivite ölçümleri **c.** MCF10A hücre grubundaki kaspaz aktivite ölçümleri

SKBR3, pcDNA3-FLAG+ SKBR3 ve AVEN+ SKBR3 hücreleri 1 μ M dacomitinib ile 48 saat inkübe edildikten sonra kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonları florometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 15a.). SKBR3, AVEN- SKBR3 ve negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen SKBR3 hücreleri 1 μ M dacomitinib ile 48 saat inkübe edildikten sonra kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonları florometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 15b).

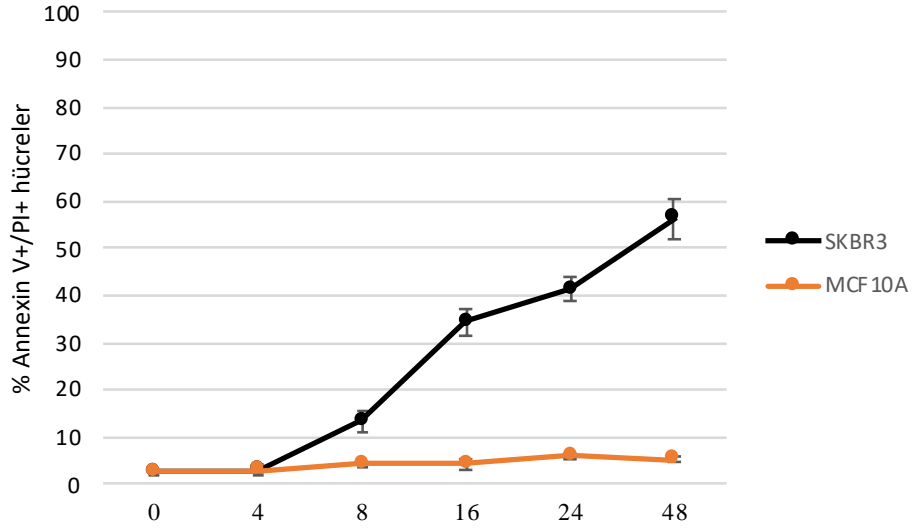
SKBR3, pcDNA3-FLAG+ SKBR3 ve AVEN+ SKBR3 hücreleri hücre hatlarının dacomitinib uygulanmayan gruplarında kaspaz-3 ve-9 RFU değerleri birbirlerine oldukça yakın değerlerdir (Şekil 15a.); kaspaz-3/-9 aktiviteleri SKB3 için 412/566 RFU, pcDNA3-FLAG+ SKBR3 için 432/588 RFU ve AVEN+ SKBR3 için 388/682 RFU dur. Dacomitinib uygulamasın bağlı olarak kaspaz-3/-9 aktiviteleri

değerleri sırasıyla SKBR3 için 2145/3462, pcDNA3-FLAG+ SKBR3 için 2366/3555 RFU ve AVEN+ SKBR3 için 987/1228 RFU değerine yükselmiştir. AVEN+ SKBR3 hücre hattındaki dacomitinib uygulaması sonucu kaspaz-3 ve -9 aktivitesinde meydana gelen artış diğer hücre gruplarına kıyasla oldukça düşüktür.

SKBR3, AVEN- SKBR3 ve negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen SKBR3 hücre hatlarının her birinde de ilaç uygulanmayan gruplardaki kaspaz aktivite değerleri ilaç uygulanan gruplara kıyasla düşüktür (Şekil 15b). Dacomitinib uygulaması ile SKBR3 hücre hattındaki kaspaz-3/-9 aktiviteleri sırasıyla 477/312 RFU'dan 2316/2988 RFU'ya yükselmiştir. Benzer şekilde ilaç uygulaması ile birlikte negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen SKBR3 hücre hatında bu değerler sırasıyla 562/436 RFU'dan 2415/2817 RFU'ya yükselmiştir. Dacomitinib uygulaması ile kaspaz aktivasyon değerlerindeki en büyük artış AVEN- SKBR3 hücre hatında görülmüştür. AVEN- SKBR3 hücre hattının ilaç uygulanmayan kontrol grubunda kaspaz-3/-9 değerleri sırasıyla 555/416 RFU'dan 3155/3778 RFU'ya yükselmiştir.

Normal epitel hücre hattı MCF10A'da ise dacomatib uygulamasına bağlı olarak kaspaz-3 ve -9 aktivitelerinde belirgin değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 15c.). Dacomitinib uygulamasından önce kaspaz-3/-9 aktiviteleri sırasıyla 333 ve 215 RFU iken uygulamadan sonra 375 ve 195 RFU olarak ölçülmüştür.

4. 5. SKBR3 meme kanseri ve MCF10 normal meme epitel hücrelerinin ölüm cevabı



Şekil 16. HER2+ SKBR3 meme kanseri ve MCF10 normal meme epitel hücrelerinin 1 μ M dacomitinib uygulamasına hücre ölümü cevabı

HER2+ SKBR3 meme kanseri ve MCF10 normal meme epitel hücre gruplarında dacomitinib uygulamasına verilen apoptotik yanıtın zamanla değişimi Şekil 16’da gösterilmiştir. Bu amaçla SKBR3 ve MCF10 hücreleri 6-kuyucuklu hücre kültürü kaplarında büyütüldükten sonra 1 μ M dacomitinib ile zamana-bağımlı olarak muamele edilmiştir. Hücrelerin apoptotik yolak ile hücre ölümü cevabı Annexin V/PI boyaması ve akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir.

İlk 4 saate kadar yanıt her iki grupta da % 2 düzeyindeyken 4’üncü saatin sonunda SKBR3 hücre grubundaki apoptotik hücre oranı artmaya başlamıştır. Apoptotik hücre yüzdesi 8’inci saatte %15 civarına, 16’ncı saatin sonunda %35 civarına yükselmiştir. Uygulamanın 24’üncü saatinde %40’a ulaşan ölü hücre yüzdesi daha sonra doğrusal bir artışla 48’inci saatte %50 oranını aşmıştır. Tüm dacomitinib uygulama süresi boyunca MCF10 hücre grubundaki apoptotik hücre oranında önemli bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

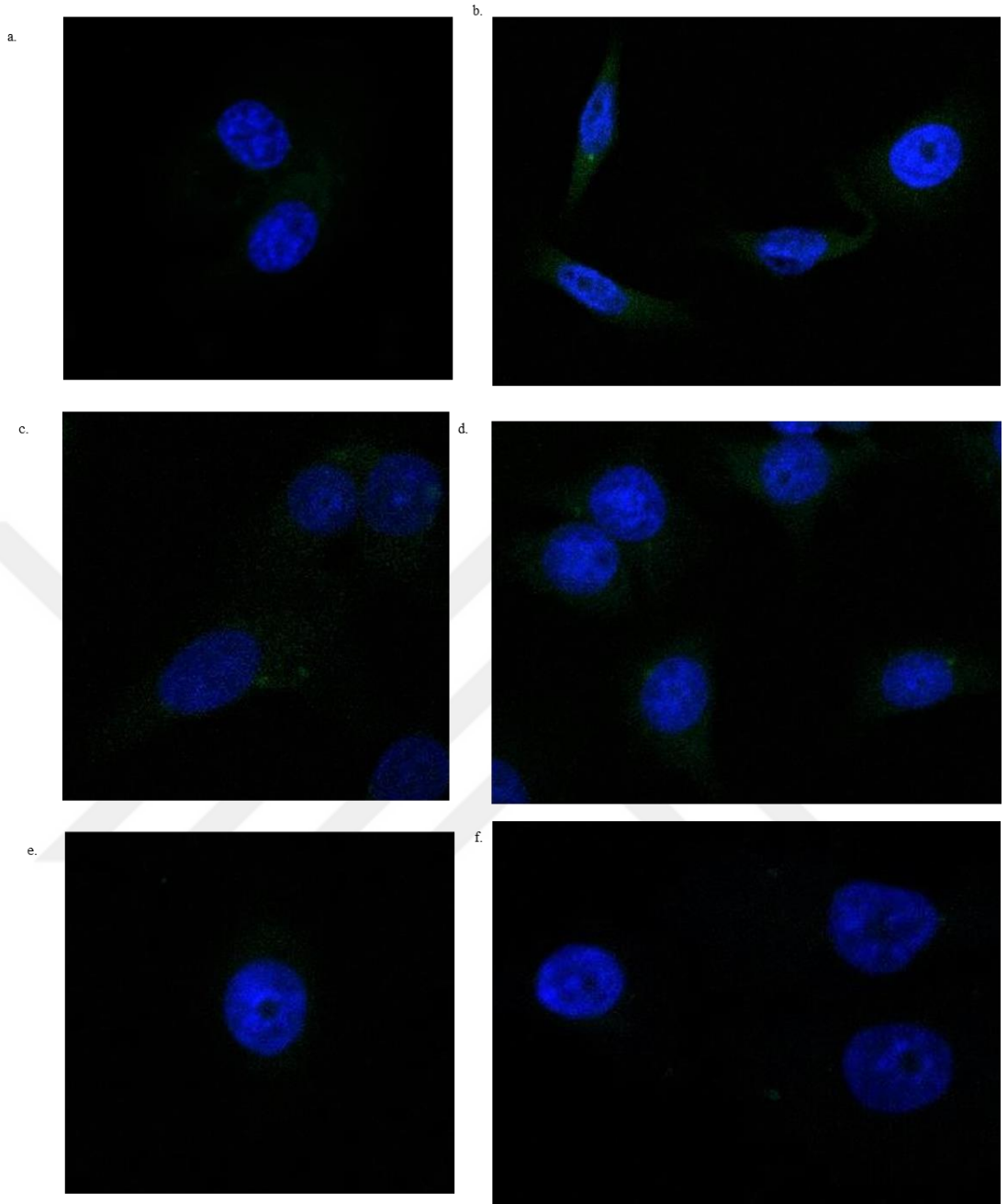
4.6. Dacomitinib uygulamasıyla AVEN lokalizasyonundaki değişimler

Tablo 7. Dacomitinib uygulamasın 0-2-4-8-16-24-48'inci saatlerinde AVEN'in nükleer lokalizasyonundaki değişiklikler

Çalışma grubu	Rr değeri	Çalışma grubu	Rr değeri	Çalışma grubu	Rr değeri
s1 c1	0.2611	s1 8h1	0.2180	s2 c1	0.1744
s1 c2	0.3439	s1 8h2	0.1678	s2 c1-2	0.1431
s1 c3	0.2781	s1 8h2-2	0.2083	s2 4h1	0.1324
s1 c4	0.3139	s1 8h3	0.2396	s2 4h2	0.1185
s1 c4-2	0.3025	s1 8h3-2	0.2249	s2 4h3	0.1338
s1 c5	0.3829	s1 16h1	0.2673	s2 4h4	0.0473
s1 c5-2	0.3754	s1 16h1-2	0.3069	s2 4h5	0.2143
s1 2h1	0.1619	s1 24h1	0.3685	s2 8h1	-0.2278
s1 2h2	0.2406	s1 24h2	0.1174	s2 8h2	-0.0276
s1 2h3	0.1770	s1 24h3	0.2192	s2 8h3	0.0690
s1 2h4	0.0569	s1 24h5	0.1524	s2 8h4	0.0112
s1 2h4-2	0.1389	s1 48h1	0.1358	s2 8h5	0.1098
s1 2h5	0.2122	s1 48h2	0.0891	s2 16h1	0.0624
s1 4h1	0.1448	s1 48h3	0.1720	s2 16h2	0.0241
s1 4h2	0.2119	s1 48h4	0.1556	s2 16h3	0.0034
s1 4h3	0.0781	s1 48h5	0.1735	s2 16h4	0.0676
s1 4h4	0.2848			s2 16h5	0.0549
s1 4h4-2	0.2664			s2 16h6	0.2692
s1 4h5	0.0710				

Dacomitinib uygulamasın 0-2-4-8-16-24-48'inci saatlerinde AVEN'in nükleer lokalizasyonundaki değişiklikler Tablo 7'de verilmiştir. Değişken değerler arasında herhangi bir patern yakalanamıştır. Kolokalizasyonun değerinin en yüksek olduğu alan birinci lamdaki kontrol grubu s1_c5 'te görüntülenirken, en düşük olduğu alan ikinci lamdaki 8 saat süreyle dacomitinibe maruz bırakılan grupta s2_8h1 'te tespit edilmiştir. Rr değerleri uygulama dacomitinib uygulamasından bağımsız olarak değişkenlik göstermektedir.

Uygulama gruplarından bazı alanlara ait görüntüler Şekil 17'de verilmiştir. Görsellerin kolokalizasyon analiz raporları Ekler bölümünde verilmiştir.



Şekil 17. AVEN+ SKBR3 hücrelerinden dacomitinibin kontrol, 4, 8, 16, 24 ve 48 saat uygulama gruplarından alınan konfokal mikroskop görselleri **a.** Kontrol grubu **b.** 4 saat uygulama grubu **c.** 8 saat uygulama grubu **d.** 16 saat uygulama grubu **e.** 24 saat uygulama grubu **f.** 48 saat uygulama grubu

5. TARTIŞMA

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör-2'nin (HER2) hücre membranındaki sayısının artışı ile fonksiyonel olarak insan meme kanserinin patogeneğinde rol oynamaktadır. HER2'nun çok sayıda mekanizma aracılığıyla hücre dönüşümünü indükleyebilmektedir. Bu sebeple HER2 tümörogenezinin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak spesifik molekül hedeflerinin tanımlanması, etkin ve minimum yan etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir.

HER2, diğer aile üyelerinin farklı olarak ligand ilgisi düşüktür. ECD'sinin özgün konformasyonel yapısı sebebiyle; ligand-bağımsız olarak dimerizasyona ve aktivasyona eğilimlidir. HER2+ kanser hücrelerinde, gen ifadenmesinde meydana gelen 40-100'lük kat artış, hücre yüzeyindeki reseptör sayısının 2 milyon gibi anormal rakamlara ulaşmasına neden olmaktadır. Bu durum, birbirlerine iyice yakınlaşan HER2 reseptörlerin ligand-bağımsız dimerize olarak ilgili yolların kontrol dışı aktive etmeleri ile sonuçlanmaktadır (96-98). Kanserleşme sürecinde oynadığı önemli rol sebebiyle HER2 kritik bir molekül olarak tanımlanmıştır (288). Monoklonal antikor ve türevleri ile HER2'nun HER2 ve HER3 ile dimerizasyonu engellendiği, ikili tirozin kinaz inhibitörleri ile HER2/EGFR dimerlerinin inhibe edildiği tedavi yaklaşımları baypas sinyal yollarının gelişimi sebebiyle yetersiz kalmıştır (67, 134, 289-291). HER2+ SKBR3 meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada artan HER4 ifadenmesi ve nükleer transportun artışı trastuzumaba karşı direnç gelişimini desteklediği gösterilmiştir (292). Dahası, HER2 reseptörünün EGF reseptör ailesinin diğer üyeleri ve diğer RTK ailelerinin üyeleri ile dimerize olarak baypas mekanizmalar aracılığıyla sinyal iletimine devam edebildiğine dair bulgular edinilmiştir. Lapatinib tedavisi ise EGFR ile HER3 reseptörlerinin ifadenmesinde ve HER2/EGFR ile HER2/HER3 dimerlerinin miktarlarının artışı aracılığıyla yine baypas mekanizmalar üzerinden direnç gelişimi nedeniyle kısıtlanmaktadır (104, 105, 293-295). Özetle; PI3K, Ras ve PLC γ yollarının aktivasyonu, HER2'nin kemoterapötik hedef olmayan bir reseptörler ile kurduğu heterodimer aracılığıyla baypas mekanizmalar üzerinden devam etmektedir. Hatta aktif heterodimerik kompleksler bu sinyal yollarının daha uzun süreli uyarılmasına sebep olmaktadır. Bu yolların aktivasyonun devamlılığı kemoterapötiğe dirençli hücrelerin invaziv özellik kazandırmaktadır; hücre polaritesi ortadan kalkmakta ve epitelyal kanserlerde

gözlemlenen hücre adezyonunun bozulmaktadır (37). Bu sebeple, tüm EGF reseptörlerinin eş zamanlı inhibisyonunu mümkün kılan panHER inhibitörlerinin kullanımı ile HER2+ meme kanserinde tedavi başarı oranlarının yükseltilmesi hedeflenmektedir. PanHER inhibitör sınıfından dacomitinibin, kaspaz-3 ve -9 aktivasyonunu uyararak HER2+ meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal apoptotik yolları aktive ettiği gösterilmiştir (286).

Baypas mekanizmalar ile PI3K, Ras ve PLC γ yollarının aktivasyonuna ek olarak, dirençli hücrelerde anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin ifadenme düzeylerinde anlamlı değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir. Anti-apoptotik protein düzeylerindeki artış ve pro-apoptotik protein düzeylerindeki azalış HER2+ meme kanseri hücrelerinde direnç gelişimiyle ilişkili bulunmuştur (287). Bu bulgular HER2 inhibisyonu ile indüklenen apoptotik sürecin regülasyonunda rol oynayan proteinlerin önemini ortaya koymakta ve bu durum araştırmacıları bu konuda çalışmaya teşvik etmektedir.

Bu tez çalışmasında, HER2+ meme kanseri hücre hattı SKBR3'te panHER inhibitörü dacomitinib ile indüklenen apoptotik yanıtın düzenlenmesinde AVEN proteinin rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu sebeple AVEN'in aşırı ifadelendiği ve susturulduğu hücre hatları üretilerek, dacomitinib uygulamasına bu hücre hatlarının verildiği apoptotik yanıtlar protein düzeyinde incelenmiştir. AVEN ise mitokondriyal apoptoz yolak proteinlerinden anti-apoptotik BCL-xL ve apoptotik APAF-1 ile etkileşime girerek hücre ölümünü baskılamakta ve proliferatif yanıtın artışına neden olmaktadır (261, 262). Dahası Esmaili ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınladıkları çalışmada AVEN'in nükleus transportu için gerekli olan LR-NES sinyal dizisine sahip olduğu bildirilmiş ve nükleustaki AVEN sayısındaki artışın hücre döngüsü regülasyonu ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar sunulmuştur (268). Özetle meme kanseri hücrelerinde artmış AVEN aktivasyonunun ve nüklear AVEN transportunun kanserleşme sürecinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (257, 258, 266). Çalışmada, AVEN'in dacomitinib yanıtında rolünü anlayabilmek amacıyla; AVEN ifadenmesinin kalıcı şekilde arttırıldığı AVEN+ SKBR3 ve AVEN ifadenmesinin susturulduğu AVEN- SKBR3 hücre hatları, pcDNA3-FLAG-AVEN ve AVEN_siRNA transfeksiyonu ile elde edilmiştir. Hücre içindeki lokalizasyonunu

takip etmek amacıyla GFP etiketli AVEN tercih edilmiştir. Dahası GFP proteinin AVEN foksiyonunu bloklama ihtimalini ortadan kaldırmak için C-terminalinde ve N-terminalinde GFP etiket taşıyan iki farklı vektör tercih edilmiştir. Bu hücre hatları ile yapılan çalışmalarda kontrol amaçlı kullanılmak üzere pcDNA3-GFP ve siRNA negatif kontrol transfeksiyonu yapılan hücre hatları da üretilmiştir. Böylece dacomitinib uygulamasına verilen yanıtta değişikliklerin transfeksiyon kaynaklı olma ihtimalini ortadan kaldırmak amaçlanmıştır. Transfeksiyon etkinliği immüno blotlama ile kontrol edilmiştir (Şekil 13). GFP etiketli AVEN ifadenmesi ise eş zamanlı olarak flüoresans mikroskop ile takip edilmiştir.

İkinci nesil küçük molekül yapıları panHER inhibitörü dacomitinibin HER reseptörlerinin tirozin kinaz alt birimlerine kovalent olarak bağlanarak otofosforilasyonlarını kalıcı şekilde engellediği ve aşağı akım sinyalizasyonlarını bozarak güçlü anti-proliferatif etki gösterdiği bilinmektedir (Zhu ve ark., 2015; Gonzales ve ark., 2008). Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda dacomitinib ile HER+ meme kanseri hücre hatlarında mitokondriyal apoptotik yolağın indüklenebildiği gösterilmiştir (286). Bu tez çalışmasında, HER2+ SKBR3 hücrelerinin proliferasyonunu baskılamak ve bu hücrelerde apoptozu uyarmak amacıyla dacomitinib kullanılmıştır. Çalışmada, SKBR3 hücre hattında analiz edilebilir sitotoksik etkinin 1 µM dacomitinib uygulamasının 24'üncü saatinde indüklenebildiği belirlenmiştir. Bu sebeple tüm hücre hatlarına 1 µM dacomitinib uygulaması yapılarak; uygulamanın 4, 8, 12, 16, 24 ve 48'inci saatlerinde örneklemeler yapılmıştır (Şekil 12).

Dacomitinibin zamana bağlı anti-proliferatif etkisi MTT hücre proliferasyonu testi ile analiz edilmiştir. SKBR3, AVEN+ SKBR3 ve AVEN- SKBR3 hücrelerinin dacomitinib uygulamasının 4, 8, 12, 16, 24 ve 48 saatindeki proliferasyon değişimleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. N-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3 ile SKBR3 hücre hatlarının dacomitinibe verilen proliferatif yanıtların oldukça paralel olduğu gözlemlenmiştir. Normal şartlarda AVEN aktivasyonunun N-terminal kırılma ile gerçekleştirildiği göz önünde bulundurulduğunda; N-terminal GFP etiketli AVEN'nin, GFP proteinin lokalizasyonundan dolayı aktivasyonunun engellenmiş olabileceği düşünülmüştür (259, 260). C-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3, AVEN+ SKBR3 ve pcDNA3-FLAG+ SKBR3 hücre hatlarının proliferatif yanıtları

karşılaştırıldığında ise; uygulamanın 48'inci saatinde diğer iki hücre grubundan farklı olarak C-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3 hücrelerinde proliferatif yanıtın arttığı belirlenmiştir. Bu durumun AVEN'in proliferasyon üzerindeki destekleyici farkının, dacomitinib uygulamasının maksimum toksik etkinliğinin gözlemlendiği 24'üncü saatinden sonra ortaya çıktığı düşünülmüştür. İlk 24 saat içerisindeki örneklemelerden edinilen veriler arasında ise anlamlı bir patern yakalanamamıştır. Bu duruma hücre ekiminde kullanılan başlangıç sayısındaki farklılıkların neden olmuş olabileceği çıkarımında bulunulmuştur. Tezdeki çalışmalara C-terminal GFP etiketli AVEN+ SKBR3 hücre hattı kullanılarak devam edilmiş ve kısaca AVEN+ SKBR3 olarak adlandırılmıştır.

Dacomitinibin hücreler üzerindeki apoptoz indükleyicisi etkisini destekleyici bulgular Annexin V/PI boyaması ve kaspaz-3/-9 aktivasyon testleri ile elde edilmiştir. SKBR3, pcDNA3-FLAG+ SKBR3 ve AVEN+ SKBR3 hücre gruplarının dacomitinib varlığındaki ve yokluğundaki Annexin V/PI+ hücre yüzdeleri hücre akış sitometrisi analizi ile kontrol edilmiştir (Şekil 14a). Bu çalışmaya göre; üç hücre grubunda da dacomitinib yokluğundaki Annexin V/PI+ hücre yüzdesi % 3 civarında iken dacomitinib varlığındaki bu oran farklılık göstermektedir. Dacomitinib uygulaması ile birlikte SKBR3 ve pcDNA3-FLAG+ SKBR3 hücre hatlarının her ikisinde Annexin V/PI+ hücre yüzdesi % 50'ye kadar yükselirken AVEN+ SKBR3 hücre hattında bu oran % 15 civarında kalmıştır. Aradaki farkın AVEN'in anti-apoptotik role sahip olması nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği düşünülmüştür. Dahası AVEN- SKBR3 hattında ise dacomitinib uygulaması sonucu bu oranın %80'e kadar yükseldiği gözlemlenmiştir. Negatif kontrol siRNA+ SKBR3 hücre grubundaki Annexin V/PI+ hücre yüzdesi SKBR3 ile kıyaslandığında önemli bir fark gözlemlenememiştir (Şekil 14b). AVEN- SKBR3 hücre hattı yanıtındaki değişikliğin siRNA transfeksiyonu kaynaklı olma ihtimali böylelikle ortadan kaldırılmış olmaktadır. Dahası dacomitinibin kanser hücrelerindeki HER reseptör aktivasyonunun artışına özgü inhibitör etkinliğini ölçmek amacıyla; HER2+ meme kanseri SKBR3 hücre hattına ek olarak MCF10 normal epitel hücreleri de dacomitinibe maruz bırakılmıştır. Uygulamanın 2, 4, 8, 16, 24 ve 48'inci saatlerinde örneklem yapılmıştır. İki hücre grubundaki apoptotik hücre yüzdeleri Annexin V/PI boyama yapıldıktan sonra hücre akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. SKBR3 hücre hattında dacomitinib uygulamasıyla

zaman-bağımlı olarak Annexin V/PI+ hücre yüzdesi sürekli artışı gözlemlenirken, MCF10 normal epitel hücre hattında ise anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu çalışmayla dacomitinin, HER reseptör aktivasyonunun yüksek olduğu kanser hücrelerinde yüksek oranda toksik etki gösterdiği ve hedefli olarak apoptozu indüklenebildiği gösterilmiştir (Şekil 14).

Mitokondriyal apoptoz süreçte rol oynayan kaspaz-3 ve -9'un aktivitelerinin ölçüm sonuçları (Şekil 15) ise Annexin V/PI boyama ile hücre akış sitometrisi analizi sonuçlarına paralellik göstermektedir (Şekil 14). Genel olarak tüm hücre gruplarında dacomitinin uygulamasının olmadığı kontrol grubuna kıyasla kaspaz aktiviteleri belirli oranlarda yükselmiştir. Bu veriler dacomitinin tüm hücre gruplarında mitokondriyal apoptozu indüklediği bilgisi doğrulanmıştır. Dacomitinin uygulamasıyla SKBR3, pcDNA3-FLAG+ SKBR3 ve negatif kontrol siRNA+ SKBR3 hücre gruplarındaki kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonları sırasıyla ortalama 2300 RFU ve 3200 RFU civarına yükselmiştir. AVEN+ SKBR hücre grubunun dacomitinin uygulamasına bağlı kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri sırasıyla 987 RFU ve 1228 RFU olarak bu gruplara kıyasla oldukça düşük ölçülmüştür. Yine kontrol grupları ile kıyaslandığında ise AVEN- SKBR3 hücre grubundaki kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerinin ise sırasıyla 3155 RFU ve 3778 RFU değerleri ile ortalamanın üzerinde oldukları gözlemlenmiştir. Özetle, AVEN miktarındaki artışın kaspaz-3 ve -9'un aktivitelerinin azalmayla, AVEN'in ortadan kalmasının ise bu kaspazların aktivasyonunda ortalamanın üzerinde artışla ilişkilendirilmiştir. Mitokondriyal apoptoz sürecinde AVEN'in önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar tez çalışmalarından edinilen verilerle kanıtlanmaktadır.

AVEN+ SKBR3 hücrelerinde, dacomitinin uygulamasına karşın, aşırı AVEN aktivasyonu ile ilişkili olarak artış gözlemlenen proliferatif yanıtın düzenlenmesinde AVEN lokalizasyonunda meydana gelen değişimlerin etkisinin analiz edebilmek amacıyla GFP etiketli AVEN+ SKBR3 hücrelerinin konfokal mikroskopla görüntülenmesi yapılmıştır. Bu amaçla AVEN+ SKBR3 hücreleri cam lam üzerinde kültürlenerek 1 µM dacomitine 2, 4, 8, 16, 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Daha sonra hücreler fikse edilmiş ve nükleusların mavi renkli görünmelerini sağlayan anti-fade DAPI ile boyanmıştır. Konfokal mikroskop sistemi hücreleri 3 boyutlu algılandığı ve lazerli temelli katmanlar halinde taranma yapabildiği, dolayısıyla da üst

üste düşen sinyal konumlarının doğru şekilde ayırt edilmesine imkân verdiğinden tercih edilmiştir. Yeşil ve mavi filtreler kullanılarak çekilen görüntüler üst üste eklenerek yeşil renkli GFP etiketli AVEN'lerin ve mavi renkli nükleusun birlikte olduğu görseller elde edilmiştir (Şekil 17). Görseller, gri piksel bazında yüksek güvenilirliği bulunan CoLocalizer programı kullanılarak analiz edilmiştir. AVEN'in nükleusa transportunun zaman zaman artarken zaman zaman azaldığı ancak bunun dacomitinib uygulama süresinden bağımsız olarak gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Tablo 7). AVEN lokalizasyonundaki değişimlerin analiz edilmesi açısından konfokal görüntüleme sisteminin yetersiz kalmış olabileceği çıkarımında bulunulmuştur.

Genel olarak tez çalışmamız kapsamında; dacomitinibin HER reseptör aktivasyonu yüksek olan hücreleri hedef alarak bu hücrelerde mitokondriyal apoptotik yolları aktive ettiği normal epitelyal hücre hattı MCF10 ve HER2+ meme kanseri hücre hattı SKBR3 yapılan çalışma ile gösterilmiştir. AVEN+ SKBR3 hücrelerde, AVEN'in uygulamanın 24'üncü saatinden sonra dacomitinib ile uyarılan apoptotik yanıtların baskılanması yönündeki düzenlenmede önemli rol oynadığını düşündüren bulgular edinilmiştir. AVEN- SKBR3 hücrelerin, SKBR3 ve AVEN+ SKBR3 hücrelerine kıyasla dacomitinibe karşı çok daha duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. HER2+ SKBR3 hücrelerinde AVEN'in lokalizasyondaki değişim ile proliferatif yanıtı destekleyici fonksiyonu arasındaki ilişkiyi destekleyici yeterli veri edinilememiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Dacomitinib uygulaması ile tüm hücre gruplarında kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerindeki artışın gözlemlenmesi dacomitinibin mitokondriyal apoptoz aktivasyonu etkisine işaret etmektedir.
- Dacomitinibin, SKBR3 hücre hattında 24'üncü saatin sonunda zamana-bağlı sitotoksik etkinin en yüksek düzeye ulaştığı belirlenmiştir.
- Dacomitinib ile uyarılan apoptozun AVEN aktivasyonu ile baskılanabildiğine dair bulgular MTT, Annexin V/PI + boyama ve kaspaz aktivite testleri ile edinilebilmiştir. Ancak, AVEN lokalizasyonunun anti-apoptotik yanıt üzerindeki etkisinin olup olmadığı kullanılan tekniklerle analiz edilememiştir.
- AVEN ifadenmesinin; kalıcı olarak artırılması pcDNA3-FLAG-AVEN vektörüyle; % 90 üzerinde bir oranla susturulması ise AVEN siRNA ile mümkündür.
- GFP etiketin AVEN'in hangi terminal ucuna takılacağı önemlidir. AVEN proteinin sinyalizasyonunu üzerinde N-terminal etiketin baskılayıcı etkisi olduğu düşünülebilir. N-terminal kırılmasını kapsayan post-transkripsiyonel düzenlemenin AVEN aktivasyonu için gerekli olduğu ileri sürülen çalışmalarını destekleyici bir kanıt olarak değerlendirilebilir.
- AVEN+ SKBR3 hücre grubunda; MTT testi bulgularına göre dacomitinib uygulamasının 48'inci saatinde gözlemlenen proliferasyon artışı, Annexin V/PI + hücre yüzdesinin ve kaspaz aktivite değerlerinin diğer hücre gruplarına kıyasla düşük olması, AVEN aktivasyonunun hücre bölünmesi süreci ve proliferatif yanıt üzerinde pozitif etkisi ile ilişkilendirilebilir.
- AVEN- SKBR3 hücre grubunda; dacomitinib uygulamasıyla tüm hücre gruplarından daha yüksek düzeyde kaspaz aktivasyonunun indüklenmesi ve Annexin V/PI + hücre yüzdesi gözlemlenmesi AVEN'in anti-apoptotik regülasyonunun ortadan kalkmasıyla bağdaştırılabilir.

Konuyla ilgili yapılan ileri çalışmalarla dacomitinibin HER reseptörlerin tirozin kinaz aktivasyonlarını engelledikten sonra apoptotik yanıtın hangi mekanizmalarla düzenlendiği ve detaylıca anlaşılmaya çalışılmalıdır. AVEN'in mitokondriyal apoptoz

yolağı ile ilişkilerinin desteklenmesi için bu yolağa özđü proteinlerle etkileşimleri incelenmelidir. Hücre içindeki AVEN trafiğinin ileri teknolojik görüntüleme sistemler kullanılarak takibi mümkün olabilir. Böyle bir sistem kullanılarak AVEN lokalizasyonundaki değişim ve hücrenin yanıtı arasında bir ilişki bulunabilir. Tüm bunlara ek olarak gelecekte yapılacak çalışmalarda, araştırılan bu genlere ait RNA'ların ifadenme düzeyleri de araştırılmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annual Review of Biochemistry*, 56, 881–914, 1987.
2. Wang Y., Minoshima S., Shimizu N. Precise mapping of the EGF receptor gene on the human chromosome 7p12 using an improved fish technique. *Jpn. J. Hum. Genet.* 38, 399–406, 1993.
3. Reiter J.L., Threadgill D.W., Eley G.D. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 71, 1–20, 2001.
4. Schechter A.L., Stern D.F., Vaidyanathan L. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 312, 513–516, 1984.
5. Plowman G.D., Whitney G.S., Neubauer M.G. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 87, 4905–4909, 1990.
6. Plowman G.D., Culouscou J.M., Whitney G.S. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 90, 1746–1750, 1993.
7. Kraus M.H., Issing W., Miki T., Popescu N.C., Aaronson S.A., Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*;86:9193-9197, 1989 .
8. Appert-Collin A., Hubert P., Crémel G., Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. *Front. Pharmacol*, 6:283, 2015.
9. Schechter A.L., Hung M.C., Vaidyanathan L., Weinberg R.A., Yang-Feng T.L., Francke U. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 229:976-978, 1985.
10. Coussens L., Yang-Feng T.L., Liao Y.C. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230, 1132–1139, 1985
11. Hubbard S.R. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol.* 71:343–58, 1999.

12. Ogiso H., Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M., Kim J.H. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*. 110:775–87, 2002.
13. Harvey A. Epidermal growth factor receptor family. *Cancer Cell Signalling* (Harvey A) First edition, UK, John Wiley and Sons, Ltd, 1-17, 2013.
14. Weiner D.B., Kokai Y., Wada T. Linkage of tyrosine kinase activity with transforming ability of the p185neu oncoprotein. *Oncogene*, 4, 1175–1183, 1989a.
15. Bargmann C.I., Hung M.C., Weinberg R.A. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*, 319, 226–230, 1986.
16. Bargmann C.I., Hung M.C., Weinberg R.A. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature*, 319, 226–230, 1986.
17. Avraham R., Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:104–17, 2011.
18. Endres N.F., Engel K., Das R., Kovacs E., Kuriyan J. Regulation of the catalytic activity of the EGF receptor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21:777-84, 2011.
19. Lemmon M.A., Schlessinger J., Ferguson K.M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6:a020768, 2014.
20. Shewchuk L.M., Hassell A.M., Ellis B., Holmes W.D., Davis R., Horne E.L. Structure of the Tie2 RTK domain: self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and C-terminal tail. *Structure*. 8:1105–13, 2000.
21. Wybenga-Groot L.E., Baskin B., Ong S.H., Tong J., Pawson T., Sicheri F.. Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell*. 106:745–57, 2001.
22. Huse M., Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*.;109:275–82, 2002.
23. Nolen B., Taylor S., Ghosh G. Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell*. 15:661–75, 2004.
24. Citri A., Skaria K.B., Yarden Y. The deaf and the dumb: The biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 284:54–65, 2003.

25. Boudeau J., Miranda-Saavedra D., Barton G.J., Alessi D.R. Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* 16:443–452, 2006.
26. Shia F., Telescob S.E., Liub Y., Radhakrishnanb R., Lemmona M.A. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *PNAS* 107:7692–7697, 17, 2010.
27. Olayioye M.A., Neve R.M., Lane H.A., Hynes N.E. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer, *The EMBO journal* 19(13), 3159-3167, 2000.
28. Garrett T.P., McKern N.M., Lou M. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11: 495–505, 2003.
29. Jura N., Endres N.F., Engel K., Deindl S., Das R., Lamers M.H. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*. 137:1293–307, 2009.
30. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 103:211–25, 2000.
31. Roberts A.B., Lamb L.C., Newton D.L. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 77, 3494–3498, 1980.
32. Mitsudomi T., Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J*. 277:301–308, 2010.
33. Hynes N.E., Lane H.A. ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews; Cancer*. Vol.5, 2005.
34. Stauber D.J., DiGabriele A.D., Hendrickson W.A. Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;97:49–54, 2000.
35. Ferguson K.M. A structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annual Review of Biophysics*, 37, 353–373, 2008 .
36. Burgess A.W., Cho H.S., Eigenbrot C., Ferguson K.M., Garrett T.P., Leahy D.J. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 12:541–52, 2003.

37. Zhang X., Gureasko J., Shen K., Cole P.A., Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*. 125:1137–49, 2006.
38. Yarden Y., Schlessinger J. Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 26:1443–51, 1987.
39. Honegger A.M., Kris R.M., Ullrich A., Schlessinger J. Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation. *PNAS* 86:925–29, 1989.
40. Du Z., Lovly C.M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*; 17:58, 2018.
41. Pines G., Huang P.H., Zwang Y., White F.M., Yarden Y. EGFRvIV: a previously uncharacterized oncogenic mutant reveals a kinase autoinhibitory mechanism. *Oncogene* 29:5850–60, 2010.
42. Red B.M., Choi S.H., Alvarado D., Moravcevic K., Pozzi A., Lemmon M.A. The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol Cell*. 34:641–51, 2009.
43. Jura N., Shan Y., Cao X., Shaw D.E., Kuriyan J. Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *PNAS* 106:21608–13, 2009
44. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 141:1117–34, 2010.
45. Graus-Porta D., Beerli R.R., Daly J.M., Hynes N.E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*. 16, 1647–1655, 1997.
46. Olayioye M.A. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members, *Breast Cancer Research*, vol. 3, no. 6, pp. 385– 389, 2001.
47. Citri A., Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature ReviewsMolecular Cell Biology*, vol. 7, no. 7, pp. 505–516, 2006.
48. Lill N.L., Sever N.I. Where EGF receptors transmit their signals. *Sci. Signal*. 5, pe41, 2012.

49. Pawson T., Gish G.D., Nash P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.* 11:504–11, 2001.
50. Carpenter G., Cohen S. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *Journal of Cell Physiology*, 88 (2), 227–237, 1976.
51. Wang Y.-N., Hung M.-C. Nuclear function and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell and Bioscience*, 2, 13, 2012.
52. Wang K.H., Kao A.P., Chang C.C. Increasing CD44+/CD24(-) tumor stem cells, and upregulation of COX-2 and HDAC6, as major functions of HER2 in breast tumorigenesis. *Molecular Cancer*, doi: 10.1186/1476-4598-9-288, 2010.
53. Crosetto N., Tikkanen R., Dikic I. Oncogenic breakdowns in endocytic adaptor proteins. *FEBS Lett* 579:3231–3238, 2005.
54. Giebel B., Wodarz A. Tumor suppressors: control of signaling by endocytosis. *Curr Biol* 16:R91-R92, 2006.
55. Le Borgne R. Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr Opin Cell Biol* 18:213–222, 2006.
56. Polo S., Di Fiore P.P. Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell* 124:897–900, 2006.
57. Sorkin A., von Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:600– 614, 2000.
58. Roepstorff K., Grøvdal L., Grandal M., Lerdrup M., van Deurs B. Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer *Histochem Cell Biol.* 129:563–578, 2008.
59. Burden S., Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, 18 (6), 847–855, 1997.
60. Hynes N.E., Stern D.F. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1198 (2-3), 165–168, 1994.
61. Nagane M., Levitzki A., Gazit A. “Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase- 3-like proteases”, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95(10), 5724–5729, 1998.

62. Yu D., Jing T., Liu B. "Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21 Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase", *Mol. Cell* 2(5), 581–591, 1998a.
63. Yu D., Liu B., Jing T. "Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol", *Oncogene* 16(16), 2087–2094, 1998b.
64. Liu B., Fang M., Lu Y. "Fibroblast growth factor and insulinlike growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody", *Oncogene* 20(15), 1913–1922, 2001.
65. Liu B., Fang M., Lu Y. "Involvement of JNK-mediated pathway in EGF-mediated protection against paclitaxel-induced apoptosis in SiHa human cervical cancer cells", *Br. J. Cancer* 85(2), 303–311, 2001.
66. Danielsen A.J., Maihle N.J. The EGF/ErbB Receptor Family and Apoptosis. *Growth Factors*. Vol. 20 (1), pp. 1–15, 2002.
67. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244, 707–712, 1989.
68. Freudenberg J.A., Wang Q., Katsumata M. The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies. *Experimental and Molecular Pathology*, 87 (1), 1–11, 2009.
69. Vaught D.B., Stanford J.C., Young C. HER3 is required for HER2- induced preneoplastic changes to the breast epithelium and tumor formation. *Cancer Research*, 72 (10), 2672–2682, 2012.
70. Kohler M., Janz I., Wintzer H.O. The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance. *Anticancer Research*, 9, 1537–1547, 1989.
71. Arteaga C.L. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *The Oncologist*, 7 (suppl 4), 31–39, 2002.
72. Weiner D.B., Liu J., Cohen J.A. A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature*, 339, 230–231, 1989b.

73. Sordella R., Bell D.W., Haber D.A., Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*, 305, 1163–1167, 2004.
74. Psyrrri A., Yu Z., Weinberger P.M. Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clinical Cancer Research*, 11, 5856–5862, 2005.
75. Lo H.W., Hsu S.C., Ali-Seyed M. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell*, 7, 575–589, 2005.
76. Lo H.W., Xia W., Wei Y. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Research*, 65, 338–348, 2005.
77. Lo H.W., Cao X., Zhu H., Ali-Osman F. Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes. *Molecular Cancer Research*, 8 (2), 232–243, 2010.
78. Hoshino M., Fukui H., Ono Y. Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Pathobiology*, 74, 15–21.37, 2007.
79. Xia W., Wei Y., Du Y. Nuclear expression of epidermal growth factor receptor is a novel prognostic value in patients with ovarian cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 48 (7), 610–617, 2009.
80. Cianchi F., Cortesini C., Fantappie O. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. *American Journal of Pathology*, 162, 793–801, 2003.
81. Vakkala M., Kahlos K., Lakari E. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 6, 2408–2416, 2000.
82. Subbaramaiah K., Morris P.G., Zhou X.K. Increased levels of COX-2 and prostaglandin E2 contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women. *Cancer Discovery*, 2 (4), 356–365, 2012.
83. Karray-Chouayekh S., Trifa F., Khabir A. Methylation status and overexpression of COX-2 in Tunisian patients with ductal invasive breast carcinoma. *Tumour Biology*, 32 (3), 461–468, 2011.

84. Wang Y.-N., Yamaguchi H., Hsu J.-M., Hung M.-C. Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene*, 29 (28), 3997–4006, 2010.
85. Castellani R., Visscher D.W., Wykes S. Interaction of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. An immunohistologic study. *Cancer*, 73 (2), 344–349, 1994
86. Mizukami Y., Nonomura A., Noguchi M. Immunohistochemical study of oncogene product Ras p21, c-myc and growth factor EGF in breast carcinomas. *Anticancer Research*, 11, 1485–1494, 1991.
87. Ishikawa N., Daigo Y., Takano A. Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Research*, 65 (20), 9176–9184, 2005.
88. Harvey A., Burmi R.S. Future therapeutic strategies: Implications for Brk targeting, in *Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities* (eds E. Gunduz and M. Gunde), InTech., 2011.
89. Irie H.Y., Shrestha Y., Selfors L.M. PTK6 regulates IGF-1-induced anchorage-independent survival. *PLoS ONE*, 5 (7), e11729, 2010.
90. Ullrich A., Coussens L., Hayflick J.S., Dull T.J., Gray A., Tam A.W., Lee J., Yarden Y., Libermann T.A., Schlessinger J. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418–425, 1984.
91. King C.R., Kraus M.H., Aaronson S.A. Amplification of a novel v-erbB related gene in a human mammary carcinoma. *Science*, 229, 974–976, 1985.
92. Tzahar E., Waterman H., Chen X., Levkowitz G., Karunakaran D., Lavi S. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16: 5276–5287, 1996.
93. Cho H.S., Mason K., Ramyar K.X., Stanley A.M., Gabelli S.B., Denney Jr. D.W. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421: 756–760, 2003.
94. Sliwkowski M.X. Ready to partner. *Nat Struct Biol* 10: 158–159, 2003.

95. Ross J.S., Fletcher J.A., Linette G.P., Stec J., Clark E., Ayers M. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 8: 307–325, 2003
96. Venter D.J., Tuzi N.L., Kumar S., Gullick W.J. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 2: 69–72, 1987.
97. Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Kurisu W., Thor A., Chen L.C., Smith H.S. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5321–5325, 1992.
98. Lohrisch C., Piccart M. An overview of HER2. *Semin Oncol* 28: 3–11, 2001.
99. Tsuda H., Akiyama F., Terasaki H., Hasegawa T., Kurosumi M., Shimadzu M. Detection of HER-2/neu (c-erbB-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 92: 2965–2974, 2001.
100. Latta E.K., Tjan S., Parkes R.K., O'Malley F.P. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 15: 1318–1325, 2002.
101. Carlsson J., Nordgren H., Sjostrom J., Wester K., Villman K., Bengtsson N.O. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. *Br J Cancer* 90: 2344–2348, 2004.
102. Park K., Han S., Kim H.J., Kim J., Shin E. HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* 48: 702–707, 2006.
103. Gabos Z., Sinha R., Hanson J., Chauhan N., Hugh J., Mackey J.R. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol* 24: 5658–5663, 2006.
104. Karunagaran D., Tzahar E., Beerli R.R., ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 15: 254–264, 1996.

105. Hendriks B.S., Opresko L.K., Wiley H.S., Lauffenburger D. Quantitative analysis of HER2-mediated effects on HER2 and epidermal growthfactor receptor endocytosis: distribution of homo- and heterodimers depends on relative HER2 levels. *J Biol Chem* 278: 23343–23351, 2003.
106. Lenferink A.E., Pinkas-Kramarski R., van de Poll M.L., van Vugt M.J., Klapper L.N., Tzahar E. Differential endocytic routing of homo- and heterodimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 17: 3385–3397, 1998.
107. Waterman H., Sabanai I., Geiger B., Yarden Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem* 273: 13819–13827, 1998.
108. Huang G., Chantry A., Epstein R.J. Overexpression of ErbB2 impairs ligand-dependent downregulation of epidermal growth factor receptors via a post-transcriptional mechanism. *J Cell Biochem* 74: 23–30, 1999.
109. Wang Z., Zhang L., Yeung T.K., Chen X. Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor- ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation. *Mol Biol Cell* 10: 1621–1636, 1999.
110. Hendriks B.S., Wiley H.S., Lauffenburger D. HER2- mediated effects on EGFR endosomal sorting: analysis of biophysical mechanisms. *Biophys J* 85: 2732–2745, 2003.
111. Alimandi M., Romano A., Curia M.C., Muraro R., Fedi P., Aaronson S.A. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10: 1813–1821, 1995.
112. Holbro T., Beerli R.R., Maurer F., Koziczak M., Barbas III C.F., Hynes N.E. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8933–8938, 2003.
113. Moasser M.M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26, 6469–6487, 2007.

114. Wallasch C., Weiss F.U., Niederfellner G., Jallal B., Issing W., Ullrich A. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J* 14: 4267–4275, 1995.
115. Ram T.G., Ethier S.P. Phosphatidylinositol 3-kinase recruitment by p185erbB-2 and erbB-3 is potently induced by neu differentiation factor/herregulin during mitogenesis and is constitutively elevated in growthfactor-independent breast carcinoma cells withc-erbB-2 gene amplification. *Cell Growth Differ* 7: 551–561, 1996.
116. Tokunaga E., Kimura Y., Oki E., Ueda N., Futatsugi M., Mashino K. Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated withpoor prognosis among hormone-treated patients. *Int J Cancer* 118: 284–289, 2006.
117. Kwong K.Y., Hung M.C. A novel splice variant of HER2 withincreased transformation activity. *Mol Carcinog* 23: 62–68, 1998.
118. Siegel P.M., Ryan E.D., Cardiff R.D., Muller W.J. Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J* 18: 2149–2164, 1999.
119. Castiglioni F., Tagliabue E., Campiglio M., Pupa S.M., Balsari A., Menard S. Role of exon-16-deleted HER2 in breast carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 13: 221–232, 2006.
120. Wilson G.R., Cramer A., Welman A., Knox F., Swindell R., Kawakatsu H. Activated c-SRC in ductal carcinoma in situ correlates with high tumour grade, high proliferation and HER2 positivity. *Br J Cancer* 95: 1410–1414, 2006.
121. Vadlamudi R.K., Sahin A.A., Adam L., Wang R.A., Kumar R. Heregulin and HER2 signaling selectively activates c-Src phosphorylation at tyrosine 215. *FEBS Lett* 543: 76–80, 2003.
122. Tan M., Li P., Klos K.S., Lu J., Lan K.H., Nagata Y. ErbB2 promotes Src synthesis and stability: novel mechanisms of Src activation that confer breast cancer metastasis. *Cancer Res* 65: 1858–1867, 2005.

123. Sheffield L.G. C-Src activation by ErbB2 leads to attachment-independent growth of human breast epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 27–31, 1998.
124. Kim H., Chan R., Dankort D.L., Zuo D., Najoukas M., Park M. The c-Src tyrosine kinase associates with the catalytic domain of ErbB-2: implications for ErbB-2 mediated signaling and transformation. *Oncogene* 24: 7599–7607, 2005.
125. Muthuswamy S.K., Li D., Lelievre S., Bissell M.J., Brugge J.S. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol* 3: 785–792, 2001.
126. De Potter C.R., Quatacker J., Maertens G., Van D.S., Pauwels C., Verhofstede C. The subcellular localization of the neu protein in human normal and neoplastic cells. *Int J Cancer* 44: 969–974, 1989.
127. Borg J.P., Marchetto S., Le B.A., Ollendorff V., Jaulin-Bastard F., Saito H. ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat Cell Biol* 2: 407–414, 2000.
128. Shelly M., Mosesson Y., Citri A., Lavi S., Zwang Y., Melamed-Book N. Polar expression of ErbB- 2/HER2 in epithelia. Bimodal regulation by Lin-7. *Dev Cell* 5: 475–486, 2003.
129. Timms J.F., White S.L., O’Hare M.J., Waterfield M.D. Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signalling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene* 21: 6573–6586, 2002.
130. Loden M., Perris F., Nielsen N.H., Emdin S.O., Landberg G. C-erbB2, p27 and G1/S aberrations in human primary breast cancer. *Anticancer Res* 23: 2053–2061, 2003.
131. Yang C., Ionescu-Tiba V., Burns K., Gadd M., Zukerberg L., Louis D.N. The role of the cyclin D1-dependent kinases in ErbB2-mediated breast cancer. *Am J Pathol* 164: 1031–1038, 2004.
132. Ahnstrom M., Nordenskjold B., Rutqvist L.E., Skoog L., Stal O. Role of cyclin D1 in ErbB2-positive breast cancer and tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* 91: 145–151, 2005.

133. Goldhirsch A., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M.J., Herceptin Adjuvant Trial Study, 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial, *Lancet*, 382, 1021-1028, 2013.
134. Konecny G.E., Pegram M.D., Venkatesan N., Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells, *Cancer Res*, 66, 1630-1639, 2006
135. Xia W., Bacus S., Hegde P., Husain I., Strum J., Liu L., Paulazzo G., Lyass L., Trusk P., Hill J., Harris J., Spector N.L. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 7795-7800, 2006.
136. Xia W., Liu Z., Zong R., Truncated ErbB2 expressed in tumor cell nuclei contributes to acquired therapeutic resistance to ErbB2 kinase inhibitors, *Mol Cancer Ther*, 10, 1367-1374, 2011.
137. Sørli T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *European Journal of Cancer*, 40 (18), 2667–2675, 2004.
138. Drebin J.A., Link V.C., Stern D.F. Down-modulation of an oncogene protein product and reversion of the transformed phenotype by monoclonal antibodies. *Cell*, 41, 697–706, 1985.
139. Drebin J.A., Link V.C., Weinberg R.A. ve Greene M.I. Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody reactive with an oncogene-encoded tumor antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 83, 9129–9133, 1986.
140. Zhang H., Berezov A., Wang Q. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 2051– 2058, 2007.
141. Rusnak D.W., Affleck K., Cockerill S.G. The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Research*, 61, 7196–7203, 2001.

142. Arteaga C.L., Engelman J.A., ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics, *Cancer Cell*, 25, 282-303, 2014.
143. Cameron D., Piccart-Gebhart M.L.J., Gelber R.D., Herceptin Adjuvant Trial Study, 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial, *Lancet*, 389, 1195-1205, 2017.
144. Xia W., Petricoin E.F., Zhao S., An heregulin-EGFR-HER3 autocrine signaling axis can mediate acquired lapatinib resistance in HER2+ breast cancer models, *Breast Cancer Res*, 15, R85, 2013.
145. Nahta R., Yu D., Hung M.C., Hortobagyi G.N., Esteva F.J. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer, *Nat Clin Pract Oncol*, 3, 269-280, 2006.
146. Zhu L., Lopez S., Bellone S., Dacomitinib (PF-00299804), a second-generation irreversible pan-erbB receptor tyrosine kinase inhibitor, demonstrates remarkable activity against HER2-amplified uterine serous endometrial cancer in vitro. *Tumor Biol*. DOI 10.1007/s13277-015-3218-4, 2015.
147. Wissner A., Overbeek E., Reich M., Synthesis and structure-activity relationships of 6,7-disubstituted 4-anilinoquinoline-3-carbonitriles. The design of an orally active, irreversible inhibitor of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2). *J Med Chem*. 46:49–63, 2003.
148. Tsou H.R., Overbeek-Klumpers E.G., Hallett W.A., Optimization of 6,7-disubstituted-4-(arylamino)quinoline-3-carbonitriles as orally active, irreversible inhibitors of human epidermal growth factor receptor-2 kinase activity. *J Med Chem*. 48:1107–31, 2005.
149. Kim S.M., Kwon O.J., Hong Y.K., Kim J.H., Solca F., Ha S.J. Activation of IL-6R/JAK1/STAT3 signaling induces de novo resistance to irreversible EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer with T790M resistance mutation. *Mol Cancer Ther*. 11:2254–64, 2012.

150. Pecorelli S., Zigliani L., Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet: Off Organ Int Fed Gynaecol Obstet.* 105:107–8, 2009.
151. Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B., Goldhirsch A., Untch M., Smith I. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 353:1659–72, 2005.
152. Maemondo M., Inoue A., Kobayashi K., Sugawara S., Oizumi S., Isobe H. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 362:2380–8, 2010.
153. Kalous O., Conklin D., Desai A.J., O'Brien N.A., Ginther C., Anderson L. Dacomitinib (PF-00299804), an irreversible Pan-HER inhibitor, inhibits proliferation of HER2-amplified breast cancer cell lines resistant to trastuzumab and lapatinib. *Mol Cancer Ther.* 11: 1978-87, 2012.
154. Engelman J.A., Zejnullahu K., Gale C.M., Lifshits E., Gonzales A.J., Shimamura T. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. *Cancer Res.* 67:11924–32, 2007.
155. Zahonero C., Aguilera P., Castillejo C.R., Pajares M., Bol-os M.V., Cantero D., Nunez A.P., Hernandez-Laín A., Gomez P.S., ve Sepulveda J.M. Preclinical test of dacomitinib, an irreversible EGFR inhibitor, confirms its effectiveness for glioblastoma. *Mol Cancer Ther.*, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0736, 2015.
156. Gonzales A.J., Hook K.E., Althaus I.W., Ellis P.A., Trachet E., Delaney A.M. Antitumor activity and pharmacokinetic properties of PF-00299804, a second-generation irreversible pan-erbB receptor tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 7:1880-9, 2008.
157. Williams J.P., Kim I., Ito E., Shi W., Yue S., Siu L.L., Waldron J., O'Sullivan B., Yip K.W., Liu F. Pre-Clinical characterization of dacomitinib (PF-00299804), an irreversible Pan-ErbB inhibitor, combined with Ionizing radiation for head and neck squamous cell carcinoma. *PLOS ONE.* Vol. 9, Issue 5, e98557, 2014.

158. Ather F., Hamidi H., Fejzo M.S., Letrent S., Finn R.S. Dacomitinib, an irreversible Pan-ErbB inhibitor significantly abrogates growth in head and neck cancer models that exhibit low response to cetuximab. *PLoS One* 8: e56112, 2013.
159. Ou S.H. Second-generation irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs): A better mousetrap? A review of the clinical evidence. *Crit Rev Oncol Hematol* 83: 407–421, 2012.
160. Janne P.A., Boss D.S., Camidge D.R., Britten C.D., Engelman J.A. Phase I dose-escalation study of the pan-HER inhibitor, PF299804, in patients with advanced malignant solid tumors. *Clin Cancer Res* 17: 1131–1139, 2011.
161. Janne P.A., Ou S.H., Kim D.W., Oxnard G.R., Martins R., Kris M.G. Dacomitinib as first-line treatment in patients with clinically or molecularly selected advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, openlabel, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15:1433–41, 2014.
162. Conrad M., Angeli J.P., Vandenabeele P. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 15:348–66, 2016.
163. Weinlich R., Oberst A., Beere H.M. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18:127–36, 2017.
164. Fuchs Y., Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 16:329–44, 2015.
165. Pasparakis M., Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature.* 517:311–20, 2015.
166. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* 25:486–541, 2018.
167. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Kepp O. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 73:2405–10, 2016.
168. Fadeel B., Gleiss B., Hogstrand K. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma

- membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 504-511, 1999.
169. Saraste A., Pulkki K. Morphologic, biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 3: 528-537, 2003.
 170. Galluzzi L., Maiuri M.C., Vitale I. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 14:1237–43, 2007.
 171. Galluzzi L., Aaronson S.A., Abrams J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 16:1093–107, 2009.
 172. Galluzzi L., Kepp O., Trojel-Hansen C. Non-apoptotic functions of apoptosisregulatory proteins. *EMBO Rep.* 13:322–30, 2012.
 173. Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19:107–20, 2012.
 174. Galluzzi L. Bravo-San Pedro J.M., Vitale I. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 22:58–73, 2015.
 175. Schweichel J.U., Merker H.J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 7:253–66, 1973.
 176. Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 12(Suppl 2):1463–67, 2005.
 177. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16:3–11, 2009.
 178. Green D.R., Oguin T.H., Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ.* 23:915–26, 2016.
 179. Green,D.R., Reed,J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309–1312, 1998.
 180. del Peso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R. and Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 278, 687–689, 1997.

181. Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S. and Reed J.C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282, 1318–1321, 1998.
182. Daugas E., Susin S.A., Zamzami N. Mitochondria-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14(5):729-739, 2000.
183. Chipuk J.E., Moldoveanu T., Llambi F. The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* 37, 299– 310, 2010.
184. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 13, 1899–1911, 1999.
185. Shamas-Din A., Brahmabhatt H., Leber B. BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 508–520, 2011.
186. Tait S.W., Green D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:621–32, 2010.
187. Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. *Microb Cell.* 3:101–08, 2016.
188. Moldoveanu T., Follis A.V., Kriwacki R.W., Green D.R. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends in Biochemical Sciences* March 2014, Vol. 39, No. 3, 2014.
189. Youle R.J., Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47–59, 2008.
190. Mund T., Gewies A., Schoenfeld N., Bauer M.K., Grimm S. Spike. A novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J* 17:696-698, 2003.
191. Kim H., Rafiuddin-Shah M., Tu H.C. Hierarchical regulation of mitochondriondependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol.* 8:1348–58, 2006.
192. Kim H., Tu H.C., Ren D. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 36:487–99, 2009.
193. Chen H.C., Kanai M., Inoue-Yamauchi A. An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nat Cell Biol* 17:1270–81, 2015.

194. Dai H., Smith A., Meng X.W. Transient binding of an activator BH3 domain to the BAK BH3-binding groove initiates BAK oligomerization. *J Cell Biol.* 194:39–48, 2011.
195. Gavathiotis E., Reyna D.E., Davis M.L. BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Mol Cell.* 40:481–92, 2010.
196. Gavathiotis E., Suzuki M., Davis M.L. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature.* 455:1076–81, 2008.
197. Wei M.C., Zong W.X., Cheng E.H. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 292:727–30, 2001.
198. Suzuki M., Youle R.J., Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–654. 2000.
199. Petros A.M., Olejniczak E.T., Fesik S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 83–94, 2004.
200. Muchmore, S.W., Sattler M., Liang H. X-ray and NMR structure of human BclxL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335–341, 1996.
201. Chou J.J., Li H., Salvesen G.S. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell* 96, 615–624, 1999.
202. Griffiths G.J., Dubrez L., Morgan C.P. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein BAK in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.* 144, 903–914, 1999.
203. Chipuk J.E., Green D.R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.* 18, 157–164, 2008.
204. Lessene G., Czabotar P.E., Colman P.M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 989–1000, 2008.
205. Ichim G., Tait S.W.G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature reviews, Cancer*, Vol. 16, 539-548, 2016.
206. Cheng E.H., Sheiko T.V., Fisher J.K. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science.* 301:513–17, 2003.

207. Cheng Q.C., Tikhomirov O., Zhou W., Carpenter G. Ectodomain cleavage of ErbB-4: characterization of the cleavage site and m80 fragment. *J. Biol. Chem.* 278:38421–27, 2003.
208. Lazarou M., Stojanovski D., Frazier A.E., Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor. *J Biol Chem.* 285:36876–883, 2010.
209. Naghdi S., Várnai P., Hajnóczky G. Motifs of VDAC2 required for mitochondrial Bak import and tBid-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:E5590–99, 2015.
210. Ma S.B., Nguyen T.N., Tan I. Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. *Cell Death Differ.* 21:1925–35, 2014.
211. Garner T.P., Reyna D.E., Priyadarshi A. An autoinhibited dimeric form of BAX regulates the BAX activation pathway. *Mol Cell.* 63: 485–97, 2016.
212. Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Chipuk J.E. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell.* 17:525–35, 2005.
213. Chen L., Willis S.N., Wei A. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17:393–403, 2005.
214. Letai A., Bassik M.C., Walensky L.D. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2:183–92, 2002.
215. Alsop A.E., Fennell S.C., Bartolo R.C. Dissociation of BAK alpha1 helix from the core and latch domains is required for apoptosis. *Nat Commun* 6:6841, 2015.
216. Brouwer J.M., Westphal D., Dewson G. Bak core and latch domains separate during activation, and freed core domains form symmetric homodimers. *Mol Cell* 55:938–46, 2014.

217. Czabotar P.E., Westphal D., Dewson G. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell*. 152:519–31, 2013.
218. Subburaj Y., Cosentino K., Axmann M. Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nat Commun*. 6:8042, 2015.
219. Zhang Z., Subramaniam S., Kale J. BH3-in-groove dimerization initiates and helix 9 dimerization expands Bax pore assembly in membranes. *EMBO J*. 35:208–36, 2016.
220. Ma S., Hockings C., Anwari K. Assembly of the Bak apoptotic pore: a critical role for the Bak protein alpha6 helix in the multimerization of homodimers during apoptosis. *J Biol Chem*. 288:26027–38, 2013.
221. Dewson G., Ma S., Frederick P. Bax dimerizes via a symmetric BH3:Groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ*. 19:661–70, 2012.
222. Oh K.J., Singh P., Lee K. Conformational changes in BAK, a pore-forming proapoptotic BCL-2 family member, upon membrane insertion and direct evidence for the existence of BH3-BH3 contact interface in BAK homooligomers. *J Biol Chem*. 285:28924–37, 2010.
223. Bleicken S., Jeschke G., Stegmüller C. Structural model of active BAX at the membrane. *Mol Cell* 56:496–05, 2014.
224. Salvador-Gallego R., Mund M., Cosentino K. BAX assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *EMBO J*. 35:389–401, 2016.
225. Grosse L., Wurm C.A., Brüser C. Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *EMBO J*. 35:402–13, 2016.
226. Aluvila S., Mandal T., Hustedt E. Organization of the mitochondrial apoptotic BAK pore: oligomerization of the BAK homodimers. *J Biol Chem* 289:2537–51, 2014.
227. Gillies L.A., Du H., Peters B. Visual and functional demonstration of growing Bax-induced pores in mitochondrial outer membranes. *Mol Biol Cell*. 26:339–49, 2015.

228. Tait S.W., Green D.R. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5:a008706, 2013.
229. Delbridge A.R., Grabow S., Strasser A. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* 16:99–109, 2016.
230. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91:479–89, 1997.
231. Li Y., Zhou M., Hu Q. Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114:1542–47, 2017.
232. Liu X., Kim C.N., Yang J. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86:147–57, 1996.
233. Hu Q., Wu D., Chen W. Molecular determinants of caspase-9 activation by the Apaf-1 apoptosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:16254–61, 2014.
234. Wu C.C., Lee S., Malladi S. The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. *Nat Commun.* 7:13565, 2016.
235. Riedl S.J., Salvesen G.S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:405–13, 2007.
236. Julien O., Wells J.A. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 24:1380–89, 2017.
237. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 22:526–39, 2015.
238. Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102:43–53, 2000.
239. Du C., Fang M., Li Y. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102:33–42, 2000.
240. Salvesen G.S., Duckett C.S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:401–10, 2002.

241. Nunnari J., Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 148:1145–59, 2012.
242. Zamzami N., Marchetti P., Castedo M. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med*. 181:1661–72, 1995.
243. Zamzami N., Marchetti P., Castedo M. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med*. 182:367–77, 1995.
244. Schmidt O., Pfanner N., Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:655–67, 2010.
245. Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. BCL-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre- B cells. *Nature*, 335, 440–442, 1988.
246. McDonnell T.J., Deane N., Platt F.M., Nunez G., Jaeger U., McKearn J.P., Korsmeyer S.J. BCL-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, 57, 79–88, 1989.
247. Hockenbery D., Nunez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer, S.J. BCL-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348, 334–336, 1990
248. Strasser A., Harris A.W., Bath M.L., Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*, 348, 331–333, 1990.
249. Reed, J.C. BCL-2 family proteins. *Oncogene*, 17, 3225–3236, 1998.
250. Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y., Li Y., Sawai H., Reed J.C., Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, 275, 967–969, 1997.
251. Meijerink J.P., Mensink E.J., Wang K., Sedlak T.W., Sloetjes A.W., de Witte T., Waksman G., Korsmeyer S.J. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood*, 91, 2991–2997, 1998.

252. Wallace-Brodeur R.R., Lowe S.W. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol. Life Sci.*, 55, 64–75, 1999.
253. Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A., Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, 352, 345–347, 1991.
254. Lowe S.W., Schmitt E.M., Smith S.W., Osborne B.A., Jacks, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362, 847–849, 1993.
255. Clarke A.R., Purdie C.A., Harrison D.J., Morris R.G., Bird C.C., Hooper M.L. and Wyllie A.H. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, 362, 849–852, 1993.
256. Hawley R.G., Chen Y., Riz I. An integrated bioinformatics and computational biology approach identifies new BH3-only protein candidates. *Open Biol J* 5: 6–16, 2012.
257. Baranski Z., Booiij T.H., Cleton-Jansen A.M. Aven-mediated checkpoint kinase control regulates proliferation and resistance to chemotherapy in conventional osteosarcoma. *J Pathol* 236: 348–359, 2015.
258. Chau B.N., Cheng E.H., Kerr D.A. Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1. *Mol Cell* 6: 31–40, 2000.
259. Melzer I.M., Fernandez S.B.M., Bosser S., Lohrig K. The Apaf-1-binding protein Aven is cleaved by Cathepsin D to unleash its anti-apoptotic potential. *Cell Death and Differentiation* .19, 1435–1445, 2012.
260. Han K.Y., Hwang J.W., Bae G.U. Akt regulation of Aven contributes to the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS* 11: 3866-3871, 2015.
261. Zou H., Li Y., Liu X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549–11556, 1999.
262. Heiden V.M.G., Chandel N.S., Li X.X. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4666–4671, 2000.

263. Paydas S., Tanriverdi K., Yavuz S., Disel U., Sahin B., Burgut R. Survivin and aven: two distinct anti-apoptotic signals in acute leukemias. *Ann Oncol* 14:1045–50, 2003.
264. Choi J., Hwang Y.K., Sung K.W. Aven overexpression: association with poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 30: 1019–1025, 2006.
265. Eissmann M., Melzer I.M., Fernandez S.B., Overexpression of the anti-apoptotic protein AVEN contributes to increased malignancy in hematopoietic neoplasms. *Oncogene* 32: 2586–2591, 2013.
266. Kutuk O, Letai A. ; Displacement of Bim by Bmf and Puma rather than increase in Bim level mediates paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells.. *Cell Death Differ.*, (17):1624-1635, 2010.
267. Figueroa B.Jr., Chen S., Oyler G.A., Aven and Bcl-xL enhance protection against apoptosis for mammalian cells exposed to various culture conditions. *Biotechnol Bioeng* 85: 589–600, 2004.
268. Esmaili A.M., Johnson E.L., Thaivalappil S.S., Regulation of the ATM-activator protein Aven by CRM1-dependent nuclear export. *Cell Cycle* 9:19, 3913-3920, 2010.
269. Gross A. A new Aven-ue to DNA-damage checkpoints. *Trends in Biochemical Sciences* Vol.33 No.11, 2008.
270. Guo J.Y., Yamada A., Kajino T., Wu J.Q., Tang W., Freel C.D., Feng J. Aven-Dependent Activation of ATM Following DNA Damage *Current Biology*. 18, 933–942, 2008.
271. Kastan M.B., Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316–323, 2004.
272. Kamer I., Sarig R., Zaltsman Y. Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA damage response. *Cell* 122, 593–603, 2005.
273. Zermati Y., Mouhamad S., Stergiou L. Nonapoptotic role for Apaf-1 in the DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* 28, 624–637, 2007.
274. Zinkel S.S., Hurov K.E., Ong C. A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell* 122, 579–591, 2005.

275. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* 237, 1555–1562, 1962.
276. Carpenter G., King L., Jr., Cohen S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature*, 276, 409–410, 1978.
277. Ushiro H., Cohen S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J. Biol. Chem.* 255, 8363–8365, 1980.
278. Riese D.J., Stern D.F. Specificity within the EGF family/ ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 20, 41–48, 1998.
279. Carpenter G. “The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling”, *Bioessays* 22(8), 697–707, 2000.
280. Yarden Y., Sliwkowski M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137, 2001.
281. Bogdan S., Klambt C. “Epidermal growth factor receptor signaling”, *Curr. Biol.* 11(8), R292–R295, 2001.
282. Velu T.J., Beguinot L., Vass W.C., Willingham M.C., Merlino G.T., Pastan I., Lowy D.R. Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. *Science* 238, 1408–1410, 1987.
283. Cadena D.L., Kurten R.C., Gill G.N. The product of the MLD gene is a member of the membrane fatty acid desaturase family: overexpression of MLD inhibits EGF receptor biosynthesis. *Biochemistry.* 36(23):6960-7, 1997.
284. Pines G., Kostler W.J., Yarden Y. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett.* 584, 2699–2706, 2010.
285. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A. Jr Kinzler K.W. Cancer genome landscapes. *Science.* 339:1546–58, 2013.
286. Karakas B, Ozmay Y., Basaga H., Distinct apoptotic blocks mediate resistance to panHER inhibitors in HER2+ breast cancer cells. *Molecular Cell Research.* S0167-4889(18)30085-5. 2018.

287. Martin A.P., Miller A., Emad L., Lapatinib resistance in HCT116 cells is mediated by elevated MCL-1 expression and decreased BAK activation and not by ERBB receptor kinase mutation, *Mol Pharmacol*, 74, 807-822, 2008.
288. Masoud V, Pagès G. Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World J Clin Oncol* DOI: 10.5306/wjco.v8.i2.120 10; 8(2): 120-134, 2017.
289. Moasser MM., The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, 6469–6487, 2007.
290. Swain SM, Baselga J, Kim SB. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 724-734 [PMID: 25693012 DOI: 10.1056/NEJMoa1413513]
291. Maximiano S, Magalhães P, Guerreiro MP., Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs* ; 30: 75-86 [PMID: 26892619 DOI: 10.1007/s40259-016-0162-9], 2016.
292. Yamamoto-Ibusuki M, Arnedos M, André F. Targeted therapies for ER+/HER2- metastatic breast cancer. *BMC Med* 2015; 13: 137 [PMID: 26059247 DOI: 10.1186/s12916-015-0369-5]
293. Ma J, Lyu H, Huang J., Targeting of erbB3 receptor to overcome resistance in cancer treatment. *Mol Cancer*, 13: 105 [PMID: 24886126 DOI: 10.1186/1476-4598-13-105], 2014.
294. Giuliano M, Hu H, Wang YC. Upregulation of ER Signaling as an Adaptive Mechanism of Cell Survival in HER2-Positive Breast Tumors Treated with Anti-HER2 Therapy. *Clin Cancer Res*; 21: 3995-4003 [PMID: 26015514 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2728], 2015.
295. Garrett J.T., Olivares M.G., Rinehart C. Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5021-5026, 2011.



8. EKLER

Ek A: CoLocalizer Pro analiz sonuçları

a. **Colocalization Report**

Creator: CoLocalizer Pro 3.0.2

Date: 2018-06-17 20:26:57:297 +0300

Specimen ID: skbr3 aven cnt 1_2

Pixel Information				
	Image ROI		Scattergram ROI	
	Count	%	Count	%
Green	213001	20.31	--	--
Blue	43492	4.15	--	--
Cyan	119727	11.42	--	--
Total	376220	35.88	--	--

Coefficients Calculations - Current Image ROI	
Rr	0.1431
R	0.3025
k1	1.5631
k2	0.0585
m1	1.9281
m2	0.2450

b.

Colocalization Report

Creator: CoLocalizer Pro 3.0.2

Date: 2018-06-17 20:39:11:482 +0300

Specimen ID: skbr3 aven 4h 5

Pixel Information				
	Image ROI		Scattergram ROI	
	Count	%	Count	%
Green	244824	23.35	--	--
Blue	11627	1.11	--	--
Cyan	54079	5.16	--	--
Total	310530	29.61	--	--

Coefficients Calculations - Current Image ROI	
Rr	0.2143
R	0.3599
k1	1.0260
k2	0.1262
m1	0.9791
m2	0.2761

c.

Colocalization Report

Creator: CoLocalizer Pro 3.0.2

Date: 2018-06-17 20:33:01:718 +0300

Specimen ID: skbr3 aven 8h 5

Pixel Information				
	Image ROI		Scattergram ROI	
	Count	%	Count	%
Green	183938	17.54	--	--
Blue	126386	12.05	--	--
Cyan	171638	16.37	--	--
Total	481962	45.96	--	--

Coefficients Calculations - Current Image ROI	
Rr	0.1098
R	0.3508
k1	0.7406
k2	0.1662
m1	0.9242
m2	0.4507

d.

Colocalization Report

Creator: CoLocalizer Pro 3.0.2

Date: 2018-06-17 20:27:44:997 +0300

Specimen ID: skbr3 aven 16h 6

Pixel Information				
	Image ROI		Scattergram ROI	
	Count	%	Count	%
Green	75897	7.24	--	--
Blue	343864	32.79	--	--
Cyan	428342	40.85	--	--
Total	848103	80.88	--	--

Coefficients Calculations - Current Image ROI	
Rr	0.2692
R	0.4567
k1	1.4965
k2	0.1394
m1	1.9014
m2	0.3798

e.

Colocalization Report

Creator: CoLocalizer Pro 3.0.2

Date: 2018-06-17 19:43:33:971 +0300

Specimen ID: skbr3 aven 24h 5

Pixel Information				
	Image ROI		Scattergram ROI	
	Count	%	Count	%
Green	139193	13.27	--	--
Blue	299550	28.57	--	--
Cyan	107270	10.23	--	--
Total	546013	52.07	--	--

Coefficients Calculations - Current Image ROI	
Rr	0.1524
R	0.2281
k1	0.6894
k2	0.0755
m1	0.7277
m2	0.4273

f.

Colocalization Report

Creator: CoLocalizer Pro 3.0.2

Date: 2018-06-17 19:42:38:548 +0300

Specimen ID: skbr3 aven 48h 4

Pixel Information				
	Image ROI		Scattergram ROI	
	Count	%	Count	%
Green	65573	6.25	--	--
Blue	367250	35.02	--	--
Cyan	228940	21.83	--	--
Total	661763	63.11	--	--

Coefficients Calculations - Current Image ROI	
Rr	0.1556
R	0.2922
k1	1.5109
k2	0.0565
m1	2.5114
m2	0.2085