ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

BETA ARRESTİN PROTEİNLERİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNİN REGÜLASYONUNA ETKİLERİ

Saber Yari Bostanabad

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Hakan Gürdal

Aralık

2020

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etikilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Saber Yari Bostanabad

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Hakan Gürdal danışmanlığında Saber Yari Bostanabad tarafından hazırlanan bu çalışma ../11/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Işık YULUĞ İmza:

Üye: Prof. Dr. Hakan GÜRDAL İmza:

Üye: Doç.Dr. Arzu ATALAY İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU İmza:

Üye: Doç.Dr. H.İLKE ÖNEN İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Beta Arrestin Proteinlerinin Meme Kanseri Hücrelerinin Regülasyonuna Etkileri

Saber Yari Bostanabad

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Hakan Gürdal

Beta Arrestinler (βArrs) 1 ve 2 proteinleri, hücre içi sinyal düzenleyici proteinlerdirler. Ifade seviyeleri kanser türlerine göre değişiklik gösterir. Kanser hücresi regülasyonunda farklı GPkR sinyallerinin çeşitliliği göz önüne alındığında, βArrs'lerin kanser araştırmalarındaki rolü ile ilgili çelişkili sonuçlar kaçınılmazdır. Bu çalışmada Üçlü negatif meme kanser hücrelerin davaranışlarını GPkR sinyal yolağı yerine, βArrs'lerin ifade seviyelerini değiştirerek hücresel fonksiyon ve gen ifade profilleri üzerinde etkileri incelenmiştir. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde proliferasyon, invazyon ve hücre döngüsünü incelemeden önce βArrs 1 veya 2 proteinlerin ifade seviyeleri özgül siRNA veya cDNA'larıila transfekte edilmesiyle değiştirildi. Bu değişikliklerin sonunda farklı ifade olan genleri ve proteinleri tanımlamak ve moleküler mekanizmalarını daha iyi anlamak için mikroarray analizi, qRT-PCR ve Western blot analizi yapıldı. βArrs1 veya 2 proteinlerin ifadesinin azaltılması, hücre proliferasyonu ve invazyonunun artırma eğilimindeyken, bu proteinlerin ekspresyon seviyelerinin artırılması onları inhibe etmektedir. βArrs'lerin aşırı ifade edilmesi, hücre döngüsünün S fazını ve hücre döngüsü genleri, CDC45, BUB1, CCND1, CCND2, CDKN2C'nin diferansiyel ekspresyonuna neden oldu. Ayrıca HER3, IGF-1R ve Snail'de azalmaya neden oldu. Bu bulgular, βArrs1 veya 2'nin, üçlü negatıf meme kanserlerinde hücre döngüsü genleri ve HER3, IGF-1R ve Snail üzerindeki etkileri yoluyla hücre döngüsü ve antikanser sinyal yolaklarında önemli ölçüde yer aldığını gösterir.

2020, 144 sayfa

Anahtar kelimeler: Beta Arrestin, Üçlü Negatif Meme Kanser; GPkR; Hücre dongüsü.

ABSTRACT

PhD Thesis

'The Effects Of Beta-Arrestin Proteins On The Regulation Of Triple Negatif Breast Cancer Cells'

Saber Yari Bostanabad

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Hakan Gürdal

Beta Arrestins (βArrs) 1 and 2 are intracellular signal regulating proteins. Their expression level varies in some cancers. Given the diversity of different GPCR signals in cancer cell regulation, contradictory results are inevitable regarding the role of βArrs in cancer research. Instead of determining their significance in cancer cell behavior through GPCR signalling, we examine here their direct influence on cellular function and gene expression profiles by changing their expression levels in breast cancer cells. The expression levels of βArr1 or βArr2 were changed in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. The expression level of βArrs was changed by transfecting their specific siRNA or cDNA into TNBCs. Cell proliferation, invasion, and cell cycle were measured. To better understand the molecular mechanisms, microarray analysis, qRT-PCR, and Western blot analysis were performed to identify differentially expressed genes and proteins. Reducing expression of βArr1 or βArr2 tended to increase cell proliferation and invasion whereas increasing their expression levels inhibited them. The overexpression of βArrs caused cell cycle S-phase arrest and differential expression of cell cycle genes, CDC45, BUB1, CCNB1, CCNB2, CDKN2C. It also reduced HER3, IGF-1R, and Snail. These findings indicate that βArr1 and βArr2 are significantly involved in cell cycle and anticancer signalling pathways through their influence on cell cycle genes and HER3, IGF-1R, and Snail in TNBCs.

2020, 144 pages

Keywords: Beta Arrestin; Triple Negatif Braest Cancer(TNBCs); GPCR; Cell cycle.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmanın gerçekleşmesi için her türlü imkani sağlayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hakan Gürdal'a en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince emeği geçen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünün saygıdeğer öğretim üyeleri, hocalarım ve tüm çalışanlarınnan içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam suresinde bulunduğum ve tecrübelerinden yararlanma fırsatına sahip olduğum Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet Melli, Prof. Dr. Hasan Ongun Onaran, Prof. Dr. Emine Demirel Yılmaz, Prof. Dr. Özlem Uğur, Prof. Dr. Hakan Ergün, Dr. Suzan Usanmaz'a içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma sürecindeki bilimsel katkı ve destekleri ile çalışmanın başından son noktasına kader tüm aşamalarında bire bir yanımızda olan Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu ve çalışma arkadaşım Dr. Senem Noyan'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışma süresince güleryüz ve özveri ile her kunuda yardımda bulunan ve yol gösteren ve farklı alanlarda ufkumu genişleten değerli hocam Prof. Dr. Eyüp Akarsu'ya içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecinde laboratuvarında çalışma şansı bulduğum ve bilimsel olarak her türlü katkıları için Prof. Dr. Fikret Şahin hocama ve laboratuvar ekibine, özellikle Dr. Buse Türegün Atasoy'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Birlikte çalışma fırsatı bulduğum''bench'' arkadaşlarıma; Başak Dalkılıç, Dr. Matilda Merve Tuğlu, Dr. Sefa Metin, Dr. Ahmet Birkut Arslan ve Vedia Deletioğlu'ya ve asistan oda arkadaşlarım; manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Doktora eğitimi boyunca desteklerini esirgemeyen ve hayatımın her anında varlıklarını yanımda hissettiğim ve her konuda dağ gibi arkamda olan ve yol göstererek düşüncelerime yön veren kocaman aileme içten teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, bu tez çalışmasını dünyada en değerli varlığım olan Anne ve Babama saygı ve sevgi ile ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... **İ**

ONAY ..... **İİ**

ÖZET ..... **İİİ**

ABSTRACT ..... **İV**

TEŞEKKÜR ..... **V**

İÇİNDEKİLER ..... **Vİ**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **Xİİ**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **XV**

SİMGELER DİZİNİ ..... **XVİ**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER **2**

2.1. MEMENİN ANATOMİSİ **2**

2.2. MEME KANSERİNİN TANIMI **3**

2.3. MEME KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ **4**

2.3.1. CİNSİYET 4

2.3.2. YAŞ 5

2.3.3. ETNİK KÖKEN 5

2.3.4. AİLE ÖYKÜSÜ 5

2.3.5. ÇEVRESEL FAKTÖRLER VE YAŞAM TARZI 6

2.3.5.1. Obezite 6

2.3.5.2. Fiziksel Aktivite 6

2.3.5.3. Radyasyon 6
2.3.6. GENETİK FAKTÖRLER 6
2.4. MEME KANSERİ ALT TİPLERİ VE SINIFLANDIRILMASI 7
2.4.1. HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRILMA 7
2.4.1.1. Karsinoma İn Situ 7
Duktal karsinoma in situ (DCIS): 7
2.4.1.2. İnvaziv Karsinoma 8
2.4.2. MOLEKÜLER ALT TİPLER 8
2.5. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERLERİ 9
2.5.1. ÜÇLÜ-NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MODELLERİ 11
2.5.2. HÜCRE HATLARI VE ÖZELLİKLERİ 13
2.6. ARRESTİN PROTEİNLERİ 14
2.6.1. ARREsTİN TİPLERİ 15
2.6.2. BETA ARRESTİN PROTEİNLERİ 16
2.6.3. BETA ARRESTİNLER VE G PROTEİN-KENETLİ RESEPTÖR REGÜLASYONU 18
2.6.4. KLASİK SİNYAL YOLAKLARI 18
2.6.5. RESEPTÖR İNTERNALİZASYONU 19
2.6.6. KLASİK OLMAYAN SİNYAL YOLLARI 19
2.7. KANSERLERDE BETA ARRESTİNLERİN ROLÜ 21
2.8. BETA ARRESTİNLER VE MEME KANSERİ 23
2.8.1. MEME KANSERİNDE BETA ARRESTİN SEVİYELERİ 23
2.9. BETA ARRESTİN VE PROLİFERASYON 25
2.10. BETA ARRESTİNLER VE APOPTOSİS 26
2.11. BETA ARRESTİN PROTEİLERİ VE İNVASYON, MİGRATİON 27

2.12. BETA ARRESTİN VE HÜCRE DÖNGÜSÜ 28

3. GEREKÇE VE AMAÇ 30

4. MATERYAL VE YÖNTEM 31

4.1. MATERYAL 31

4.2. YÖNTEM 36

4.2.1. HÜCRE HATLARI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ 36

4.2.2. SİRNA TRANSFEKSİYONU VE KULLANILAN AJANLAR 36

4.2.3. BETA ARRESTİN1 VE 2 PROTEİNLERİNİN HÜCRE İÇİ İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI 37

4.2.4. BETA ARRESTİN1 VE 2 PROTEİNLERİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE MİKTAR SAPTANMASI 39

4.2.4.1. Protein İzolasyonu Ve Lizatının Hazırlanması 40

4.2.4.2. Protein Ölçümü Ve Örneklerin Yürütülmesi 40

4.2.4.3. SDS-PAGE Jel Kalıbının Oluşturulması; 41

4.2.4.4. Transfer Düzenekleri 42

4.2.4.5. Bloklama ve Antikor Uygulama 43

4.2.4.6. Görüntüleme İşlemi 43

4.2.4.7. Protein Ekspresyonlarının Normalizasyonu Ve Dansitometrik Analizi 44

4.2.5. XCELLIGENCE SİSTEMİ İLE PROLİFERASYON, VE MOTİLİTE ÖLÇÜMÜ 45

4.3. AKIŞ SİTOMETRİ İLE HÜCRE DÖNGÜSÜ VE APOPTOZ İNCELENMESİ 46

4.3.1. APOPTOZ VE NEKROZ ANALİZİ 46

4.3.2. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ 47

4.3.3. MİKRODİZİN TESTİ İLE SİRNA IFADELERİNİN DÜZEY İNCELENMESİ 47

4.3.4. RNA KALİTE KONTRULU 48

4.3.5. MİKRODİZİN ANALİZİ 48
4.3.6. MİKRODİZİN VERİ ANALİZİ 48
4.3.7. EŞ ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR) 49
4.3.8. RNA EKSTRAKSİYONU; MİKTAR VE KALİTE KONTROLÜ 49
4.3.9. CDNA SENTEZİ 49
4.3.10. SYBR GREEN İLE EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PCR REAKSİYONU 50
4.3.10.1. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Analizi 51
4.3.10.2. Veri Analizi 51
4.4. BİYOİNFORMATİK ANALİZ 51
4.4.1. TCGA VERİ ANALİZİ 51
4.4.2. HEDEF GENLERİN YOLAK ANALİZİ 51
4.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ 52
5. BULGULAR 53
5.1. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2'NİN SİRNA İLE SUSTURULMASI VE HÜCRE PROLİFERASYONU ÖLÇÜMÜ 53
5.1.1. MDA-MB-231 VE MDA-MB-468 HÜCRELERİNDE BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİNİN SİRNA İLE SUSTURULMASI 53
5.1.2. XCELLİGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ (RTCA) SİSTEMİ İLE SUSTURULMUŞ HÜCRELERDE PROLİFERASYON İNCELENMESİ 54
5.2. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2'NİN AŞIRI İFADESİ VE HÜCRE PROLİFERASYONU ÖLÇÜMÜ 56
5.2.1. MDA-MB-231 VE MDA-MB-468 HÜCRELERİNDE BETA ARRESTİN 1 VEYA 2 PROTEİNLERİNİN AŞIRI İFADESİ VE HÜCRE PROLİFERASYONU 56
5.2.2. XCELLİGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ (RTCA) SİSTEMİ İLE PROLİFERASYON SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ 57

5.3. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2'NİN İFADELERİNİN SUSTURULMASI VE HÜCRE İNVAZYONU ÖLÇÜMÜ 61

5.4. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİN AŞIRI İFADESİ VE HÜCRE İNVAZYONU ÖLÇÜMÜ 63

5.5. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİ AŞIRI İFADE EDİLMİŞ MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE İNVAZYON İLE İLGİLİ ÖNEMLİ GENLERİN MRNA DEĞERLERİNİN QRT-PCR YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ 64

5.6. MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE İNVAZYON İLE İLGİLİ GENLERİN PROTEİN DÜZELERİNİN WESTERN BLOT İLE İNCELENMESİ 65

5.7. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİ AŞIRI İFADE EDİLMİŞ MDA-MB-468 HÜCRELERİNDE İNVAZYON İLE İLGİLİ ÖNEMLİ GENLERİN MRNA DEĞERLERİNİN QRT-PCR YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ 68

5.8. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 AŞIRI İFADE EDİLMİŞ MDA-MB-468 HÜCRELERİNDE İNVAZYON İLE İLGİLİ PROTEİNLERİN DÜZEYLERİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ 69

5.9. MİKRODİZİN ANALİZİ 71

5.9.1. MİKRODİZİN VERİLERİNİN ANALİZİ SONUCUNDA FARKLILIK GÖSTEREN GENLERLE YAPILAN YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZİ 72

5.9.2. MİKRODİZİN'DEN ELDE EDİLEN HÜCRE DÖNGÜSÜ İLE İLGİLİ FARKLI İFADE GÖSTEREN GENLER İÇİN HİYERARŞİK SINIFLANDIRMA 'HIERARCHICAL CLUSTERING' ANALIZI 74

5.9.3. MİKRODİZİN SONUÇLARINA GÖRE HÜCRE DÖNGÜSÜNE ÖZGÜ DEĞİŞEN GENLERİN QRT-PCR YÖNTEMİ İLE İFADE DÜZEYLERİNİN DOĞRULANMASI 76

5.10. AKIŞ SİTOMETRİ İLE HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ 77

5.11. MİKRODİZİN'DEN ELDE EDİLEN İNVAZYON İLE İLGİLİ FARKLI İFADE GÖSTEREN GENLER İÇİN HİYERARŞİK SINIFLANDIRMA 'HIERARCHICAL CLUSTERING' ANALIZI YAPILMASI 79

5.12. İNVAZYON İLE İLGİLİ GENLER İÇİN HİYERARŞİK SINIFLANDIRMA 'HIERARCHICAL CLUSTERING' ANALIZI 80

5.13. TCGA VERİ ANALİZİ 81

5.13.1. BETA ARRESTİN 1 PROTEİNİNİN TCGA VERİ ANALİZİ 81

5.13.2. BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİN TCGA VERİ ANALİZİ 83

5.14. BETA ARRESTİN 1 VEYA 2 PROTEİNLERİN İFADE DÜZEYILERİNİN FARKILI HÜCRE HATLARINDA İNCELENMESİ… 85

6. TARTIŞMA VE SONUÇ 87

6.1. TARTIŞMA 87

6.2. SONUÇ 93

KAYNAKLAR 94

ÖZGEÇMİŞ 112

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR 113

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Meme Anatomisi (9). 3

Şekil 2.2. Üçlü Negatif Meme Kanseri sınıflandırması, gen ontolojisi ve oranı. (44). 13

Şekil 2.3. Beta Arrestin protein yapısının şematik özeti (66). 17

Şekil 4.1. pCMV6-XL5 Plazmidi (119). 39

Şekil 4.2. kemilüminesans ile western blot gürüntüleme prensibi. 44

Şekil 5.1. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerin susturulması 54

Şekil 5.2. Beta Arrestin 1, Beta Arrestin 2 veya K-siRNA'lar ile transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon seviyelerinin xCelligence Hücre Analiz sistemi ile incelenmesi. 55

Şekil 5.3. Beta Arrestin 1, Beta Arrestin 2 veya K-siRNA'larla transfekte edilmiş MDA-MB-468 hücrelerinde (panel A) proliferasyon seviyelerinin, (panel B) katlanma süresi parametrelerinin xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP sistemi ile ölçümü 56

Şekil 5.4. Beta Arrestin 1, Beta Arrestin 2 veya K-cDNA'larıyla (k-plasmid) transfekte edilmiş MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Beta Arrestin 1 veya 2 proteinlerinin ifade seviyeleri Western Blot yöntemi ile incelendi. 57

Şekil 5.5. Beta arrestin 1, Beta Arrestin 2 (βArr1 ve βArr2) veya K- cDNA'larıyla transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon seviyelerinin incelenmesi. 59

Şekil 5.6. βArr1, βArr2 veya K-cDNA'larıyla transfekte edilmiş MDA-MB-468 hücre hattında proliferasyon seviyelerinin incelenmesi 60

Şekil 5.7. βArr1, βArr2 veya K-siRNA'lar ile transfekte edilmiş MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde invazyon oranlarının xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP sistemi ile incelenmesi. 62

Şekil 5.8. βArr1, βArr2 veya K-cDNA'larıyla transfekte edilmiş MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde invazyon oranlarının xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP sistemi ile incelenmesi.....64

Şekil 5.9. Hücre invazyon ilişkili genler ile gerçekleştirilen Eş-zamanlı PCR sonuçları.. 65

Şekil 5.10. İnvazyon ile ilgili genlerin protein düzeylerinin western blot ile incelenmesi. 67

Şekil 5.11. βArr1 veya βArr2 proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-468 hücrelerinde invazyonuyla ilişkili genlerin mRNA değerlerinin qRT-PCR sistemi ile incelenmesi 68

Şekil 5.12. βArr1 veya βArr2 proteinlerin aşırı ifade edilmesi ve IGF-1R, Snail ve Vimentin proteinlerin westrn blot ile incelenmesi.....70

Şekil 5.13.'de görüldüğü gibi ortak değişim gösteren genleri saptamak için Venny analizi yapılmıştır 71

Şekil 5.14. βArr1, βArr2 ve Kontrol cDNA'lar ile transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin mikrodizin analizi ile incelenmesinin Venn Diyagramı ile şematize edilmesi. 72

Şekil 5.15. İfadesi farklılık gösteren "Hücre Döngüsü" genleri ile gerçekleştirilmiş hiyerarşik sınıflandırma analizi.....75

Şekil 5.16. Hücre döngüsü genlerinin ifade profilleri qRT-PCR yöntemi ile doğrulanması.....76

Şekil 5.17. Hücre döngüsü analizi; Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 (βArrl ve βArr2) proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231(Panel A.) ve MDA-MB-468 (Panel B.) hücre hatlarında yapıldı.....78

Şekil 5.18. Hücre hareketliliği ve invazyon ile ilgili olabilecek İfadesi farklılık gösteren genler ile gerçekleştirilmiş hiyerarşik sınıflandırma analizi......80

Şekil 5.19. Klinik verilere dayanarak Beta Arrestin 1 proteininin meme kanserindeki ifade düzeyinin TCGA veri tabanı aracılığıyla incelenmesi. 82

Şekil 5.20. Klinik verilere dayanarak Beta Arrestin 2 proteininin meme kanserlerindeki ifade düzeylerinin TCGA veri tabanı aracılığı ile incelenmesi. 84

Şekil 5.21 Farklı meme kanseri hücre hatlarında Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerin ifade seviyeleri; 86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Beta Arrestinlerin kanser türleri özerinde bulunan etkileri (88).....22

Çizelge 2.2. βArr1 ve βArr2 proteinlerin kanser türlerinde bulunan ifade düzeyleri (95).24

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları genel bilgileri.....31

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler.....32

Çizelge 4.3. siRNA Transfeksyonunda kullanılan Diziler.....37

Çizelge 4.4. Protein izolasyon için kullanılan lizis buffur.....40

Çizelge 4.5. Yükleme jeli (Stacking) ve Ayırma jeli (Separation) hazırlanması.....42

Çizelge 5.1. Beta Arrestin 1 aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde mikrodizin verilerinin analizi sonucunda farklılık gösteren genlerle yapılan yolak analiz.....73

SİMGELER DİZİNİ

βArr1	Beta Arrestin 1
βArr2	Beta Arrestin 2
GPkR	G protein kenetli reseptör
PAR-2	Protease activated receptor 2
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
qPCR	kantitatif eş zamanlı PCR
mRNA	Messenger RNA
PP2A	Protein phosphatase 2
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
NK1R	Nörokinin-1 Reseptörü
NFkB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
LPA-R	Lipid mediatörü lizofosfatidik asit- reseptörü
G0/G1	G0 Fazı/G1 fazı(Hücre dongüsü)
S	Hücre dongüsünün Sentez evresi
G2	G2 fazı (Hücre dongüsü)
M	Hücre dongüsünün Metotik evresi
CDKs	Cyclin-dependent kinases
Cdc6	Cell division cycle 6 (Hücre bölünmesi döngüsü 6)
İGF1R	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
Src	Protooncogene SRC, Rous Sarcoma
β-cat	Beta-catenin

cDNA	Complementary DNA (Komplementer DNA)
siRNA	Small interfering RNA (Küçük RNA interferaz)
Bub1	Budding uninhibited by benzimidazoles 1
CXCR4	Chemokine receptor type 4C
TCGA	The Cancer Genome Atlas Program
mA	MiliAmper
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ATCC	American Type Culture Collection
Bp	Baz çifti
ddH_2O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
TGF-β2	Transforming growth factor-beta 2
MET	Mesenchymal–epithelial transition
HER3	Human epidermal growth factor receptor 3
CDKN2C	Cyclin dependent kinase inhibitor 2C
CCNB2	G2/mitotic-specific cyclin-B2
CCNB1	G2/mitotic-specific cyclin-B1
CDC45	Cell division control protein 45 homolog

Cdc25A	Cell division cycle 25 A
Cdc6	Cell division cycle 6

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütünün 2018 verilerine göre, kadınlarda meme kanseri, toplam tanı sayısı ve ölüm oranı bakımından diğer kanserlere kıyasla, birinci sırada yer almaktadır. Tedavisinde ve genel sağ kalımda önemli gelişmeler görülmesine karşın, bu kanser dünya çapında önemli bir ölüm sebebi olmaya devam etmektedir (1). Dünya genelinde her yıl bir milyondan fazla kadına meme kanseri teşhisi konulmaktad (2) ve her yıl yaklaşık 500.000'den fazla kadın bu hastalıktan hayatını kaybetmektedir.2018 yılında açıklanan verilere göre ,dünya genelinde kadınlarda en fazla tanı konulan (yaklaşık 2.088.849 kadın) ve ölüme sebebiyet veren (yaklaşık 626.679 kadın) kanser türü olarak tanımlanmıştır (3).

Meme kanseri, kliniği ve hastalığın biyolojik yapısı gereği heterojen bir hastalıktır. Meme kanseri hastalarının tedavisi, hastalıkla ilişkili faktörler ve hastalığın progresyonu gözönünde tutularak dikkatlice planlanmaktadır (4).

Son zamanlarda,gen ifade profilleme teknikleri sayesinde meme kanserlerinin moleküler alt tipleri daha iyi tanımlanarak anlaşılmıştır (5).

2. KURAMSAL TEMELLER

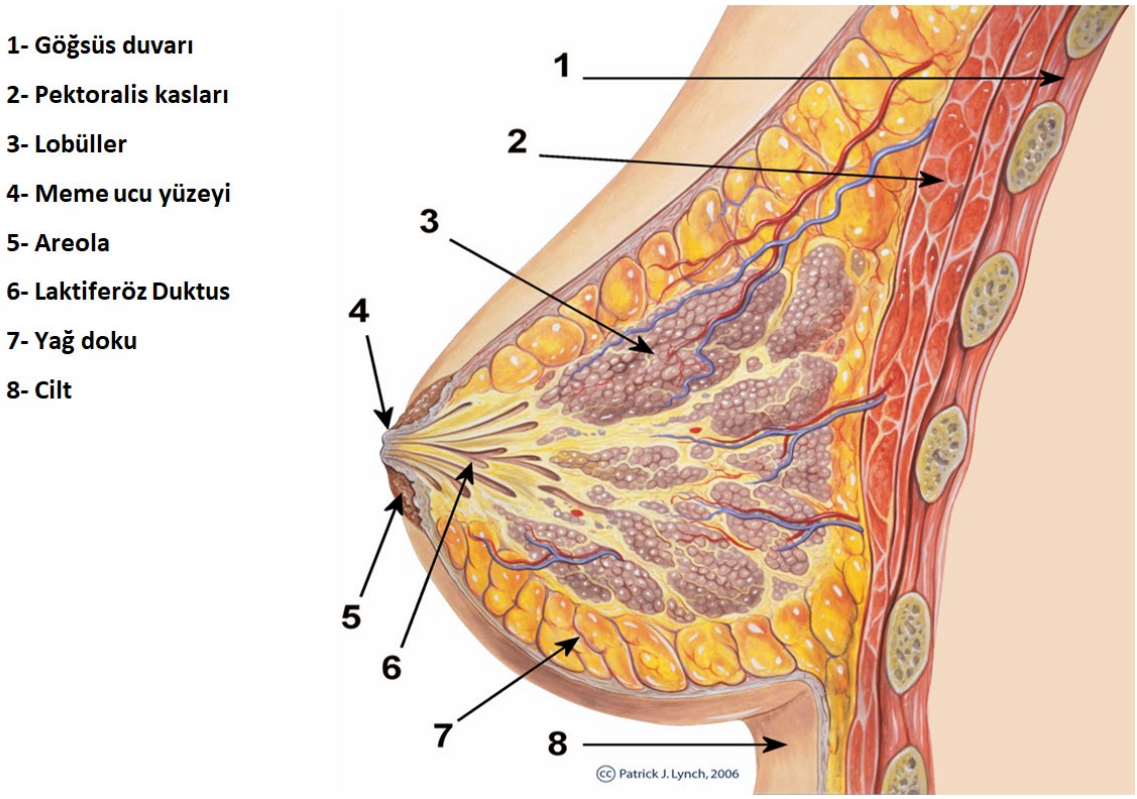
Bulaşıcı olmayan hastalıklar (Non-communicable diseases-NCD) günümüzde küresel çapta ölümlerin çoğundan sorumludur. Kanserin 21'inci yüzyılın sonunda, beklenen yaşam süresi önündeki en büyük engel olacağı düşünülmektedir (3)(6).

Bulaşıcı olmayan hastalıklar başlığı altında sınıflandırdığımız hastalıkların en önemlilerinden birisi de meme kanseridir. Dünya Sağlık Örgütünün 2018 yılında yayınladığı verilere dayanarak, meme kanseri tanı alma ve ölüm oranı bakımından, akciğer kanserinin ardından ikinci sırada yer almaktadır. Kadınlar arasında ise birinci sırada yer almaktadır. Meme kanserinin tedavisinde ve genel sağ kalımda önemli ilerlemeler olmasına karşın, dünya çapında ciddi bir ölüm nedeni olmayı sürdürmektedir (1). Dünya genelinde her yıl bir milyondan fazla kadına meme kanseri tanısı konulmaktadır(2). Bu verilerden yola çıkarak, meme kanseri konusundaki güncel yaklaşımların tedavi ve sağ kalımda istenen başarıyı yakalamada yetersiz olduğu ve yeni gelişmelere ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır.

Bu tezin çalışma konusu olan Beta Arrestinler ve meme kanserinin tanımı, alt tipleri, genetiği, biyolojisi ve tedavi hedefleri ile ilgili kısa bilgiler bu bölümde yer almaktadır.

2.1. MEMENİN ANATOMİSİ

Meme, süt üreten lobüller sütü taşıyan kanallar (duktuslar) ve destek dokusundan oluşur. Kadınların memesi, erkeklere kıyasla daha fazla bez dokusu içerir ve bebekler için en uygun beslenmeyi sağlamak için evrimleşmiştir. Meme ucuna uygulanan stimülasyon hipofiz bezinden salgılanan prolaktin hormonunun miktarını çoğaltarak süt üretimini tetikler (7). Kadın memesinde ortalama 12-20 lob bulunur ve her bir lobda da 20-40 lobül bulunur (8). Bu loblar ve lobüller süt kanalları(duktuslar) aracılığı ile birbirlerine bağlanırlar. Memenin destek dokusu olarak adlandırılan bölümü adipoz doku, sinir ağı, kan damarları, lenf damarları, lenf nodları, fibröz bağ dokusu ve ligamentlerden oluşur (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Meme Anatomisi (9).

2.2. MEME KANSERİNİN TANIMI

Rutin muayenede bir kitle fark edildiğinde, ilk olarak kanser olasılığının dışlanması gerekir ve bu amaçla, mamogram gibi çeşitli tetkiklerle hasta muayene edilip incelenir. Mamogramda kitle görülmesi, görülen kitlenin kanser olduğu anlamına gelmemektedir. Kitlenin yeri, büyüklüğü aynı zamanda histopatolojik ve genetik analizleri gibi birçok faktör göz önüne alınıp değerlendirilerek kesin tanı konulmaktadır (9).

Meme kanseri, hücrelerin yapısının değişmesi ve kontrolsüz çoğalması sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanserler, köken aldıkları dokunun hücrelerine göre isimlendirilirler (10). Meme kanserlerinin çoğu, loblardan veya lobülleri meme ucuna bağlayan kanallardan köken alır (11). Meme kanseri tanım olarak, heterojen bir tümör grubunu kapsar. Meme kanserinin alt tipleri; histomorfolojik değişimlere, mutasyonlara, metastatik potansiyele göre

farklılık gösterir. Dolayısıyla hastalık progresyonu ve terapötik yanıt meme kanserinin her alt tipinde aynı olmamaktadır (12).

Dünya genelinde nüfusun artması ve yaşlanması kanser sıklığını ve kansere bağlı mortaliteyi hızlı bir şekilde artırmaktadır. Nüfusun yaşlanması, meme kanseri risk faktörlerini, popülasyonların sosyoekonomik ve gelişmişlik düzeyleriyle de ilişkili olarak, etkilemektedir (13)(14).

Dünya genelinde, 2018 yılındaki istatistiklere göre, yeni kadın meme kanseri vakalarının sayısı yaklaşık olarak 2.1 milyondur. Bu sayı kadınlar arasındaki tüm kanser vakalarının %25'ine tekabül etmektedir.

2.3. MEME KANSERİ RİSK FAKTÖRLERİ

Meme kanseri için önemli risk faktörlerinin sınıflandırılması:

- Cinsiyet
- Yaş
- Etnik köken
- Aile öyküsü
- Çevresel faktörler ve yaşam tarzı
- Genetik faktörler

2.3.1. CİNSİYET

Meme kanseri, kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülmektedir. Erkeklerde meme kanseri nadirdir. ABD'de tüm meme kanseri vakalarının % 1'inden azını erkek hastalar oluşturmaktadır. Cinsiyet en önemli risk faktörü olarak öne çıkmaktadır. Kadınlar, östrojen hormonunun fazlalığı ve etkileri nedeniyle erkeklere kıyasla daha fazla risk altındırlar. Meme kanseri sıklığı, kadınlarda erkeklere göre 100 kat daha fazladır (15).

2.3.2. YAŞ

Meme kanserlerinin yaygınlığı ve mortalitesi yaşla birlikte artmaktadır. 2010 ile 2014 yılları arasında tanı alan meme kanseri hastaların yarısı 62 yaşın altındadır. 20 yaşından önce meme kanseri görülme ihtimali düşüktür. Yaşlanmayla birlikte kansere yakalanma oranı artmaktadır (16). Erken yaşta görülen meme kanserleri genellikle kalıtsal faktörlerden kaynaklanmaktadır (17).

2.3.3. ETNİK KÖKEN

Genç yaşlarda meme kanseri görülme oranı; beyaz ırka mensup kadınlarda, siyah kadınlara göre daha düşüktür (3). Uluslararası Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinin (center for disease control and prevention, CDC) 2018 yılı istatistiklerine göre Asyalı / Pasifik Adalı (API) kadınlar meme kanseri açısından en düşük insidansa ve mortaliteye sahiptirler. Hispanik olmayan beyaz (Non-hispanic white, NHW) ve siyah (Non-hispanic black, NHB) kadınlarda meme kanserinin yaygınlık ve ölüm oranları diğer ırk ve etnik gruplara kıyasla daha yüksektir (16).

2.3.4. AİLE ÖYKÜSÜ

Ailesinde meme kanseri öyküsü olan kadınlar ve erkekler, hastalığa yakalanma bakımından yüksek risk altındadırlar. Birinci derece (ebeveyn, çocuk veya kardeş) akrabalarından biri meme kanseri tanısı almış kadınların meme kanserine yakalanma riskleri yaklaşık iki kat artmaktadır. Eğer birinci derece akrabalarında birden fazla kişide meme kanseri tanısı alan varsa meme kanserine yakalanma riski yaklaşık üç kat artmaktadır. Aile öyküsü, meme kanseri riski ile ilişkili olmasına rağmen meme kanseri olan her 100 kadından sadece 15'inde aile öyküsü pozitiftir (22). Meme kanseri hastalarının çoğunda aile öyküsü negatiftir (22)(20).

2.3.5. ÇEVRESEL FAKTÖRLER VE YAŞAM TARZI

2.3.5.1. Obezite

Meme kanserine yakalanma riski, menopoza giren kadınlarda bir buçuk kat, arttırırken obez kadınlarda ise iki kat artırmaktadır (18). Menopoza giren kadınlarda meme kanseri artışının sebebinin aynı zamanda kilo alımı ile ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir. Bu artışın ayrıca yüksek östrojen seviyelerine bağlı olabileceği de düşünülmektedir (19).

2.3.5.2. Fiziksel Aktivite

Düzenli olarak fiziksel aktivite yapan kadınlar, sedanter yaşayan kadınlara kıyasla meme kanserine yakalanma riski bakımından %15-20 daha az riske sahiptirler. Meme kanserine yakalanma riski, spor ile bire bir ilişkilidir. Yüksek fiziksel aktivite ile risk azalmaktadır. Yürüme gibi daha küçük aktiviteler bile riski azaltma açısından faydalı görünmektedir (20)(19).

2.3.5.3. Radyasyon

Radyasyona maruz kalmış atom bombası mağdurlarının ile yapılan çalışmalarda, meme kanserine yakalanma riskinin arttığı gösterilmiştir (21). Son çalışmalar, düşük doz radyasyon içermesine rağmen, radyoterapinin meme kanseri riskini artırdığını göstermektedir (22).

2.3.6. GENETİK FAKTÖRLER

Genetik faktörlerı arasında bahsedilmesi gereken en önemli genler, meme kanseri riskini arttırdığı saptanan brca1 ve brca2 genleridir. Bu genler , tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadırlar (23). Brca1 ve brca2 , meme kanseri hastalarında en fazla öne çıkan ve araştırılan genlerdir. Tüm kadın meme kanserlerinin % 5-10'unda ve erkek meme kanserlerinin % 5-20'sinde bu iki genin mutasyonları görülmektedir (24). Ayrıca son zamanda PALB2 (partner and localizer of brca2) denilen ve brca2 ile birlikte görev yapan yeni bir gen tanımlanmıştır. Bu gende görülen mutasyonların brca2 mutasyonlarında olduğu gibi, meme kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir (25). Li-fraumeni ve Cowden sendromları

da meme kanseri risk artışı ile ilişkili olduğu bilinen kalıtsal sendromlardır (24). Bu bilgilere ek olarak, meme kanserine yakalanma riskini artıran 150'nin üzerinde nadir rastlanan genetik varyant tanımlanmıştır (16).

2.4. MEME KANSERİ ALT TİPLERİ VE SINIFLANDIRILMASI

Kanser tiplerinin sınıflandırılması, kanser tipine özgü tedavi yöntemlerini araştırmak ve uygulamak için, son yıllarda oldukça ön plana çıkmıştır.

Meme kanserlerinde, heterojen tümör gruplarının varlığı söz konusudur. Bu heterojenite ve farklı alt tiplerin varlığı, hücresel köken, mutasyonlar, histolopatoji, metastatik potansiyel, terapötik yanıt ve klinik yaklaşımlarda farklılıklar doğurmaktadır (12).

2.4.1. HİSTOPATOLOJİK SINIFLANDIRILMA

Histopatoloji bakımından, meme kanserleri invaziv ve invaziv olmayan diye ikiye ayrılmaktadır. Meme kanseri birçok farklı histolojiye sahip olmasına rağmen bu kanserin büyük çoğunluğu kanalları veya lobülleri kaplayan epitelden köken alır ve meme duktal karsinomu olarak sınıflandırılır (26)(27).

2.4.1.1. Karsinoma İn Situ

Karsinoma in situ, meme kanserinin invaziv olmayan alt tipidir ve çevre dokuları istila etmeden epitel dokusunda sınırlı olarak gelişim gösterir. Kaynaklandığı yere göre iki farklı tipe ayrılmaktadır: İn situ duktal karsinom (ductal carcinoma in situ, DCIS) ve in situ lobüler karsinom (Lobular carcinoma in situ, LCIS). LCIS ayrıca lobüler neoplazi olarak da bilinir. DCIS hem duktal hem de lobüler karsinomların özelliklerine sahiptir (27).

Duktal karsinoma in situ (DCIS**):** Kanser olarak tanımlanmayan ancak;süt kanallarındaki normal epitel hücrelerinin neoplastik hücrelere dönüşmeye başladığıve bazal memranda sınırlı kalan karsinomadır. Eğer bazal membran sınırlarını aşarsa invaziv kanser olarak adlandırılır. İnvaziv kanser gelişim süreci çok uzun yıllar alabilmekte ve hasta tedavi almasa dahi hastanın sağ kalımı etkilenmemektedirinvaziv (27)(28).

Lobüler karsinoma in situ (LCIS): Memenin lobüllerindeki yerleşik normal hücrelerin neoplastik hücrelere dönüşmeye başlamasıdır. Patolojik oluşumlar lobül içinde sınırlanmıştır ve çevre dokuya yayılmamıştır. Kanser olarak tanımlanmazlar ancak tedavi edilmediği sürece invaziv kanser geliştirme ihtimali yüksektir (28).

2.4.1.2. İnvaziv Karsinoma

karsinoma in situnun tersine, çevre dokuyu istila eder (26). Bu grupta en sık görülen karsinom tipi invaziv duktal karsinomdur ve tüm invazivinvaziv karsinomların yaklaşık % 80' nini oluşturmaktadır. ABD'de tanı konulan meme kanseri vakalarının % 55'i invaziv duktal karsinomdur (27). İnvaziv lobüler karsinomalar invaziv karsinomların yaklaşık % 10'unu ve abd'deki tüm vakaların yaklaşık % 5'ini oluşturur. DCIS kendisi zararsız olsa da tedavi edilmediği taktirde DCIS lezyonları invaziv kansere dönüşebilir. Tedavi edilmeyen DCIS lezyonlarının yaklaşık % 60'ı 40 yıl içerisinde invazivinvaziv kansere dönüşür (28). Meme karsinomlarının çoğu (yaklaşık 80%) invazivdir, invaziv kansere dönüşen hücreler anormal bir büyüme patterni gösteri. Çevrelerindeki bezlerin veya kanalların duvarlarını parçalayarak meme dokusuna yayılırlar. İnvaziv meme kanserlerinin histolojik alt tipleri, risk faktörleri ve tedaviye yanıtları farklılık gösterir. İnvaziv meme kanserleri en az dört farklı moleküler alt tipe ayrılarak sınıflandırılır. Son yıllarda geliştirilen gen ekspresyonu profilleme teknikleri meme kanserinin moleküler alt tiplerinin daha iyi tanımlanıp anlaşılmasını sağlamıştır.

2.4.2. MOLEKÜLER ALT TİPLER

Moleküler alt tipler, biyolojik belirteçler kullanılarak değerlendirilmiş ve tanımlanmıştır. Kullanılan yöntemler doğrultusunda bazı hormon reseptörlerinin varlığı ya da yokluğu incelenerek dört ana moleküler alt tip tanımlanmıştır;

1) Luminal A (ER+, PR+/-, HER2-) (% 71); Bu alt tipin özelliği yavaş büyüme göstermesi ve diğer alt tiplere nazaran daha az agresif olmasıdır. Luminal A tümörleri, anti-hormon tedavisine diğer tiplere göre daha duyarlı oldukları için prognozu en iyi seyreden alt tip olarak kabul edilir. Ki67 indeksi (hızlı bölünen

hücreleri saptamak için kullanılan bir proliferasyon göstergesi) düşüktür ve genellikle kemoterapiye olumlu cevap verirler (29)(30).

2) Luminal B (ER+, PR+/-, HER2+) (% 12); Luminal B alt tipi, luminal A gibi ER + ve / veya PR + kanser türleridir, Ki67 indeksi yüksektir ve HER2 reseptörü de pozitiftir. Genellikle hormon tedavisine cevap verirler. Kemoterapiye ve trastuzumab gibi HER2 antikor tedavisine değişken cevap gösterirler.
   Histopatolojik tanısı Luminal B olan hastaların sağ kalım oranı, luminal A tanılı hastalara göre düşüktür (31)(30).

3) HER2 pozitif (ER-, PR-, HER2+) (% 5); HER2 reseptörü pozitif kanserler diğer alt tiplerden daha agresif bir şekilde büyümeye ve yayılmaya meyillidirler. Ayrıca HR- meme kanserlerine kıyasla daha kötü prognoza sahiptirler. Bu alt tipin Ki67 indeksi yüksektir ve genellikle trastuzumab gibi HER2 reseptör antikoru tedavilerine cevap verirler (32)(33).
   Ayrıca son zamanlarda HER2 pozitif meme kanserleri için hedefe yönelik tedaviler yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve iyi sonuçlar elde edilmiştir.

4) Üçlü negatif (ER-, PR-/ HER2-) (% 12); Bu alt tipte, östrojen (ER), progesteron (PR) ve HER2 reseptörleri bulunmadığı için, Üçlü negatif meme kanseri olarak adlandırılırlar. Üçlü negatif alt tipte Ki67 indeksi yüksektir ve EGF reseptörü yüksek miktarda ifade edilmektedir. Bu kanser alt tipi premenopozal kadınlarda ve BRCA1 gen mutasyonu olan kadınlarda daha sık görülür. Üçlü negatif meme kanserlerinin çoğunluğu (yaklaşık% 75), gen ifade profillerine göre, bazal benzeri alt tip ailesine aittir ve üçlü negatif meme kanserlerinde hedefe yönelik tedaviler henüz yeterince geliştirilmediği için prognoz diğer alt tiplere göre daha kötü seyreder (34)(35)(36).

2.5. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERLERİ

Üçlü negatif meme kanseri, diğer meme kanser tiplerine kıyasla daha agresif özellikler taşır. Genellikle, yüksek metastaz oranlarına sahiptirler ve prognozları kötü seyreder (37). Üçlü

Negatif Meme Kanseri (ÜNMk) olarak adlandırılmasının nedeni , östrojen reseptörü-a (ER-a), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu olmamasıdır. Üçlü negatif meme kanseri ile en fazla benzerlik gösteren meme kanseri alt tipi bazal benzeri tümörlerdir, fenotip olarak % 50-75 oranında bazal benzeri tümörler ile örtüşmektedirler. Aynı zamanda, bazal benzeri tümörlerin de yaklaşık % 80'i ER negatif / HER2 negatifdir. Üçlü negatif Meme kanseri, tanı konulan tüm meme kanserlerinin % 10-15'ini oluşturur. Nüksün ve uzak metastazın sık görüldüğü bir alt tiptir, beş yıllık sağ kalım oranı ise % 15'ten azdır (38). ABD'de üçlü negatif meme kanserleri siyahi kadınlarda beyaz kadınlara oranla iki kat daha fazla görülmektedir. Menopoz öncesi dönemdeki ve BRCA1 gen mutasyonuna sahip kadınlarda daha yaygın olarak görülmektedir (39). Günümüzde, Üçlü negatif meme kanseri için kullanılan tedavi yöntemi kemoterapidir. Bu kanseri tedavi etmek için kullanılan paklitaksel gibi genel ve birinci basamak antikanser ilaçlar ideal bir terapötik yanıt oluşturamamaktadır (40). Üçlü negatif meme kanseri, geleneksel kemoterapi ve radyoterapi dışında, FDA onaylı hedefe yönelik tedavilere henüz geliştirilememiştir (41). Bununla birlikte, adjuvan tedavi gören hastaların yaklaşık üçte birinde, tedaviyi takip eden üç yıl içinde nüks gözlenir (42). Üçlü negatif meme kanseri için hedefe yönelik tedavilerin geliştirilememesinin nedenlerinden birisi bu hastalığın gelişim ve metastaz mekanizmalarının detaylı olarak bilinmemesidir.

Bu agresif özellikler ve hedefe yönelik tedavilerin eksikliği araştırmacıların bu alana yoğunlaşmasına ve birçok çalışma yapmasına neden olmuştur. Bu çalışmaların genel amacı, bahsedilen alt tipin tedavisi için uygun moleküler hedeflerin araştırılması ve keşfedilmesidir. Yapılan büyük kohort çalışmaları, klinik araştırmalar ve meta analizlerin sonucunda Üçlü negatif meme kanserı'nde farklı moleküler değişiklikler ortaya koymuştur ancak, bu değişikliklerin çoğunun kanserin ilerlemesine olan etkisi tartışmalıdır (43).

Üçlü-negatif meme kanseri, histolojik ve biyolojik özellikleri önemli farklılıklar gösteren heterojen bir hastalıktır (31). Mikrodiziler ve yeni nesil sekanslama gibi moleküler teknolojilerden elde edilen veriler bu tip kanserlerin mutasyonlarının profillenmesine ve alt kümelerinin tanımlanmasına imkân vermiştir. Elde edilen moleküler veriler, daha iyi prognoz sağlamak için etkili tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (44). Üçlü-

negatif meme kanserinde görülen alt tipler farklı hücre hatlarıyla temsil edilmektedir. Moleküler esaslı tedaviler için, bu hücre hatlarının daha iyi tanınması ve alt tiplerinin belirlenmesi gerekmektedir. Üçlü-negatif meme kanserlerinin, gen ifade analizleri ve Küme analizleri (cluster analysis) sonucunda, farklı gen ifadesi ve ontolojisi gösteren 6 farklı alt tip belirlenmiştir.

2.5.1. ÜÇLÜ-NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE HATTI MODELLERİ

Lehmann ve arkadaşları tarafından 2011 yılında, Şekil 2.2.'de görüldüğü gibi üçlü negatif meme kanserleri 6 alt tipi ve bir değişken alt tipi olarak tanımlandı ve sınıflandırıldı (31).

1) Bazal Benzeri 1 Alt Tipi (BL1);

BL1 alt tipinde, hücre bölünmesi ve hücre döngüsü yolaklarında rol oynayan genlerin ifadeleri artmıştır. BL1 alt tipindeki proliferasyon yolaklarındaki ifade artışlarına , DNA hasarı sonucunda aktive olan yolaklarda eşlik eder. Yüksek Ki67 indeksine sahip olması bu alt tipin yüksek proliferatif özelliği olduğunu desteklemektedir (31).

BL1 alt tipi, Üçlü negatif meme kanseri alt tipleri arasında, TP53 mutasyonu %92 oranla en sık görülen alt tipidir. Yüksek düzeyde MYC, CDK6 veya CCNE1 amplifikasyonu göstermektedir. Aynı zamanda BRCA2, PTEN, MDM2 ve RB1 genlerinde delesyon saptanan alt tip olarak bilinmektedir. (45). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının saptandığı hücre hatlarının neredeyse tümü, bazal alt tip ile ilişkili olan gen ifade patternlerine sahiptir (46).

2) Bazal benzeri 2 Alt Tipi (BL2);

BL2 alt tipinde, EGF, NGF, MET, Wnt / β-katenin ve IGF1R gibi büyüme faktörü ile ilgili sinyal yolakları aktif olarak görülmektedir. BL2 alt tipi, BL1'e benzer şekilde, EGFR, MET ve EPHA2 gibi büyüme faktörü reseptörlerinin ifadesi artmıştır. BL2 alt tiplerinde, hücre döngüsü ve DNA hasarı yanıt genleri daha yüksek ifade oranına sahiptirler ve genellikle sisplatine iyi cevap verirler (36).

3) Mezenkimal Kök Hücre Benzeri Alt Tipleri (MSL);

Mezenkimal alt tip olarak tanımlanan alt tipte, hücre motilitesi, hücresel farklılaşma, hücre dışı reseptör etkileşimi (extracellular receptor interaction) gibi çeşitli yolak genlerinde ifade artışı vardır.MSL olarak(Mezenkimal Kök Hücre Benzeri) alt tiplerde mezenkimal alt tipte olduğu gibi benzer yolak genlerinde ifade artışı vardır (47).

Bununla birlikte, MSL alt tipine özgü genler ve genlere bağlı süreçler de ayrıca tanımlanmıştır. Bu genlerin ürünleri inositol fosfat metabolizması, EGFR, PDGF, kalsiyum sinyal mekanizmaları, G-protein bağlı reseptör ve ERK 1 /2 sinyalizasyonunda görev almaktadır. Bahse konu olan genler ek olarak, ABC (ATP-Binding Cassette) taşıyıcı ve adipositokin sinyalizasyonunu da içeren büyüme faktörü sinyal yolaklarına bağlı bileşenleri ve işlemleri de düzenlemektedir. Burstein ve arkadaşları bu alt tiplerde normalde osteositlere (OGN) ve adipositlere (ADIPOQ, PLIN1) özgü genlerin ifade edildiğini ve büyüme faktörlerinden biri olan IGF-1'in (Insulin-like growth factor 1) de yüksek oranda ifade edildiğini göstermişlerdir (42).

4) Mezenkimal alt tipi (M);

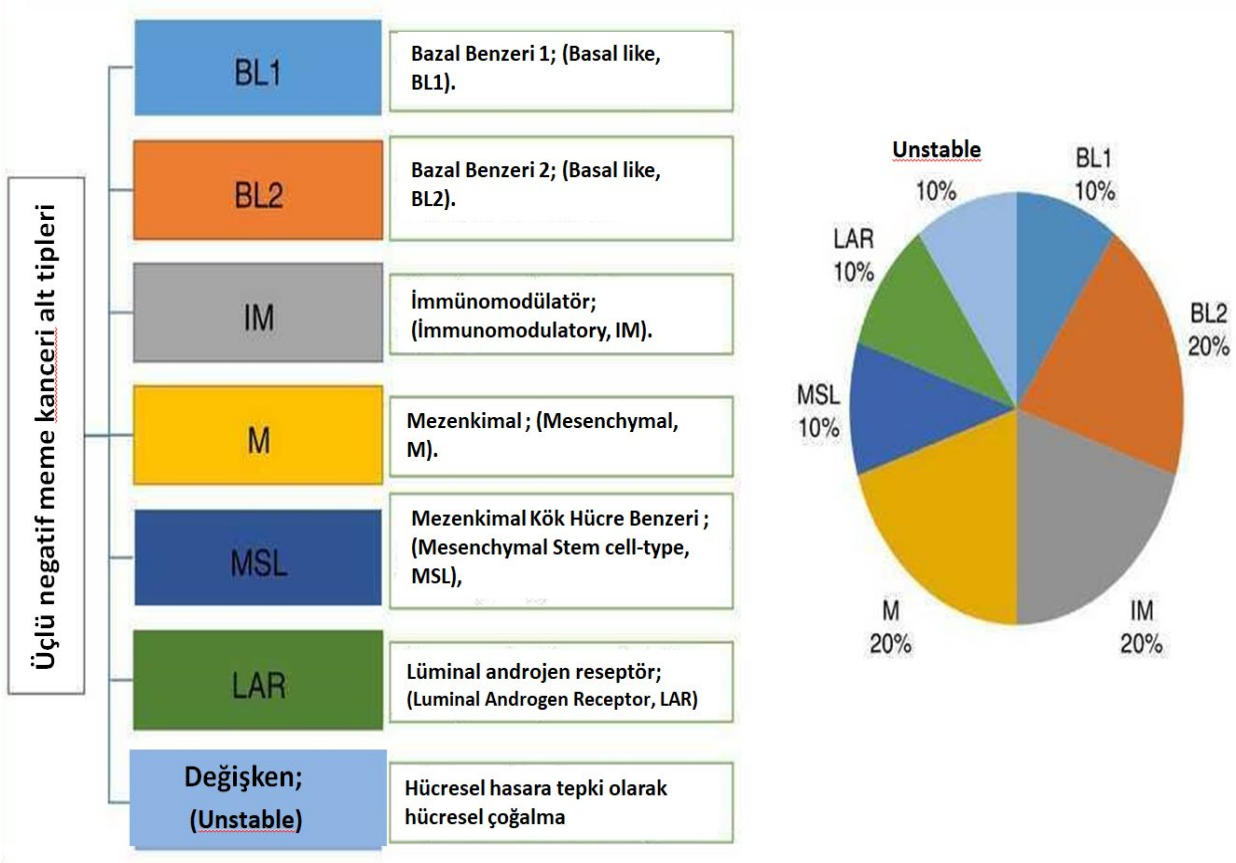
Mezenkimal benzeri Üçlü negatif meme kanseri alt tipleri, M ve MSL, hücre motilitesi, farklılaşma ve EMT(Epitelyal-Mezenkimal Geçiş) ile ilişkili genlerde benzer ifade profilleri gösterirler, MSL alt tipi anjiyogenez ve kök hücre ile ilişkili genlerin ifadesindeki artış ve düşük claudin ekspresyonu ile diğer alt tiplerden ayrılır (48).

5) Lüminal androjen reseptör alt tipi (LAR);

Bu alt tip Androjen reseptörü (AR) sinyalizasyonu artışı ile karakterizedir. LAR alt tipi tanılı hastalarda sağkalım diğer alt tiplere göre daha yüksektir. LAR'yi temsil eden hücre hatları bir AR antagonisti olan bikalutamid'e karşı oldukça duyarlıdır (29).

6) İmmünomodülatör alt tipi (IM);

İmmünomodülatör alt tipinde, TH1/TH2 yolağı, NK hücre yolağı, IL-12 yolağı gibi immün düzenlenmede rol oynayan genlerin ifadesi artmıştır. STAT genlerinin de ekspresyonu artmıştır. Bu alt tipte grade yüksek olmasına rağmen prognoz genellikle iyidir (31).



Şekil 2.2. Üçlü Negatif Meme Kanseri sınıflandırması, gen ontolojisi ve oranı. (44).

2.5.2. HÜCRE HATLARI VE ÖZELLİKLERİ

Bu çalışmada kullanılan meme kanseri hücreleri, Üçlü negatif meme kanseri ailesine ait olan MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarıdır.

1). MDA-MB-231

MDA-MB-231 hücre hatları, metastatik meme adenokarsinoması olan 51 yaşındaki kadın hastanın metastatik plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Morfolojik olarak epitel hücrelerinin özelliklerini taşırlar. Bu hücre hatlarında epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüşüm büyüme faktörü alfa (TGF alfa) reseptörleri ifade edilmektedir. Transfeksiyon deneyleri için uygun hücrelerdir (34).

MDA-MB-231 kanser hücreleri, Üçlü-negatif meme kanserlerin Mezenkimal benzeri alt grubunda yer almaktadırlar. Bu hücre hatları invaziv duktal karsinom histolojisine sahiptirler. Bu hücre hatlarının mutasyon haritasında BRAF ve KRAS genlerinde heterozigot mutasyonlar ayrıca CDKN2A, NF2, TP53 ve PDGFRA genlerinde homozigot mutasyonları görülmüştür (49).

2). MDA-MB-468

MDA-MB-468 hücre hatları, 1977 yılında, metastatik meme adenokarsinoması olan 51 yaşındaki Siyahi bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Bu hücre hattı, epitel hücre morfolojisine sahiptir, reseptör olarak epidermal büyüme faktör reseptörü (EGF) ve dönüşüm büyüme faktörü alfa (TGF alfa) ifade edilmektedir.MDA-MB-468 hücreleri transfeksiyona uygundur , ATCC sitesini verilerine göre transfeksiyon verimi yaklaşık % 90'dır.

MDA-MB-468 kanser hücreleri , Üçlü-negatif meme kanserlerin bazal benzeri 1 alt grubunda sınıflandırılırlar. Bu hücreler histolojileri bakımından duktal karsinom olarak sınıflandırılmaktalar. PTEN, RB1, SMAD4 ve TP53 genlerinde homozigot mutasyonlar bulunmaktadır (36).

2.6. ARRESTİN PROTEİNLERİ

Arrestin proteinleri ifade edilme yerlerine göre iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Birinci gruptaki Arrestin proteinleri, görsel Arrestin (Arrestin-1) ve koni Arrestini (Arrestin-4)

olmak üzere iki tanedir ve genellikle gözde bulunurlar. İkinci grupta olan β -Arrestin 1 (Arrestin-2) ve β-Arrestin 2 (Arrestin-3) proteinleri ise tüm dokularda ifade edilir (50)(51).

Bu proteinler ilk olarak 1977 yılında Wacker ve arkadaşları tarafından görsel algılamadaki görevleri nedeniyle "retinal S antigen" olarak tanımlanmıştır. Bu proteinin geni, HUGO veri tabanında hala S antigen (Sag) olarak kayıtlıdır (52)(53). 1980'lerin başında, görme fizyolojisi üzerinde yapılan çalışmalarda, bu proteinin Rodopsin'in ışıkla olan aktivasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (54)(55). O yıllarda, görsel sistem ile reseptörlerin çalışma mekanizmaları arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Bu ilginç ilişki 1986'da β2-adrenerjik reseptörün (β2AR) klonlanmasıyla aydınlanmaya başlamıştır. İlk olarak, β2AR'ın zar topolojisinin rodopsin ile benzer olduğu ortaya konuldu (56)(57). Arrestin proteinleri görsel rodopsin sisteminde G-protein kenetli reseptörlerin (GPKR'ler) aktivitesini düzenleyen mekanizmanın bir parçası olarak 1986 yılında Herman Kuhn ve arkadaşları tarafından tanımlandı(58). Aynı zamanda başka bir laboratuarda, Martin Lohse ve arkadaşları tarafından β-adrenerjik reseptörlerin sinyal yolaklarında rol aldıkları gösterilmiştir (59). S-antijeninin; Rodopsin sinyalini "engellemesi (arrest)" nedeniyle bu proteine Arrestin ismi verildi. Daha sonra bu ailedeki tüm proteinlerin ilk tanımlanan görevleri reseptör desensitizasyonu olduğu için bunlara da Arrestinler denilmiştir (60). İnsan Arrestin proteinin geni 1990 yılında analiz edilerek , yaklaşık 50 kilo baz uzunluğunda olduğu, 16 ekzon ve 15 intron içerdiği tespit edildi. Bu ekzonların çoğu 100 baz çiftin altındayken intronlar daha uzun gen dizilerine sahiptir. İnsandaki gen dizisinin 405 amino asitten oluşan proteinleri kodladığı gösterilmiştir (52).

2.6.1. ARRESTİN TİPLERİ

Bu proteinlerin keşif sürecinde yapılan çalışmalar sonucunda, proteinlerin isimleri de zaman içerisinde değişmiştir. Arrestin proteinleri günümüzde 4 alt tipe ayrılarak inceleniyor .Dört Arrestininde farklı isimlendirmeleri mevcuttur.Memeliler, dört Arrestin alt tipinin hepsini eksprese etmektedirler.

- **Arrestin-1:** 48 kDa ağırlığındadır ve ilk tanımlanan Arrestin proteinidir. Üveite (otoimmün göz hastalığı) neden olur. S-antijen (SAG) olarakta adlandırılır (60).

- **Arrestin-2:** 47066 Dalton ağırlığındadır. Görsel olmayan Arrestin proteinlerinden ilk tanımlananıdır ve Beta Arrestin1 olarak isimlendirilmiştir. Beta Arrestin 1 proteini, β2-adrenerjik reseptörlere bağlı olarak bulunduğu için BETA ismi Arrestin kelimesinin önüne eklenmiştir. Başka bir çalışmada ise saflaştırılmış formdaki Arrestin-2, ortamdaki rodopsin ve β2-adrenerjik reseptörler arasında β2-adrenerjik reseptöre bağlanmayı tercih ettiği için β-Arrestin olarak adlandırıldığı öne sürülmektedir (61).

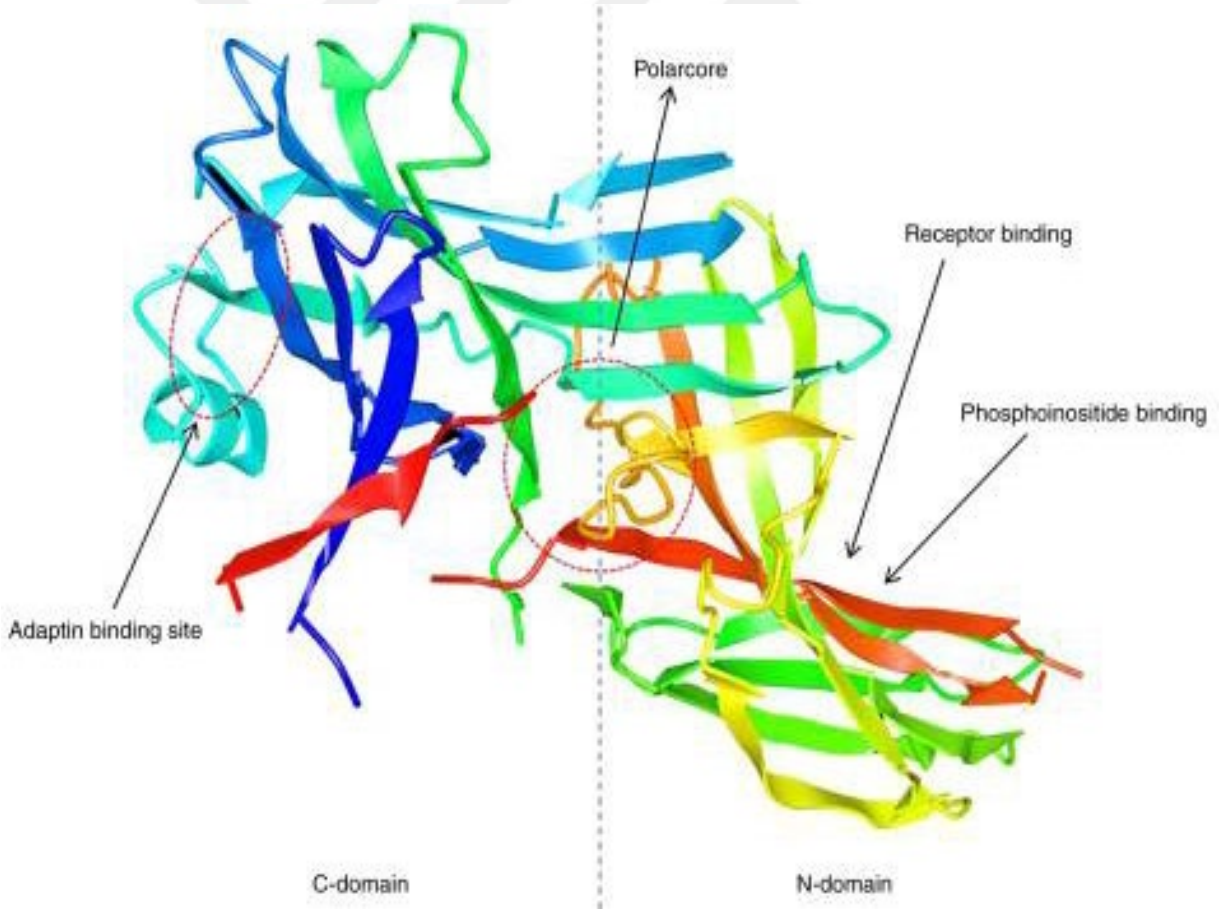
- **Arrestin-3:** 46106 Dalton ağırlığındadır. Tanımlanan ikinci görsel olmayan Arrestindir ve Beta Arrestin 2 olarak isimlendirilmiştir. β2-adrenerjik reseptörlere bağlandığı için bu proteine β-Arrestin-2 ismi verilmiştir. Fakat daha sonra bu bağlanmanın sadece β2-adrenerjik reseptör ile sınırlı kalmadığı diğer reseptörlerle de etkileşime geçtiği ortaya çıkmıştır (62).

- **Arrestin-4**: Fotoreseptörler ile etkileştiği için koni Arrestin veya X-Arrestin olarak tanımlanmıştır. HUGO veritabanında bu proteinin genine Arrestin-3 ismi verilmiştir (60)(63).

2.6.2. BETA ARRESTİN PROTEİNLERİ

İki tip Beta Arrestin proteini vardır: Beta Arrestin 1, 53 kDa ağırlığında , kodlayıcı geni 7. kromozomda bulunan bir proteindir.. Beta Arrestin 2 ise 46 kDa ağırlığındadır ve geni 11. kromozomda bulunur (64)(65). Beta Arrestin 1 ve 2 proteinlerinin amino asit sekansları arasında % 70'lik oranda benzerlik saptanmıştır. B-Arrestin 1/2 proteinlerinin omurgalı ve omurgasız türler arasındaki sekans benzerliğinin insanlar, fareler, sıçanlar ve kurbağalar da dahil olmak üzere yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir (63)(66).

Beta Arrestin proteinleri, serbest haldeyken katlanmış iki antiparalel β tabakası şeklinde bulunmaktadır. N terminalin dışbükey yüzü kısa bir alfa heliks yapısı içerir. Bu heliks yapısı C terminal alanına, yüklü tuz köprüleri ile oluşturulan polarize çekirdek aracılığı ile bağlanır ve proteinin doğru pozisyonunu korumasını sağlar (56)(67). Ayrıca Şekil 2.3.'de görüldüğü gibi Beta Arrestin proteinleri, tersinir membran çapası (reversible membrane anchor) işlevi yapan bir katyonik amfipatik sarmal içerirler(68). Aktif olmadığı zaman, Beta Arrestin'lerin polarizasyon çekirdeği olarak tanımlanan bölgesi, N ve C terminal alanlarının bağlantı noktasına hareket eder ve C terminalinin karboksil kuyruğu arasındaki kavşağa bağlanır. Aktivasyon ve sonrasındaki polarizasyonun ardından Beta Arrestinlerin çekirdek bölgeleri yok olur ve C terminal karboksil kuyruğu serbest kalır. Klatrin ve adaptin proteini 2, c Jun N terminal kinaz (JNK) 3 ve ERK1 / 2 proteinlerinin bağlanma bölgeleri açığa çıkar (69)(70).



Şekil 2.3. Beta Arrestin protein yapısının şematik özeti (66).

Beta Arrestinlerin hemen hemen tüm G protein kenetli reseptörlerin sinyal iletiminde görevli oldukları görülmüştür. Bu proteinler ilk olarak G protein-kenetli reseptörlerin (GPKR'ler) duyarsızlaştırılmasındaki rolleriyle öne çıkmışlardır.Günümüzdeki bilgiler doğrultusunda birçok reseptör bağımlı olmayan proteinle etkileşimlerinde adaptör protein olarak görev aldıkları bulunmuştur. Ayrıca sinyal yolaklarını kontrol etme sürecinde de rol oynadıkları görülmüştür (55). Bu nedenle β-Arrestin proteinleri, hücre büyümesinden hayatta kalmaya, hücre iskeleti düzenlemesi ve hücre migrasyonuna kadar uzanan geniş bir yelpazedeki hücresel süreçlerde görev alırlar (71). Son zamanlarda Beta Arrestinlerin üzerinde yapılan in vivo çalışmaların artması, bu proteinlerin rol aldığı fizyolojik ve patolojik işlevlerin açığa çıkmasını sağlamıştır. Bu proteinlerin keşfedilecek yeni tanı ve tedavi süreçlerinde kullanılabileceği vurgulanmıştır. Beta Arrestinler hakkında bilgilerimizin ilerlemesi, bu proteinlerin işlevlerini daha iyi anlamak için birçok yeni tekniğin ve yaklaşımın geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (72).

2.6.3. BETA ARRESTİNLER VE G PROTEİN-KENETLİ RESEPTÖR REGÜLASYONU

2.6.4. KLASİK SİNYAL YOLAKLARI

Arrestinler, G protein-kenetli reseptörlerin (GPKR) sinyal iletiminde önemli görevleri olan ve aynı zamanda birçok farklı işlevi olan küçük bir protein ailesidir. Bu proteinler, GPKR'ye oldukça düzgün bir şekilde bağlanırlar ve bu bağlanma sayesinde bazı sinyal yolakları sustururlar. Aynı zamanda başka birçok hücresel sinyali kuvvetlendirerek bazı reseptörlerin internalizasyonuna da yardımcı olurlar.

Birçok araştırma, bu proteinlerin GPKR'lerin aktif ve fosforile formu ile etkileşime girme yeteneği olduğunu göstermiştir ayrıca farklı GPKR'ler için farklı özgüllüklerde etkileşime girdiklerini ve çeşitli fonksiyonel etkileri olduğu görülmüştür.

Bu fonksiyonel etkiler, hem GPKR'ler ile olan hem de altında yer alan sinyal (downstream) proteinleri ile etkileşimleriyle ortaya çıkar. Reseptörler ile olan etkileşimleri ilk başta

“klasik” G proteinine bağlı sinyalizasyonun durdurulması olarak tanımlanmıştır. Ardından bu proteinlerin reseptör internalizasyonuna neden olduğu ve “klasik olmayan” sinyal yolaklarını tetiklediği görülmüştür.

Son 15 yılda Arrestin proteinlerinin hepsinin (her 4’ünün) yapıları X-ışınları ile tanımlanmıştır. Bu proteinlerin yapıları birbirlerine oldukça benzemektedir. Temel olarak polar bir çekirdek ve menteşe gibi bağladığı iki içbükey antiparalel β tabaka bölgesinden oluşmaktadır. Fosforile reseptörler bu proteinlerin ikili B-tabaka bölgelerinin içbükey kısmına bağlanırlar ve proteinlerin içbükey tarafları aşağı akış fonksiyonlarına aracılık eden başka proteinin kenetlenmesi için geniş bir alan sağlar (64).

2.6.5. RESEPTÖR İNTERNALİZASYONU

1996 yılında birbirlerinden bağımsız bir şekilde Marc Caron ve Jeff Benovic gruplarının reseptör ve G protein iletişimi üzerindeki yaptıkları çalışmaların sonucunda, Beta Arrestin proteinlerinin reseptör internalizasyonunda da önemli bir rol oynadıkları keşfedildi (73)(59).

Her iki çalışmada da, Beta Arrestin proteinlerinin Beta2-adrenerjik reseptörlerinin internalizasyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada mutant Beta Arrestin kullanılmasının reseptör internalizasyonunu bozduğu gösterilmiştir. Bu işlevin “Beta” Arrestinlere özgü olduğu düşünülmektedir. Diğer bir deyişle, görsel Arrestinlerde reseptör internalizasyonu fonksiyonu gözlenmemiştir ve bu ayrım bize görsel Arrestinler ile Beta Arrestinler arasında büyük farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır (74).

Mekanik olarak, Beta Arrestin proteinlerinin reseptör internalizasyon etkileri, Clathrin proteinleri ile olan stokiyometrik etkileşimi neticesinde ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda Beta Arrestinlerin reseptörler aracılığı ile sitoplazma içerisinde adaptör proteinler olarak da görev yapabilecekleri öne sürülmüştür (74) (75).

2.6.6. KLASİK OLMAYAN SİNYAL YOLLARI

Çoklu sinyal moleküllerinin bir araya toplanması ve yeni sinyal iletimine yol açmaları Beta Arrestin proteinlerinin klasik olmayan işlevlerindendir (76)(77). Reseptörlerin

internalizasyonu, reseptörleri sadece hücre yüzeyinden ayırmakla kalmaz, reseptörlerin geri dönüşümüne veya degredasyonuna da yol açar, ayrıca bu işlemler esnasında yeni sinyal yolaklarını da tetikler (78).

Beta Arrestinlerin başka proteinler ile iskele kurma fonksiyonu (klasik olmayan işlevleri) çeşitli sinyal moleküllerin bir araya getirilmesini sağlamaktadır. Bu moleküller üç ana sınıfa ayrılırlar: Birinci sınıf; (a) Beta Arrestin tarafından çesitili reseptörlere sunulan (recruit) cSrc, Hck, Fgr ve Yes gibi reseptör olmayan tirozin kinazlar(non-receptor tyrosin kinazlar). İkinci sınıf; (b) MAP kinaz kaskatına (cascade) ait olan bileşenler olup hem ERK1 ve ERK2'yi aktive eden Raf, MEK ve ERK'i hem de JNK3'i aktive eden ASK1, MKK4 ve JNK3'ü kapsamaktadır. Üçüncü sınıf ise, (c) fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) ve AKT kinazlarıdır (76).

Reseptör internalizasyonu ile "klasik olmayan" G proteininden bağımsız sinyal yolaklarının aktivasyonu arasında yakın bir ilişki görülmektedir. Örneğin, MAP kinazlara yönelik sinyallerin Clathrin kaplı (clathrin-coated pit) veziküllerde meydana geldiği gösterilmiştir (57)(70). Bu işlevin reseptörlerin Beta Arrestin bağlı kaldığı sürece devam ettiği saptanmıştır (79). Geçici olarak klasik olmayan sinyallerin aktivasyonu, G proteininin aracılık ettiği etkileri takip eder ve Beta Arrestinlerin reseptöre bağlanması, hem klasik olan hem de klasik olmayan sinyalleri etkileyebilmektedir (80).

Beta Arrestin ve dinamin bağımlı internalizasyon, hücre içi sinyal iletiminin ilk aşamasında gereklidir. Beta Arrestinler, zamansal ve uzamsal (temporally and spatially) olarak düzenlenmiş reseptör aracılı sinyalizasyon modelini üç sinyal dalgası şekilde düzenlemektedir. İlk olarak, hücre yüzeyinde G proteinlerinin aktivasyonuyla oluşan sinyali durdurlar, ikinci olarak klasik olmayan sinyal oluşumunu tetiklerler (reseptör olmayan tirozin kinazlar, MAP kinazlar, PI3 kinaz ve AKT), ve son olarak G proteinlerinin hücre içi aktivasyonunun aracılık ettiği üçüncü bir sinyal oluşumuna izin verirler (80)(81).

2.7. KANSERLERDE BETA ARRESTİNLERİN ROLÜ

Genellikle tüm dokularda ifade edilen, görsel olmayan Beta Arrestin1 ve Beta Arrestin2 proteinleri, başlangıçta G protein-bağlı reseptörlerin duyarsızlaştırma ve internalizasyon süreçlerinde aldıkları roller ile bilinirler (73)(82). Sonradan yapılan çalışmalar sonucunda, Beta Arrestinlerin sitoplazma içerisindeki farklı proteinleri bir araya getirmeleri (recruitment) ve aynı zamanda bazı hücresel işlemleri düzenlemek için çekirdek ve sitoplazma arasında yer değiştirdikleri saptanmıştır (83).

Beta Arrestinler kanser oluşum süreci içerisinde, hem sitoplazmada hem de çekirdekte çeşitli işlevler gerçekleştirirler. Son gelişmelerde, Beta Arrestinlerin kanserogenezis sırasında hücre ölümünün inhibisyonu, tirozin kinaz yolaklarının aktivasyonu ve gen ifade düzenlenmesinin regülasyonu gibi, yeni ve çok önemli rolleri olduğu ortaya çıkmıştır (84)(85). Beta Arrestinlerin bahsedilen bu yeni görevleri invazyon, metastaz hücre proliferasyonu ve hücre göçü gibi kanser oluşma sürecinde kilit öneme sahip hücresel düzenlenmelerle yakından ilişkilidir. Çizelge 2.1.'de görüldüğü gibi bahse konu olan bu süreçler ve etkiler hücrelerin hem sitoplazmasında hem de çekirdeğinde gerçekleşen çeşitli etkiler ile düzenlenmektedir (86).

Beta Arrestinler hücrelerin kontrolsüz büyümesine de sebebiyet verebileceği çeşitli hücre hatlarında apoptoz sürecinin düzenlenmesinde rol aldıklarından bahsedilmektedir (87)(88).

Son çalışlmalarda Beta Arrestinlerin hücre çekirdeği içerisinde yaptığı bazı etkiler tanımlanmıştır ve ilk olarak 2001 yılında Beta Arrestinlerin gen transkripsiyonun düzenlenmesindeki rolü aydınlatılmıştır. Bu çalışmada, Beta Arrestin 1'in lenfosit arttırıcı faktörün (lymphoid enhancer factor, LEF) transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu düzenlediği gösterilmiştir (89). Beta Arrestin 1 proteinleri çekirdeğe geçtiklerinde, histon asetiltransferaz, p300, ve cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (cAMP response element-binding protein) ile etkileşime girerek histon asetilasyonunu ve gen transkripsyonunu düzenledikleri gösterilmiştir (90).

Çeşitli kanser türlerinin evrelendirilme derecesi arttığında Beta Arrestinlerin lokalizasyonunda ve seviyelerinde değişiklikler olduğu belirtilmiştir (91).

β-Arrestinlerin kanser üzerinde in vivo etkileri, farelerde tümör modeli oluşturularak gösterilmiştir. Örneğin, Beta Arrestin 1'i aşırı eksprese eden transgenik farelerde, tümör büyümesinin hızlandığı ve anjiyogenezin arttığı görülürken, Beta Arrestin 2 nakavt farelerde oluşturulan akciğer kanseri modelinde, metastaz ve tümör büyümesinde artış olduğu görülmüştür (92).

Çizelge 2.1. Beta Arrestinlerin kanser türleri özerinde bulunan etkileri (86).

Tümor	***βarr***	**Tümor metastazı ve ilerlemesinde olan rolleri**
Ovarian cancer	β-arr1/β-arr2	Chemoresistance, angiogenesis, invadopodia, invasion, EMT, metastasis
Lung cancer	β-arr1/β-arr2	EMT, invasion, chemoresistance
Prostate cancer	β-arr1/β-arr2	Cell growth, migration, invasion, EMT, angiogenesis, metastasis
Acute lymphoblastic leukemia	β-arr1	Cell propagation and senescence
Chronic myeloid leukaemia	β-arr1/β-arr2	Tumor cells initiation and growth, stemness
Colorectal cancer	β-arr1/β-arr2	Cell proliferation, apoptosis, chemoresistance, migration, invasion and metastasis
Gastric cancer	β-arr1	Cell proliferation
Osteosarcoma/ Ewing's sarcoma	β-arr1	Cell sensitivity, proliferation and invasion
Breast cancer	β-arr1/β-arr2	Cell proliferation, apoptosis, chemotaxis, invasion, invadopodia, metastasis, angiogenesis, multidrug resistance
Medulloblastoma	β-arr1/β-arr2	Cancer stem cells self-renewal
Renal cancer	β-arr2	Cell growth, metastasis
Melanoma	β-arr1	Cell migration, vasculogenic mimicry
Pancreatic cancer	β-arr2	Cell proliferation and invasion

2.8. BETA ARRESTİNLER VE MEME KANSERİ

Beta Arrestin'lerin meme kanseri üzerindeki etkileri konusundaki çalışmalar sayıca azdır. Bu nedenle Beta Arrestinlerin meme kanseri üzerindeki rolü iyi tanımlanamamıştır (93). Bu konuda yapılan ilk araştırmada, Beta Arrestin 1 ve 2'nin MDA MB-231 metastatik meme kanseri hücre hatlarında PAR-2-aracılı (protease activated receptor 2) hücre göçünde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (94)(93). Beta Arrestin'lerin siRNA'sı veya bir MEK-1 inhibitörü kullanımı sonrasında, meme kanseri hücrelerinin migrasyonunun azaldığı görülmüştür. Bu çalışmanın önemli tarafı, Beta Arrestinlerin G-protein sinyal sonlandırıcıları olarak bilinen görevinin dışında yeni bir işlevinin daha gösterilmesi olmuştur (93). Başka bir çalışmada ise βArr'lerin LPA reseptörünün sinyal iletiminde yer aldığı gösterilmiştir. LPA, biyolojik olarak aktif bir fosfolipittir ve spesifik GPKR'lerin aktivasyonuna bağlı olarak çeşitli hücresel işlevleri düzenleyebilmektedir. LPA'nın meme kanseri hücre migrasyonu, invazyon ve metastazdaki rolü iyi araştırılmıştır. Aynı zamanda, Beta Arrestinlerin Ral GTPase bağımlı bir yolak aracılığı ile LPA'nın migrasyon üzerindeki etkilerine de aracılık ettiği gösterilmiştir (95).

Genel olarak, Beta Arrestin proteinlerinin ekspresyonu ve klinik etkileri üzerinde az sayıda çalışma yapılmıştır.İki büyük kohort çalışmasından elde edilen verilerin değerlendirildiği 2011'de yapılan bir çalışmada, tümör hücreleri ve stromal hücrelerdeki βArr1'in ifade farklılıklarının klinik önemi araştırılmıştır ve çalışma sonucunda kanser hastalarının histolojik derece, tümör büyüklüğü ve tümörün evresi gibi verileri ile immünohistokimyasal analizlerle saptanan Arrestinin doku ekspresyonu düzeyleri arasında korelasyon bulunmuştur (96).

2.8.1. MEME KANSERİNDE BETA ARRESTİN SEVİYELERİ

Beta Arrestin proteinleri her meme kanseri tipinde farklı seviyelerde ifade edilmektedir. Östrojen negatif meme kanserleri ve üçlü negatif meme kanserlerinde tümör büyüklüğü ve tümör agresifliği gibi klinik parametreler ile Beta Arrestin miktarı arasında yakın bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Her iki tür kanserde de tümörün agresifliği artarken Beta

Arrestin 1 seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Beta Arrestin 2 proteininin ifadesi, sadece progesteron pozitif kanserlerde istatistiksel olarak anlamlı düşük düzeyde görülmüştür (97)(98).

Meme Kanseri hastalarının doku örneklerini kantitatif real-time PCR (qPCR) ile incelendiğinde, Beta Arrestin 1 veya 2 proteinlerinde ifade değişikliği ve bu proteinlerin mRNA seviyelerinin kanserin evresine göre ne şekilde değiştiği belirtilmiştir (95). İnsan tümörlerinde Beta Arrestin proteinlerin ifade farklılıkları Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir (99).

Çizelge 2.2. βArr1 ve βArr2 proteinlerin kanser türlerinde bulunan ifade düzeyleri (99).

	Arrestin ifade düzeyleri			
Kanser	β-arr1	β-arr2	Yöntem	İlgili klinik özellikler
Breast	Increase	(Non-significant increase)	qPCR	↑ β-arr2 transcripts in advanced cancer (stages I–IV) versus stage 0 non-invasive cancer
Breast	Decrease	Increase	qIF	↓ β-arr1 and ↑ β-arr2 levels in luminally derived tumours associated with ↓ survival
Breast	Increase	N.D.	qIF	↑ β-arr1 expression in IDC and mIDC. VEGF expression positively correlated with β-arr1
Breast	High or low	N.D.	IHC	Low or high β-arr1 expression levels in tumour stroma predicts clinical outcome
Glioblastoma	Increase total β-arr1 Decrease p-β-arr1: total β-arr1	N.D.	IHC, WB	↓ p-β-arr1 correlates with poor survival in grade IV glioblastoma
ALL	Increase	N.D.	qPCR, WB	↑ β-arr1 expression positively related with risk stratification. Notch 1 expression inversely correlated with β-arr1
Prostate	N.D.	Inverse correlation between β-arr2 and AR levels	IHC	N.D.
Ovary	Increase	N.D.	IHC	Increased co-expression of β-arr1 with ETAR in advanced cancer stages (grades 3–4)
Lung	Increase total β-arr1 Increase nuclear localisation	N.D.	IHC	↑ total and nuclear expression of β-arr1 in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and bronchio-alveolar carcinoma

İnvazif olmayan meme kanseri (evre 0) ile invaziv olan (evre 1'den evre 4'e kadar) meme kanserleri arasındaki β-arr2 proteininin ifade seviyeleri arasında anlamlı oranda fark bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, Evre 0'da evre 1-4'e göre β-arr2 seviyesi anlamlı olarak daha az bulunmuştur yine aynı çalışmada β-arr1'in ifadesi evre 1-4'te, evre 0'a göre hafif bir artış göstermiş, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (99).

Beta Arrestin 1 protein seviyesinin azalmasının ve Beta Arrestin 2'nin artmasının, kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, meme kanserinin ilerlemesi sırasında B-arr2 seviyesinin arttığını ve B-arr1 ifadesinin azaldığını ve bu değişimlerin, hastanın sağkalımının azalmasıyla bağlantılı olduğunu göstermektedir(97). Başka bir çalışma, β-arr1 protein düzeyinin normal meme dokusunda daha az olduğunu, invaziv duktal kanser (IDC) ve metastatik IDC'de ise yükseldiğini belgelemiştir (100).

Bu çalışmaları birlikte değerlendirdiğimizde, Beta Arrestin protein ifadesinin artması veya azalmasının meme kanserinin ilerlemesi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar çelişkili görünebilir, meme kanserinin ilerlemesi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar çelişkili görünebilir, bunun nedeni büyük olasılıkla, sitoplazmadaki kritik rollerini yerine getirilmesi için Beta Arrestin proteinlerin konsantrasyonunun önemli olmasıdır. Aynı zamanda Arrestinler çeşitli proteinleri zamansal ve uzamsal olarak bir araya getirerek proteinlerin biyolojik rollerini değiştirebilmektedir. Bu nedenle Beta Arrestin proteinlerin seviyelerindeki değişiklikler, hücrelerde oluşan sinyalin bozulmasına veya bir yolağın işleyiş yönünü değiştirerek hastalığın ilerlemesine veya ilerleyişinde duraksamaya neden olabilir (101).

2.9. BETA ARRESTİN VE PROLİFERASYON

Beta Arrestinlerin proliferasyon üzerindeki etkileri halen tartışılan bir konudur. Beta Arrestin proteinlerinin hücre proliferasyonuna olan etkilerinin genellikle, ERK1/2 ve AKT aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Beta Arrestinlerin G protein aracılığıyla ERK1/2'yi hücre çekirdeğine yönlendiren sinyaller arasındaki dengeyi kontrol ederek aynı zamanda uzun

süreli sitozolik ERK1/2 aktivitesi sonucunda oluşan cevapları da kontrol ettikleri gösterilmiştir (102)(71).

Bazı çalışmalarda β-arr1 proteinlerinin PI3K aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu aktivasyonun takip eden süreçte, AKT'ın fosforilasyonuna ve apoptozun azalmasına neden olduğu gösterilmiştir(103). Başka bir çalışmada, insülin reseptörünün aktivasyonu sonucunda β-arr2 proteinlerinin, AKT ve Src proteinlerini bir araya getirerek AKT aktivasyonuna yol açabileceği gösterilmiştir (92).

Yukarıda açıklanan pozitif düzenleyici rollerinin aksine, Beta Arrestinler farklı mekanizmalar ile PI3K / AKT yolunu inhibe de edebilirler. Arrestin 1 ve 2'lerin, PAR-2 reseptör aracılı PI3K aktivitesini, doğrudan inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (104) bu bilgiyi destekler nitelikte Beta Arrestinler fosfatazları, AKT ile bir araya getirerek, sinyalizasyonu "sonlandırabilirler". Örneğin, Beta Arrestin 2, dopamin (D2) reseptörünün aşağısındaki AKT proteini ile PP2A'yı bir araya getirerek, AKT'ın defosforilasyonuna ve bunun sonucunda da sinyalin sonlandırılmasına aracılık etmektedirler (105).

Beta Arrestin proteinleri proliferasyona olan etkilerini PTEN proteini aracılığı ile de gösterebilirler. Beta Arrestinler, PTEN / PI3K / AKT yolağı boyunca çok sayıda müdahale noktasına sahiptir ve bu yolakta hem negatif hem de pozitif düzenleyici olarak rol oynayabilirler (99).

2.10. BETA ARRESTİNLER VE APOPTOSİS

Beta Arrestinlerin GPKR aracılı apoptozun düzenlenmesinde rol aldıkları son yıllarda çalışmalarda çokça tartışılmıştır. Bu çalışmalara bakıldığında, Beta Arrestin proteinlerinin hücrelerde hem apoptoziz hem de anti apoptoziz yönünde etki gösterebileceği görülmektedir.. Bir çalışmada, Beta Arrestinlerin endotel hücrelerde eksprese edilen nörokinin-1 reseptörü (NK1R) üzerinden anti-apoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir. Beta Arrestinlerin, NK1R- βArr -Src-ERK'den oluşan bir kompleksin oluşumunu sağladığı ve ardından ERK1/2 aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (106).

Başka bir çalışmada ise çeşitli GPKR'lerin (N-formil peptidi reseptörü, AT1AR, V2R ve CXCR2) uyarılmasının, βArr1 ve βArr2 nakavt edilmiş MEF hücrelerinde apoptozu başlatabildiği gösterilmiştir. Bu hücrelerin βArr ifadesi geri kazanması, GPKR uyarılmasıyla oluşan apoptozda azalmaya sebep olmuştur (107)(108).

Başka bir çalışmada Beta Arrestin 2'yi eksprese eden hücrelerde, Beta Arrestin 2'nin C-terminal kuyruğunda apoptoz önleyici diziler bulunmuştur, bu hücrelerde Beta Arrestin2 adaptör proteinleri yokluğunda, apoptozun gerçekleşmediği görülmüştür (109).

Yukarıda geçen çalışmalarla karşıt olarak, Beta Arrestin proteinlerinin NFkB aracılığı ile anti-apoptotik sinyalizasyonu baskıladığı ve dolayısıyla apoptozu arttırdığına yönelik bulgular da vardır (110)(111).

Bu çalışmalar özetlenecek olursa, Beta Arrestinlerin hücre ölümü ve sağ kalımına olan etkileri birçok farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (112). Beta Arrestin proteinlerinin apoptoz ve hücre sağkalımı üzerindeki etkisini daha iyi anlamak için her kanser türüne özgü farklı deney ve yöntemler tasarlanarak uygulanmalıdır.

2.11. BETA ARRESTİN PROTEİLERİ VE İNVASYON, MİGRATİON

Beta Arrestin proteinleri, kanser hücrelerinin migrasyonu ve invazyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Yapılan güncel araştırmalarda Beta Arrestin proteinlerinin çeşitli kanser türlerinin migrasyonunda ve invazyonunda önemli görevleri olduğundan sıkça bahsedilmektedir.

Bu proteinlerin migrasyona olan etkileri ilk olarak Beta Arrestin 2 nakavt farelerden elde edilen lenfositler üzerinde gösterilmiştir. Çalışmada, nakavt tip farelerin lenfositlerinde CXCR aracılı hücre hareketliliğinin normal tiplere göre azaldığı görülmüştür (113). Bu çalışmanın devamı mahiyetindeki bulgularda, CXCR aracılı hücre migrasyonunun Beta Arrestinlere bağımlı olduğu ve p38, MAPK, SAPK ve ERK1 / 2 yolaklarındaki aktivasyon artışıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Kanser hücreleri düzeyinde, siRNA aracılığıyla Beta

Arrestin protein ifadesini susturulduğunda, hücre migrasyonunda ve migrasyonla ilişkili olan sinyalizasyon artışında, belirgin azalma tespit edilmiştir (114).

Transgenik farelerde Beta Arrestin 1 protein'in aşırı ifade edilmesinin, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunun artmasına, MMP9 aktivitesinde artışa ve net etki olarak büyümeye neden olduğu gösterilmiştir. Aynı deneyde kanser hücreleri subkutan enjekte edildiğinde tümör oluşum süresinin kısaldığı saptanmıştır (115).

Beta Arrestinlerin, meme kanseri üzerindeki migrasyon ve invazyon etkilerine bakıldığında, LPA reseptörü ile Beta Arrestin bağlantısı öne çıkmaktadır. Lipid mediatörü lizofosfatidik asit (LPA) reseptörü migrasyona ve invazyona aracılık eden reseptör olarak tanımlanmıştır ve bu işlevini Beta Arrestin proteinlerin varlığında gerçekleştirebilmektedir. Aynı zamanda her ikisinin de meme kanserinin ileri evrelerinde ekspresyonunun arttığı görülmüştür (95).

Başka bir çalışmada, meme kanseri hücrelerinin hipoksik koşullar altında hayatta kalmalarının Beta Arrestinler ile ilişkisi olduğu öne sürülmüştür. Çalışmada, hipoksik koşullar altında meme karsinom hücrelerinin transkripsiyonel regülatörü HIF-1a'nın βArr1 ile çekirdekte stabilize edildiği tespit edilmiştir. Hif-1a'nın stabilizasyonundan sonra, vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A) ifadesinin arttığı görülmüştür.Bu artışın neticesinde, hipoksik koşullardaki hücrelerin hayatta kalması sinyallerinin Beta Arrestin aracılı olduğu gösterilmiştir (100).

Meme kanseri hücrelerinde yapılan farklı bir çalışmada, proteaz ile aktif olan reseptör-2'nin (PAR-2), ERK 1/2'yi aktive etmesi ve ardından tümör hücrelerinde migrasyonu arttırtması için her iki Beta Arrestin proteininin toplanması ve bu proteinlerin ERK 1/2 ile kompleks oluşturması gerektiği gösterilmiştir (93).

2.12. BETA ARRESTİN VE HÜCRE DÖNGÜSÜ

Kanser,hücre döngüsü süreçlerinin anormal bir biçimde ilerlemesi sonucunda kontrolsüz hücre bölünmesi olarak basitçe tanımlanabilir. Hücre döngüsü, genetik materyalin çoğaltılması ile hücre bölünmesini sağlayan oldukça organize ve sıkı bir şekilde kontrol

edilen bir süreçtir. Memelilerde, hücre döngüsü G0 / G1, S, G2 ve M fazlarına ayrılmaktadır. Hücre döngüsü farklı fonksiyonel siklinler ve onlara bağımlı kinazlar (Cyclin-dependent kinases ,CDK'ler) tarafından kontrol edilir (116). Döngünün düzenlemesinde yer alan CDK'lerin aktivitesi sürekli kontrol altındadır. CDK aktivitesi mitojenik sinyaller tarafından uyarılır. DNA hasarı olduğunda hücre döngüsünün kontrol noktalarında aktivasyon meydana gelir. Bu aktivasyonlar neticesinde hücre döngüsünü inhibe olur. İnsan kanserlerinde sıklıkla CDK'lerin anormal aktivasyonu görülmektedir. Bu aktivasyonun inhibe edilmesi ve sentetik olarak bu kinazlara karşı inhibitörler tasarlanması antikanser ilaçların geliştirilmesinde hedeflenen noktalardandır (117).

Son zamanlarda Beta Arrestin proteinlerin hücre döngüsü üzerinde olan etkileri gösterilmiştir. Bu konuda yapılan ilk çalışma proteinlerin hücre döngüsü üzerindeki etkisinin aktif IGF-1 reseptörleri üzerinden olduğunu göstermektedir. Çalışmada, IGF-1 reseptörünün, uyarıldığı zaman, Beta Arrestin1 proteini ile bağ kurduğu gösterilmiştir. Daha sonra ikisinin beraber MDM2 proteini ile bir kompleks oluşturduğu, bu kompleks oluşumunun da MDM2 proteinin proteozomal yıkımına eşzamanlı olarak ERK1/2 proteinin aktivasyonuna neden olduğunu gösterilmiştir (118).

CXCL12 kemokininin hematopoetik kök/progenitör hücrelerin göçü ve toplanması üzerinde iyi bilinen etkilerine ek olarak insan CD341 HSPC'lerinde hücre döngüsünü ve hücre sağkalımını arttırıcı işlevler sergilemektedirler. CXCR7 keşfedilene kadar, CXCL12'nin neden olduğu biyolojik etkilerden CXCR4 sorumlu tutulmuştur (114).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Son yıllarda, Beta Arrestin proteinlerinin kanser oluşumu ve gelişimi üzerindeki muhtemel etkilerini anlamak için yapılan çalışmaların sayısı hayli artmaktadır fakat bu çalışmalar, genellikle muğlak ve birbiriyle çelişen sonuçlar vermektedirler. Bu çelişki ve belirsizlik hem in-vivo ve hem in-vitro çalışmalarda araştırmacının karşısına çıkmaktadır. Bu çelişkilerin bir nedeninin Beta Arrestin'lerin G protein kenetli reseptörler ile olan etkileşiminin yanında bu proteinlerin G proteinlerden bağımsız olarak sitoplazma ve çekirdekte yaptığı karmaşık etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Meme kanseri dışındaki kanserlerde yapılan çalışmalarla paralel olarak, Üçlü negatif meme kanseri üzerinde yapılan Beta Arrestin bağımlı çalışmalarda da hem in-vitro ve hem in-vivo sonuçlarının arasında tutarsızlık olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışması, Beta Arrestin 1 ve 2 proteinlerinin Üçlü negatif meme kanserini temsil eden hücre hatları üzerindeki hücre çoğalmasını önleyici veya tetikleyici etkilerini moleküler yöntemler ile hücresel düzeyde aydınlatılması ve incelenmesi üzerine tasarlanmıştır. Çalışma, tezin başlığında da sunulduğu gibi Beta Arrestinlerin Üçlü negatif meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada diğer meme kanserlerine kıyasla daha invaziv olmaları ve standart tedavilere dirençli olmaları nedeniyle Üçlü negatif meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. Bu çalışmanın amaçlarından birisi de Beta Arrestin 1 ve 2 proteinlerinin reseptörlerden bağımsız olarak yapabileceği görevleri daha iyi anlayabilmektir.

Sonuç olarak bu çalışmayı, Beta Arrestinler ve etkileşime geçtiği hücresel yolakları daha iyi anlamak ve ileride bu proteinlerin muhtemel ilaç hedefi ya da biomarker olarak kullanılmasına katkı sunmak için gerçekleştirdik.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu çalışmada meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır, hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection)'dan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücre hatlarına ait bilgiler Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları genel bilgileri

Tarih	**Pasaj numarası**	**Hücre hattı**	**Hücre tipi**	**Kullanılan besiyeri ve katalog numarası**
25.02.2016	18	MDA-MB-231	Üçlü Negatif Meme kanseri	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12
25.02.2016	16	MDA-MB-468	Üçlü Negatif Meme kanseri	Eagle's minimal essential medium- (EMEM)

Çalışma boyunca kullanılan materyaller (kimyasal maddeler ve kitler), katalog numaraları ve temin edildikleri marka adları ile birlikte Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Madde Adı	**Marka**	**Katalog Nomarası**
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega	E2311
RNeasy extraction Kit	Qiagen	#74106
Plasmid izolasyon kit	GeneJET Plasmid Maxiprep Kit	K0491
cDNA Kitti	iScript cDNA synthesis (Bio-Rad,) kit	1708891
TurboFectin 8.0 Transfection Reagent	Origene	TF81001
HiPerFect Transfection Reagent	QIAGEN	301705
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen	11668019
Opti-MEM	Thermo Scientific	Gibco-51985-026
Plasmid Transfection Medium	Santa Cruz Biotechnology	sc-108062
siRNA Transfection Medium	Santa Cruz Biotechnology	sc-36868
β-Arrestin-2 siRNA	Santa Cruz Biotechnology	sc-29208
β-Arrestin-1 siRNA	Santa Cruz Biotechnology	sc-29741
Control siRNA-A	Santa Cruz Biotechnology	sc-37007

β-Arrestin-2 Antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-13140
ErbB-3 Antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-7390
TGFβ2 Antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-374659
EGFR Antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-53274
IGF-IR Antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-81464
Met Antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-8057
GAPDH Antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724
β-Actin Antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-517582
Mouse anti-rabbit, Secondary Antibody,	Santa Cruz Biotechnology	sc-2357
Goat anti-rabbit, Secondary Antibody,	Santa Cruz Biotechnology	Sc-31460
Donkey anti-mouse, Secondary Antibody,	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2314
Rabbit anti-goat, Secondary Antibody,	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2768
β-Arrestin-2 Antibody	Santa Cruz Biotechnology	sc-9182
Snail-Monoklonal Antikor	Cell Signaling Technology	C15D3
E-Cadherin-Monoklonal Antikor	Cell Signaling Technology	24E10
Vimentin- Monoklonal Antikor	Cell Signaling Technology	D21H3

Beta Arrestin 1 Human Untagged Clone	OriGene	SC303424
Beta Arrestin 2 Human Untagged Clone	OriGene	SC108950
Cloning vector PCMV6-XL5	OriGene	PCMV6XL5
FITC Annexin V	BioLegend, San Diego, CA,USA	640906
propidium Iodide boyama	BioLegend, SanDiego, CA, USA	421301
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A2153
Tripsin	Biochrom	L2103
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich	F0804-500ML
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Biowest	L0615-500
Trizma-base	Sigma-Aldrich	T1503
Penycilin-Streptomycin 100X	Cegrogen Biotech	P0100-790
Metanol	Merck	34860
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich	L4509
PMSF Proteaz Inhibitörü	Thermo Scientific	36978
Glisin	Sigma-Aldrich	67419
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich	74385

Bradford Reagent	Sigma-Aldrich	B6916
Aquaguard-1 Solution	Biological Industries	01-867-1B
TEMED	Bio-Rad	1610801
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad	170-5061
Mini Trans-Blot Filter Paper	Bio-Rad	#1703932EDU
Tween 20	Bio-Rad	#1706531
Beta-merkaptoetanol	Bio-Rad	#1610710
Cihazlar		
Cihaz Adı	**Marka**	**Model**
NovoCyte Flow cytometer,	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA	2000R
xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA	xCELLigence RTCA DP - Cell Invasion & Migration
Spectrophotometer	Molecular Devices LLC, ABD	SpectraMax Plus 384
ChemiDoc MP Imaging System	Bio Rad	Universal Hood III
qRT-PCR Cihazı	Roche, Germany	Roche LightCycler 480

4.2. YÖNTEM

4.2.1. HÜCRE HATLARI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Laboratuvarımızda rutin olarak kültüre edilen ve ATCC'den temin edilen MDA-MB-231 ve MDAMB-468 Üçlü negatif meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler 75 cm^2'lik kültür flasklarında (Corning, Tewksbury, MA, ABD), içinde %10 fötal sığır serumu, 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin içeren besiyeri ile çoğaltılmıştır. MDA-MB-231 hücreleri için DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD), MDA-MB-468 hücreleri için (Eagle's minimal essential medium-EMEM), besiyerleri kullanılmıştır. Hücreler 37^0C sıcaklık ve %5 CO_2'li ortamda çoğaltılmıştır. Hücrelerin pasajlama ve deneylerde kullanılmak amacı ile belli sayıda hazırlanması aşamasında fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ve 0.1% Tripsin içeren 10 µM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) kullanılmıştır.

4.2.2. SİRNA TRANSFEKSİYONU VE KULLANILAN AJANLAR

Sağlıklı şekilde %60-%80 oranında büyütülmüş MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine Beta Arrestin1 ve 2 siRNA'ları transfekte edildi. Transfekte edilen siRNA'lar ve dizileri Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Deneyden 24 saat önce kuyu başına yaklaşık 250 bin hücre içerecek şekilde, 6'lık kültür plakalarına hücre ekimi yapıldı. 24. saat sonunda hücre dolgunluğu %70'e ulaştığında deney aşamasına geçildi. Transfeksiyon solüsyonları protokole uygun şekilde A ve B solüsyonları olarak hazırlandı; her bir 6'lık kuyu için; solüsyon A: 4µl (0.5 µg / 40 pmol) miktarlarında ilgili siRNA (β-Arrestin-1 siRNA sc-29741 veya β-Arrestin-2 siRNA sc-29208 veya kontrol siRNA sc-37007) ve 100 µl siRNA transfeksiyon medyumuolarak hazırlandı. Solüsyon B'ise aynı transfeksiyon medyumu ve 8 µl siRNA transfeksiyon bileşeni (siRNA transfection reagent- sc-29528) kullanılarak hazırlandı.

İkinci aşamada solüsyon A, solüsyon B üzerine aktarıldı 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon sonrası 0.8 ml siRNA transfeksiyon medyumu (sc-36868), A ve B karşımına ilave edildi ve hızlı bir şekilde 6'lık plakalara dağıtıldı. Transfeksiyon bileşenleri

eklenen hücreler 5 saat süre ile 37 ^{0}C sıcaklıkta ve % 5 CO_2'de inkübe edildi. 5 saatl inkübasyon sonrası %20 FBS içeren 1 ml besiyeri 6'lık plakalara ilave edildi ve 48 saat süre ile 37 ^{0}C sıcaklıkta ve %5 CO_2'de inkübe edildi. 48 saat inkübasyon sonrası, transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği Western-blot yöntemi ile ilgili proteinin düzeyinin saptanması ile kontrol edildi.

Çizelge 4.3. siRNA Transfeksyonunda kullanılan Diziler

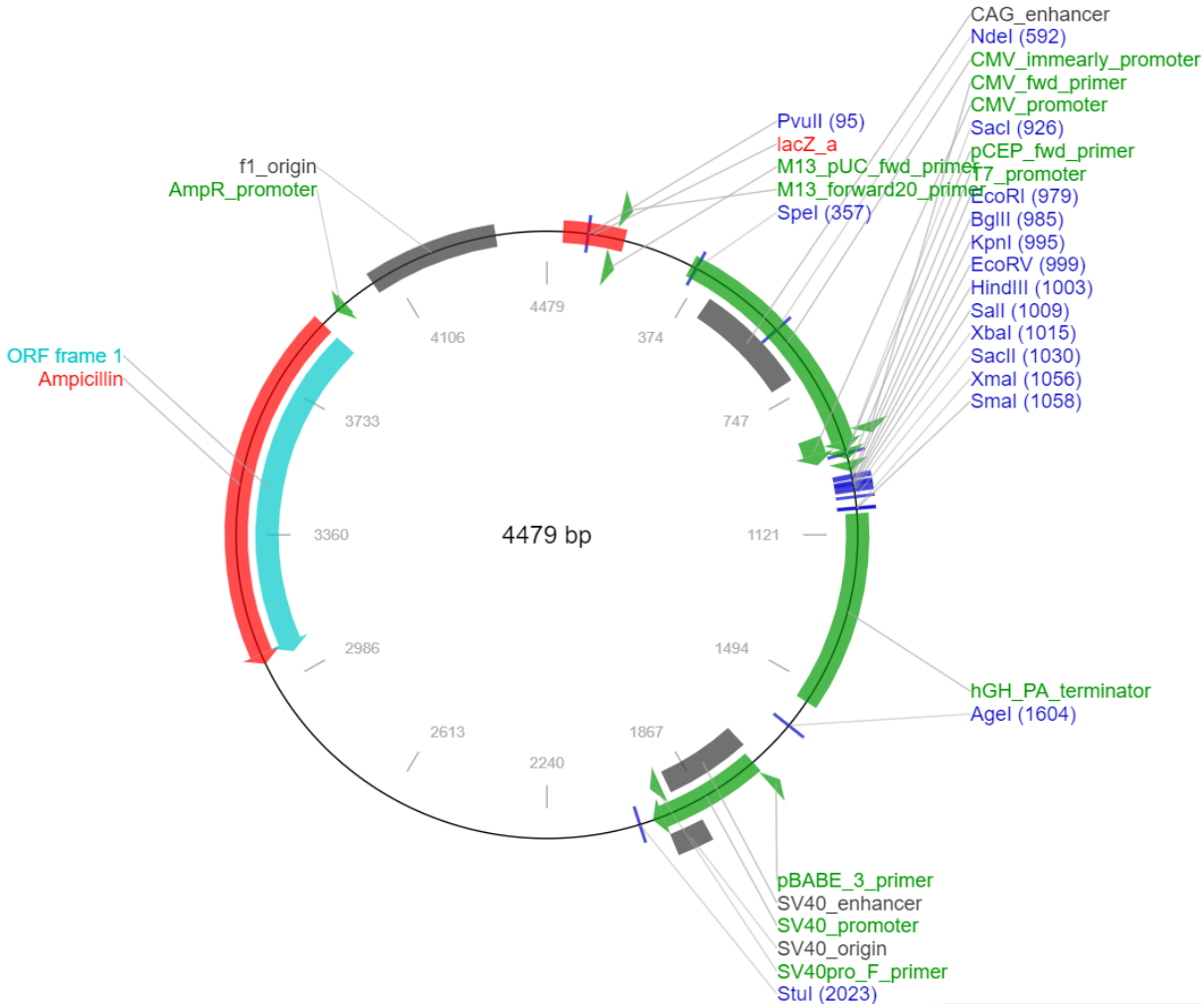
Hedef Gen	siRNA Dizisi	Firma ve Katalog no
βArr 1	5′-AAAGCCUUCUGCGCGGAGAAU-3′	Santa cruz, sc-29741
βArr 2	5′-AAGGACCGCAAAGUGUUUGUG-3′	Santa cruz, sc-29208
Kontrol siRNA	(5′-AAGUGGACCCUGUAGAUGGCG-3′	Santa cruz, sc-37007

4.2.3. BETA ARRESTİN1 VE 2 PROTEİNLERİNİN HÜCRE İÇİ İFADELERİNİN ARAŞTIRILMASI

MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri sağlıklı şekilde %70 oranında büyütüldü , Beta Arrestin1 ve 2 cDNA'ları içeren plazmidler ile Turbofection.8 (TF81001) kulanılarak transfekte edildi.. Beta Arrestin1 ve 2 ifade artışı için, OriGEN'den sağlanan βArr1 (Untagged-Human Arrestin, Beta 1, SC303424) ve βArr2 (Untagged-Human Arrestin, Beta 2, sc108950) genleri içeren pCMV6-XL5 plazmidler kullanıldı. Kontrol plazmid olarak (Şekil 4.1.) Origen'den temin edilen boş plazmid (Nontarget DNA plasmids Cloning vector PCMV6-XL5, CAT#: PCMV6XL5), kullanıldı.

Transfeksiyondan 24 saat önce 6'lık plakalara yaklaşık 200 bin hücre kültüre edildi. Hücreler 24 saat sonunda %70 dolgunluğa ulaştıktan sonra %10 FBS içeren yeni medyuma aktarıldı.

Transfeksiyon solusiyonları, kuyu başına 100 µl Opti-MEM (Gibco 51985-026) + 2 µg ilgili cDNA, βArr1 (sc303424) ve βArr 2 (sc108950) ve kontrol (Nontarget DNA plasmids Cloning vector PCMV6-XL5) cDNA'ları eklenerek hazırlandı. Ardından, cDNA solüsyonlanlarına kuyu başı 4 µl transfeksiyon8 (CAT#: TF81001) ilave edilerek 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından, hazırlanan Opti-MEM/cDNA/ Turbofection karışımı 6'lık plakalara kuyu başına yaklaşık 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Transfeksiyonun gerçekleşmesi için hücreler 48 saat 37 °C sıcaklık ve % 5 CO^2'li ortamda inkübe edildi. Deney sonunda hücrelerden total protein izolasıyonu gerçekleştirildi ve cDNA transfeksiyonu gerçekleştirilen ilgili proteinlerin ifadesi Western-blot yöntemi ile kontrol edildi.



Şekil 4.1. pCMV6-XL5 Plazmidi (119).

4.2.4. BETA ARRESTİN1 VE 2 PROTEİNLERİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE MİKTAR SAPTANMASI

Western blot deneylerinde ilgili proteinlere karşı kullanılacak antikorların miktar ve süresine ilişkin optimizasyon çalışmaları deneylerden önce laboratuvarımızda yapılmıştır.

4.2.4.1. Protein İzolasyonu Ve Lizatının Hazırlanması

Hücreler üzerinde yapılan deneylerin sonucunda ortaya çıkabilecek protein değişikliklerini incelemek amacı ile protein izolasyonu yapıldı.

Başlangıçta hücreleri içeren plakalar buz üzerine alınarak PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine Çizelge 4.4.'de görüldüğü gibi önceden hazırlanan lizis tamponu eklendi, tüm hücreler spatula kullanılarak kazındı ve plakalardan toplandı. (6'lık plakalarda her kuyu için 120 µl olacak şekilde lizis tamponu kullanılmıştır). Toplanan hücreler soğuk ependorflara aktarıldı ve 5 dakika buz içinde bekletildi. Örnekler santrifüj edilikten sonra süpernatantlar deneyin devamı için yeni ependorflara aktarıldı.

Çizelge 4.4. Protein izolasyon için kullanılan lizis buffur

- 150 mM NaCI
- % 1.0 Nonidet P-40 (NP-40)
- 50 mM Tris-CI
- PH'ı 7.4'e ayarlayın
- 1mM PMSF (proteaz inhibitörü-en son ekle)

4.2.4.2. Protein Ölçümü Ve Örneklerin Yürütülmesi

Çalışma boyunca elde edilen proteinlerin konsantrasyonları Bradford (Coomassie Brillant Blue) Yöntemi ile belirlenmiştir.

Bradford belirteci (Cat: B6916, Sigma-aldrich) 1:4 (1 hacim Bradford belirteci, 4 hacim ultra saf gsu) oranında sulandırıldı, ardından 190 µl miktarında ölçümünün yapılacağı 96'lık plakalara eklendi. BSA *(*Bovine serum albumin) kullanarak standart protein stoku hazırlandı *ve bu stok* solusyonu 7 kere seyreltilerek, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.0625 mg/ml'lik standart çözeltiler hazırlandı. İzole edilen protein çözeltileri 95:5 oranında sulandırarak

hazırlandı. Hazırlanan lizatlar benzer şekilde sulandırılarak ve Bradford çözeltisi eklenerek 96'lık plakalarda ölçüm spektrofotometre (SpectraMax Plus 384 Spectrophotometer, Molecular Devices LLC, ABD) kullanılarak 595 nm OD (Optik Dansite-abzorbans)'de okutma işlemi gerçekleştirildi. Protein düzeyi standart OD değerlerine göra analiz edilerek saptandı.

4.2.4.3. SDS-PAGE Jel Kalıbının Oluşturulması;

Yükleme jeli (Stacking), ayırma jeli (Separation) olmak üzere Çizelge 4.5.'de görüldüğü gibi sırayla alt ve üst iki farklı jel olarak hazırlanmıştır. Ayırma jeli incelediğimiz proteinlerin boyutuna göre %8, %10 ve %12 olarak farkılı konsantrasyonlar şeklinde hazırlanmıştır.

Her kuyucuğa eşit miktarda protein konulması amacıyla Bradford ölçüm yönteminden elde edilen sonuçlar kullanıldı. Proteinler farklı ependorflara aktarılarak ve 3:1 oranında taze hazırlanmış %10 Beta-merkaptoetanol içeren yükleme tamponu (Cat#1610710) ile karıştırıldı. Protein karışımları, 3 dakika süre ile 95 ^{0}C'de kaynar su içinde bekletilip, ardından yükleme aşamasına dek buz içerisine alındı. Hazırlanan jel, dikey elektroforez sistemine yerleştirilip, ortama taze hazırlanmış yürütme tamponu eklendi. Jelde bulunan kuyucuklara eşit konsantrasyonda hazırlanan protein örneklerinin yüklemeleri gerçekleştirildi ve örnekler 20-40 miliamper (mA) aralığında 1,5 saat süresince yürütülerek proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması sağlandı.

Çizelge 4.5. Yükleme jeli (Stacking) ve Ayırma jeli (Separation) hazırlanması

Kullanılan Maddeler	Yükleme jeli (Stacking)	Ayırma jeli (Separation)	
	%5	%7	%10
d Su	1.380	2.465	1.965
Akrilamid %30	0.329	1.167	1.667
Tris(0.5 M PH: 6.8)	0.250	1.266	1.266
SDS %10	0.020	0.050	0.050
Temed	0.020	0.050	0.050
APS %10	0.002	0.002	0.002
Toplam	2(ml)	5(ml)	5(ml)

Jeller Çizelge 4.5.'de verilen içeriğe göre hazırlanmış olup kalınlığı 0.75 -1.5mm aralığında olan camlar aralığına dökülmüştür.

4.2.4.4. Transfer Düzenekleri

Proteinleri jelden membrana geçirme işlemi yarı kuru transfer sistemi ile gerçekleştirildi. Ayarlanan yürütme zamanı bittikten sonra jeller dikkatlice yerlerinden çıkarıldı. Jellerin boyutlarına göre 045 µm'lik Polivinil fluoride **(**PVDF) membranları hazırlandı**.** Membranlar 30 sn methanol ile ıslatıldı. Membran ile filtre kağıtları bir dakika transfer tamponu içinde bekletilerek ıslanmaları sağlandı. Transfer işlemini gerçekleştirmek için transfer sandviçi denilen; aşağıdan yukarıya sırayla, filtre kağıdı/ PVDF membran / Protein içeren jel/ filtre kağıdı olacak şekilde ve kabarcık olmamasına dikkat edilerek yarı kuru transfer cihazına yerleştirildi. Islak ortam yaratmak ve elektrik akımını sağlamak ve proteinlerin jelden

membrana geçmesini gerçekleştirmek için sandviç üzerine transfer buffer eklendi. Transfer işlemi 1 miliamper (mA) 30 dk süre ile geçekleştirildi.

4.2.4.5. Bloklama ve Antikor Uygulama

Antikorların membranlar üzerindeki nonspesifik bağlanmalarını azaltmak için bloklama işlemi gerçekleştirildi. Transfer sonrası alınan membranlar, %6 yağsız süt tozu ile TBST (Tween20 içeren TBS) tampon içerisinde 90 dakika süre ile çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklandı.

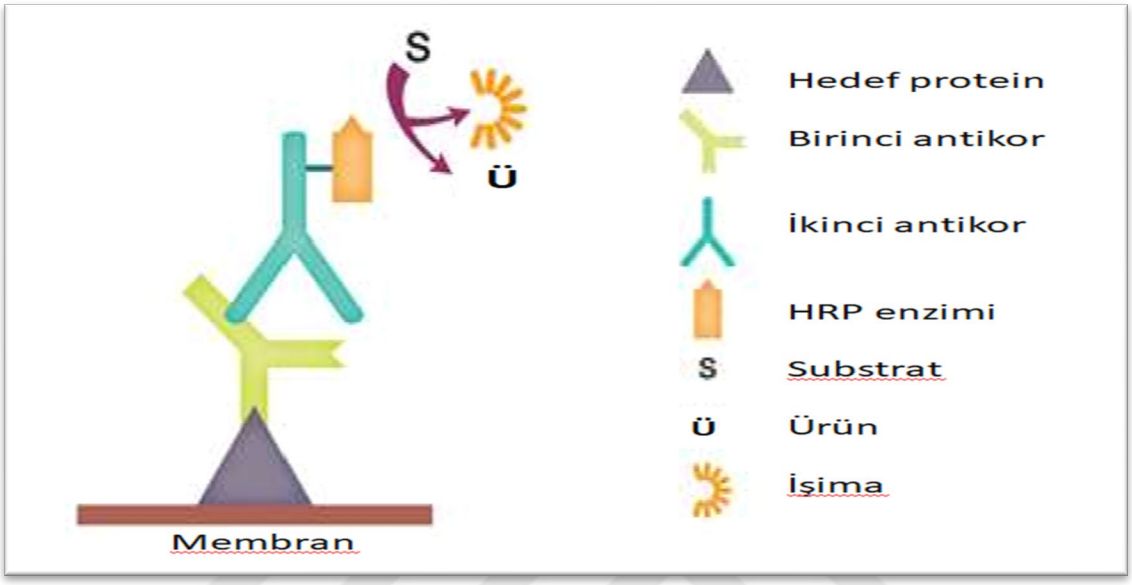
Birinci Antikor Uygulanması; Çalışma boyunca kullanılan tüm birinci antikorların miktarı, sağlandığı firmanın önerdiği konsantrasyonlar dikkate alınarak, çeşitli konsantrasyonlarda denenerek optimize edildi ve uygun konsantrasyondaki antikorlar kullanıldı. Bu antikorlar TBST ile seyreltilerek membranların üzerine konuldu. Bir gece boyunca 4 ^{0}C'lik sıcaklıkta ve yaklaşık 65 rpm hızında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranlar oda sıcaklığında TBST ile 3 kez, 10 dk ve 90 rpm hızla çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

İkinci antikor kullanımı; Membranlar, birinci antikora karşı üretilmiş olan ikinci yada sekonder denilen antikor ile, sağlanan firmanın kullanım konsantrasyonunu göre PBS ile seyreltildikten sonra oda sıcaklığında 90 dk ve yaklaşık 60 rpm'le çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranlar 90 dk'nin sonunda PBST ile 3 kez, 10 dk ve 90 rpm hız'la çalkalayıcı üzerinde ve oda sıcaklığında yıkandı.

4.2.4.6. Görüntüleme İşlemi

Görüntüleme işlemi Biorad firmasından sağlanan ChemiDoc MP Görüntüleme cihazı (Bio-Rad Laboratories, Inc) kullanarak yapılmıştır. Sekonder antikorlara bağlı bulunan horseradish peroksidaz (HRP) enzimi, ECL (Enhanced chemiluminescence) kiti (Bio - Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, ABD) içinde bulunan Lumigen PS-3 maddesini katalize edip katalizasyon sonucu olarak ışıma ortaya çıkarmaktadır (Şekil 4.2.). Bu aşamada protein bantlarını ayrıntılı bir şekilde görebilmek için, membranın tüm yüzeyi ECl kullanılarak

kapatıldı ve 5 dk karanlık ortamda bekletildi. Reaksiyon gerçekleştikten sonra ortaya çıkan ışıma ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi kullanarak görüntülendi ve kayıt edildi.



Şekil 4.2. kemilüminesans ile western blot gürüntüleme prensibi.

4.2.4.7. Protein Ekspresyonlarının Normalizasyonu Ve Dansitometrik Analizi

İlgili proteinlerin bant yoğunluklarını saptamak amacıyla Image Lab cihazı kullanılmıştır. Bu aşamada proteinin ifade değişikliklerini anlamak için aynı membran üzerinde GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) veya β-Actin proteininin bant yoğunluğu, referans olarak kullanıldı. Proteinlerin görüntüleme işlemi yapıldıktan sonra, bantların yoğunluğu Image Lab yazılımını (versiyon 5; Bio - Rad Laboratories, Inc.) kullanılarak sayısal veri şeklinde kayıt edildi. Son aşama olarak ilgili proteinlerin bant yoğunlukları GAPDH veya β-Actin verilerine göre düzenlendi ve analiz işlemi gerçekleştirildi.

4.2.5. XCELLIGENCE SİSTEMİ İLE PROLİFERASYON, VE MOTİLİTE ÖLÇÜMÜ

Bu aşamada hücrelerin canlı olarak proliferasyon ve motiliteleri ölçülmüştür. Deneyler, xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı (Real-Time Cell Analysis, RTCA) kullanılarak yapılmıştır. XCELLigence sistemi hücrelerin gerçek zamanlı olarak izlenmesine, aynı zamanda hücrelerin proliferasyon ve motilite verilerini rakamsal olarak deney süresi boyunca, fizyolojik koşullarda yüksek hassasiyetler ölçmeyi sağlamaktadır. Hücre proliferasyon ölçümleri için 16 kuyucuklu E-plate (Elektronik Plat) ve motilite için CIM-plate (cell invasion and migration plate) kullanılmıştır.

CIM-plateler 2 katlı yapıya sahip olup; üst kısım zar işlevi gösteren bir tabaka ile alt kısımdan ayrılmaktadır. Motilitenin ölçüm işlevi temel olarak hücrelerin plate'in üst kısmından alt kısmına geçiş miktarının ölçümü ile gerçekleşmektedir.

Bu aşamada proliferasyon ve motilite ölçümüleri yapılacak olan MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerine, ölçümden 24 saat önce Beta Arrestin1 ve 2 cDNA ve siRNA transfeksyon işlemleri yapıldı.

İlk aşamada, proliferasyon ölçümü için 16'lık E-plate'in her bir kuyucuğuna 100 ul besiyeri (FBS içeren ve hücrelere özgü besiyeri) eklenerek cihaza yerleştirildi ve 1 saat süresince bazal ölçüm yapıldı.

Motilite ölçümü için CIM-plate'in üst kısmına 50 ul FBS içermeyen medium; alt kısmına da 160 ul FBS içeren besiyeri eklenerek background ölçüm işlemi gerçekleştirildi.

Proliferasyon ölçümü için 16lık plate'ı-in her bir kuyucuğunda transfekte edilmiş ve transfekte edilmemiş hücreler (kontrol olarak) 100 ul besyeri içinde (toplam 200 ul besyeri) ve 5000 hücre olacak şeklinde kültür edilidi.

Motilite ölçümü için her bir kuyucuğa 160 ul FBS içermeyen besiyeri ve 40,000 hücre olarak şeklinde ekim yapıldı. Ekim işlemi yapıldıktan sonra plateler xCELLigence cihazındaki yerlerine yerleştirilerek % 5 CO_2, 37 ^{O}C ortamda inkübe edildi. Proliferasyon ve motilite

ölçümlerinin yapılması için cıhaz, her 15 dakikalık aralıkla ölçüm yapacak şekilde ayarlanarak 48 saat süre ile ölçüm işlemi gerçekleştirildi. Son aşamada xCelligence systeminden elde edilen veriler ve grafikler hücrelerin çoğalma, ikiye katlama (doubling time) ve motilite indeksi zamana bağlı olarak analiz edildi.

4.3. AKIŞ SİTOMETRİ İLE HÜCRE DÖNGÜSÜ VE APOPTOZ İNCELENMESİ

Akış sitometri deneyleri NovoCyte Flow cytometer (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, ABD) cıhazı, FITC Annexin V (640906, BioLegend, San Diego, CA,ABD) ve propidium iodide boyama (421301, BioLegend, SanDiego, CA, ABD) kitleri kullanarak yapılmıştır. Akış sitometri deneylerinde, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerine Beta Arrestin1 ve 2 proteinlerin cDNA transfeksyon işlemeleri gerçekleştirdikten sonra apoptosiz ve hücre döngüsü incelemeleri yapılmış ve NovoExpress 1.0.2 yazılımı kullanılarak veri analizi gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. APOPTOZ VE NEKROZ ANALİZİ

Apoptoz deneyi için MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerine deneyden 24 saat önce Beta Arrestin1 ve 2 proteinlerin siRNA ve cDNA transfeksyon işlemi yapılmıştır.

Apoptoz incelemesi aşağıdaki aşamalar takip ederek gerçekleştirilmiştir:

İlk aşamada transfekte edilmiş ve edilmemiş hücreler (kontrol hücreler) 6'lık plaklardan tripsin aracılığıyla toplanmış; toplanan hücreler binding buffer denilen HEPES tamponu ile (yaklaşık 1 ml tampon içinde 1 milyon hücre olacak şekilde) süspanse edildi. Yıkama işlemi (tripsin uzaklaştırma) yapılıp, Hepes/ hücre süspansiyonundan 100 ul (yaklaşık 50,000 hücre) olacak şekilde alınarak, üzerine 3 ul FITC Annexin V boyası (Biolegend) eklendi. Ardından taze hazırlanmış 50 ug/ml konsantrasyonundaki propidium iodide boyama solüsyonundan 10 ul karışımın üzerine eklenerek oda sıcaklığı ve karanlık ortamda 30 dakika boyama işleminin gerçekleşmesi için bekletildi. 30 dakika sonunda hücreler buz üzerine alındı ve pipetleme işlemi yaparak cihaza yüklendi. Veri analizi için cihazın kendi

yazılım programı (NovoExpress 1.0.2) kullanıldı. Elde edilen veriler sayısal ve grafiksel veri şekline çevrilerek analiz edildi.

4.3.2. HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

Hücre döngüsü deneyı için MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerine deneyden 24 saat önce Beta Arrestin1 ve 2 proteinlerin siRNA ve cDNA'ları transfekte edildi. Hücre döngüsü analizi aşağıdaki aşamalar takip edilerek gerçekleştirildi:

Hücre döngüsü analizini başlamadan 24 saat önce kullanılan hücrelere Beta Arrestin1 ve 2 proteinlerinin cDNA ve siRNA aktarım işlemi 6'lık plakalarda gerçekleştirildi.

İlk aşamada transfekte edilmiş ve edilmemiş hücreler (kontrol hücreleri) 6'lık plaklardan tripsin kullanarak toplandı. Toplanan hücrelerde, PBS tamponu aracılığı ile yıkama ve tripsin uzaklaştırma işlemi yapıldı. Hücrelerin fiksasyonu için % 70 soğuk etanol kullanıldı ve 250 ul etanol ile süspanse edilen hücreler 30 dk, 4 ^{o}C buzdolabında inkübe edildi. -20 C Fiksasyon işleminin sonunda hücrelerden alkolün uzaklaştırılması için 2 kere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kullanacak olduğumuz PI boyasının RNA ile etkileşmesini engellemek için, hücrelerin üzerine 50 ul ve 200ug/ml olacak şekilde RNAase eklenerek 15 dakika, 37 ^{o}C 'de bekletildi. Bekleme süresinin sonunda taze hazırlanmış 50 ug/ml konsantrasyonundaki PI solüsyonundan 200 ul hücre lizatının üzerine eklendi. Hücreler 30 dakika 37 ^{o}C sıcaklıkta inkübe edildi. Son olarak hücre klamp oluşumunu engellemek için pipetleme işlemi yapıldı ve hücreler NovoCyte Flow sitometri cihazına yüklendi. Deney sonunda elde edilen veriler cihazın kendi yazılım program (NovoExpress 1.0.2) kullanarak analiz edildi.

4.3.3. MİKRODİZİN TESTİ İLE SİRNA IFADELERİNİN DÜZEY İNCELENMESİ

MDA-MB-231 hücrelerinin Beta Arrestin1 ve 2 cDNA transfekte edilmiş ve edilmemiş (kontrol) hücrelerinde tüm genom çapında gen ifade profilini incelemek için Mikrodizin analizi yapıldı. Bu iş için İlk aşamada, MDA-MB-231 kanser hücreleri 6'lık plakalarda kültür edildi ve hücrelerin %70 konfulense ulaşması beklendi. Hücreler beklenen konfluense

ulaşınca Beta Arrestin1 ve 2 proteinlerinin cDNA'ları transfeksiyon protokollerine uygun şekilde bu hücrelere aktarıldı. Transfeksiyon işleminin başlangıcından 48 saat sonra RNA izolasyonu Qiagen firmasından tedarik edilen RNeasy Ekstraksyon Mini Kiti'nin (#74106, Qiagen) protokolü takip edilerek gerçekleştirildi.

4.3.4. RNA KALİTE KONTRULU

İzole edilen RNA'ların kalite kontrolü ve derişim tayini için spektrofotometre Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, ABD) cihazı kullanıldı. RNA örneklerinin içindeki protein ve DNA kontaminasyonu 260 ve 280 nanometre aralığındaki absorbans oranı ölçülerek belirlendi. Son aşamada RNA degredasyonunu kontrol etmek için, elde edilen RNA örnekleri hazırlanan %1,5 agaroz jeli kullanılarak yürütüldü ve 28s ve 18s RNA bantlarının temizlik ve netlikleri kontrol edildi.

4.3.5. MİKRODİZİN ANALİZİ

Mikrodizin analizi için GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) sistemi kullanılmıştır. Bu deney Beta Arrestin1 ve 2 proteinleri transfekte edilmiş ve kontrol hücreleri (Beta Arrestin içermeyen ancak plasmid transfekte edilmiş hücreler) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen total RNA'dan her bir örnek için 1 ug içerecek şekilde kullanıldı.

4.3.6. MİKRODİZİN VERİ ANALİZİ

Mikrodizin analizi için test sayısı 6 olmak üzere; Beta Arrestin1 ve 2 cDNA ve kontrol-cDNA ile transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücreleri iki biyolojik tekrar şeklinde yapılmıştır. Normalizasyon ve istatistiksel analiz için BRB Array Tools 4.3.2. stable release kullanılmıştır (120). Normalizasyon ve istatistiksel karşılaştırmalar için Bioconductor programı kullanılmıştır. Veri analizi Quantile normalizasyon yöntemi ile yapılmıştır. İstatistiksel karşılaştırmalar BRB dizi yazılımların "between group of arrays (BGA)" denilen t-testi tabanlı sınıf karşılaştırma araçlarını kullanılarak yapılmıştır. Beta Arrestin1 ve 2 proteinlerini aşırı eksprese eden ve kontrol hücreler arasındaki tüm mRNA'lar arasındakı

ifade farklıkları t testi kullanılarak, p değeri 0,05'ten düşük olmasına göre saptandı. Örneklerin hem genlere hem de örnek türlerine göre kümelenme analizi Cluster 3.0 (121) programi kullanıllarak yapıldı ve heatmap veri sunumu için treeview programı kullanıldı.

4.3.7. EŞ ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR)

4.3.8. RNA EKSTRAKSİYONU; MİKTAR VE KALİTE KONTROLÜ

Mikroarray'den elde edilen verilere göre eş zamanlı PCR yöntemi ile gen ifade analizi yapıldı. İlk aşamada, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 kanser hücreleri 6'lık plakalarda kültür edildi ve hücrelerin %80 konfulense ulaşması beklendi. Hücreler beklenen konfluense ulaşınca Beta Arrestin1 ve 2 proteinlerinin ilgili siRNA ve cDNA'ları transfeksiyon protokollerine uygun olarak bu hücrelere aktarıldı. Transfeksiyon işleminin başlangıcından 48 saat sonra RNA izolasyonu Qiagen firmasından tedarik edilen RNeasy Ekstraksyon Mini Kiti'nin (#74106, Qiagen) protokolü takip edilerek yapıldı.

İzole edilen RNA'ların kalite kontrolü ve derişim tayini için spektrofotometre Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, ABD) cihazı kullanıldı. RNA örneklerinin içindeki protein ve DNA kontaminasyonu 260 ve 280 nanometre aralığındaki absorbans oranı ölçülerek belirlendi. Son aşamada RNA degredasyonunu kontrol etmek için, elde edilen RNA örnekleri hazırlanan %1,5 agaroz jeli kullanılarak yürütüldü ve 28s ve 18s RNA bantlarının temizlik ve netlikleri kontrol edildi.

4.3.9. CDNA SENTEZİ

Elde edilen total RNA örneklerinde DNA kontaminasyonu olmadığı tespit edildikten sonra bu örneklerden ters transkriptaz PCR (RT- PCR) yöntemi ile cDNA elde edildi. Bu işlem, iScript cDNA synthesis (Bio-Rad, 1708891) kiti ile gerçekleştirildi.

Tüm cDNA reaksiyonları için, total RNA miktarı 1 µg olarak şekilde sabitlendi ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar, eş zamanlı Kantitatif PCR için kullanılmadan önce 1: 5 oranında seyreltildi ve sonraki kullanımlar için -20 °C'de saklandı.

Ters Transkriptaz PCR, SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen-ABD) kullanılarak aşağıdaki reaksiyon koşullarında beş basamaklı olarak gerçekleştirildi.

1- 10 µl RNA (10 ng/µl) 1 µl Oligo dT (0,1 µM) 1 µl random primer (0,1 µM) 1 µl dNTP (0,1 µM) hazırlanıp karıştırıldı.

2- Reaksiyon hazırlanıp karıştırıldıktan sonra 65 ºC' de 5 dk ve ardından buz üzerinde 1 dk inkübe edildi.

3- 4 µl First-Strand Buffer (5X) 1 µl (0.1 M) DTT 1 µl RNaseOUTTM Recombinant RNase Inhibitor (5000 u) 1 µl Superscript IIIRT (200 ünite/µl) Her bir tüp için yukarıdaki karışım miktarı hesaplanıp inkübe edilen tüpler üzerine eklendi.

4- 50 ºC' de 60 dk inkübe edildi.

5- 70 ºC' de 15 dk inaktive edildi. Bu reaksiyondan sonra elde edilen RNA' da genomik DNA kontaminasyonun olup olmadığı, KAPA2GTM Fast PCR Kit (KapaBiosystems, ABD) kullanılarak, β-Aktin PCR ile aşağıdaki reaksiyon koşullarında kontrol edildi. 4 µl 5X KAPA2G Buffer A veya B 0.4 µl dNTP Mix (0,1 µM) 1.0 µl Primer Mix (0,1 µM) 8.52 µl dH2O 0.08 µl KAPA2G Fast DNA Polimeraz (5 ünite/ µl) Yukarıdaki reaksiyon koşulları hazırlanıp üzerine 1 µl (10ng/µl) RNA eklendi. Reaksiyon sonrası elde edilen PCR örnekleri, %1 agaroz jelde yürütüldü. Görüntülenen bantlar, DNA pozitif kontrol bandı ile mukayese edilerek kontaminasyon olmadığı belirlendi.

4.3.10. SYBR GREEN İLE EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PCR REAKSİYONU

Eş zamanlı Kantitatif PCR (RT-PCR) elde edilen cDNA örnekleri ile Roche LightCycler 480 sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu aşamada, hedef genlere özgü primer ve SYBR Green Master Mix'i (Roche, Almanya) kullanıldı. Eş zamanlı PCR sonuçlarının analizinde ΔΔCt yöntemi ve normalizasyon faktörü olarak GAPDH kullanıldı.

4.3.10.1. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Analizi

Hedef DNA'ların çoğaltılmasının kontrolü DNA'ların erime eğrisi analizleri yapılarak sağlanmıştır.

4.3.10.2. Veri Analizi

İstenilen hedef genlerin ifade düzeyini hesaplamak için, Delta-Delta Ct METODU kullanıldı. Örneklerin qRT-PCR reaksiyonu sırasında eksponansiyel faza geçtiği, eşik siklusları (Ct)] saptanarak ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Hedef genlerin ifade seviyelerinin normalizasyonu GAPDH house-keeping (referans) geni kullanılarak yapıldı. Analiz için aşağıda verilen formül kullanılmıştır.

$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta Ct}$ target gen- $2^{-\Delta Ct}$ referans gen.

4.4. BİYOİNFORMATİK ANALİZ

4.4.1. TCGA VERİ ANALİZİ

Santa Cruz Kaliforniya Üniversitesinin sağladığı Xena tarayıcı (UCSC Xena browser) kullanarak fonksiyonel genomik ve fenotipik değişkenler arasındaki korelasyonlar tespit edildi.

Beta Arrestin1 ve 2 proteinlerin klinik verilere göre ifade seviyeleri, UCSC xena sitesinde sunulan TCGA (The Cancer Genome Atlas) veri tabanı kullanarak analiz edildi. Bu proteinlerin düzeyleri, meme tümörü dokularında, normal numunelerde ve PAM50 sınıflandırmaya göre mem kanser alt tiplerinde, Xena Tarayıcı yoluyla TCGA Meme Kanseri BRCA veri tabanı (n= 1,247) kullanılarak değerlendirildi (122) (123).

4.4.2. HEDEF GENLERİN YOLAK ANALİZİ

Beta Arrestin1 ve 2'i aşırı ifade ettğimiz hücrelerde farklı eksprese olan mRNA'ların fonksiyonel özelliklerini daha iyi anlamak için WebGestalt aracı kullanılarak, KEGG veri tabanı üzerinden yolak analizi gerçekleştirildi(124).

4.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmadaki tüm veriler ortalama ± standart hata ortalaması olarak hesaplanır iken, ‘n’ sayısı her bir durum için bağımsız deney sayısını temsil etmektedir.

Gruplar arasındaki karşılaştırmalar Student's t testi veya tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey’in post-hoc testi ile gerçekleştirildi. P değerinin 0.05’in altında olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

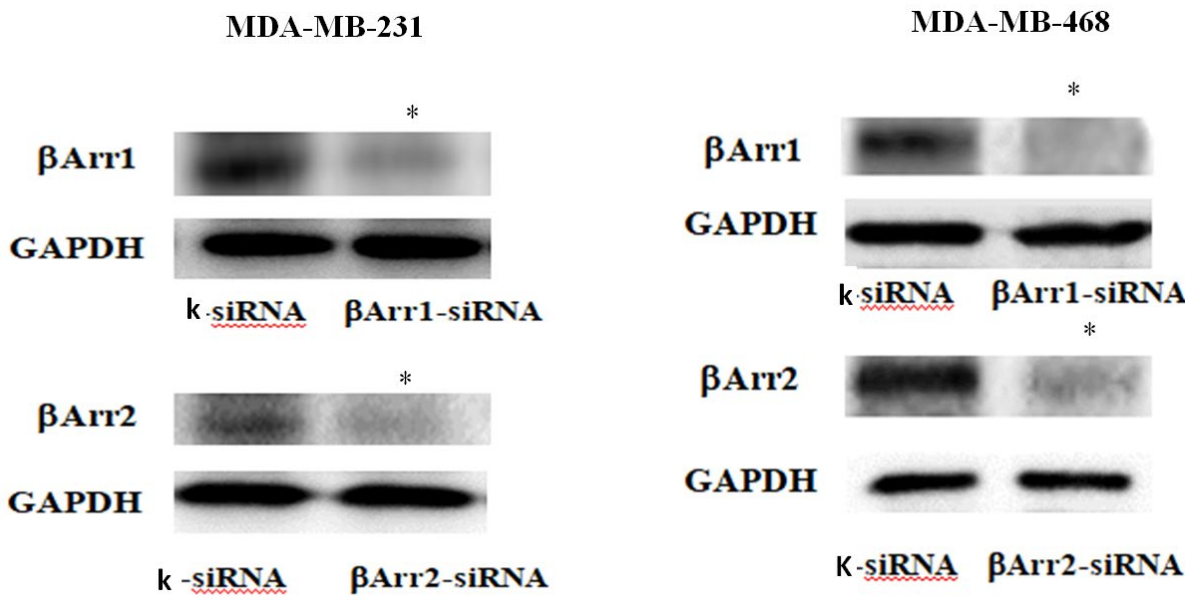
Bu çalışmada MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 olmak üzere iki farklı meme kanser hücre hattı kullanılmıştır ve her ikisi de üçlü negatif insan meme kanseri hücreleridir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında hücreler Beta arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerine karşı özel siRNA'lar kullanılarak susturuldu. Daha sonra proteinlerin ifade düzeyleri western blot yöntemi ile kontrol edidi. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 bakımından susturulmuş hücrelerin proliferasyon ve invazyon yetenekleri Xcelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) ile incelendi. Çalışmanın devamında yine MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 kullanılarak bu hücrelere Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerinin cDNA'ları aktarıldı ve hücrelerde bu proteinlerin aşırı ifade edilmeleri sağlandı. Daha sonra western blot yöntemi ile ifade düzeyleri kontrol edildi. Ardından bu hücrelerde proliferasyon ve invazyon ölçümleri XCelligence sistemi ile gerçekleştirildi. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde mikrodizin analizi gerçekleştirildi. Her iki hücre hattında gerçekleştirilen flow sitometri analizi ile hücre döngüsü gözlemlendi. Mikrodizin analizinde değişimini gözlemlediğimiz bazı genler qRT PCR ve western blot ile valide edildi.

5.1. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2'NİN SİRNA İLE SUSTURULMASI VE HÜCRE PROLİFERASYONU ÖLÇÜMÜ

5.1.1. MDA-MB-231 VE MDA-MB-468 HÜCRELERİNDE BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİNİN SİRNA İLE SUSTURULMASI

Şekil 5.1.'de görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücrelerinde Beta Arrestin 1 proteininin ifade miktarı bazal ifade miktarına (K-siRNA) göre yaklaşık %70, Beta Arrestin 2 proteininin ifade miktarı ise yaklaşık %40 azalmaktadır. MDA-MB-468 hücre hatlarında ise bu miktarlar Beta Arrestin 1'de %75, Beta Arrestin 2 ise %80 azalmaktadır.



Şekil 5.1. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerin susturulması; MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinleri kendilerine özgü siRNA'ları ile susturuldu. Western Blot yöntemi ile yapılan inceleme sonucunda, Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 siRNA'larının transfeksiyonu, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde bu proteinlerin ifade seviyelerini anlamlı ölçüde azalttı. Proteinlerin ifadeleri GAPDH proteininin ifade düzeyine göre normalize edilmiştir. n sayısı, 8, ve *p <0.05, Kontrol siRNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

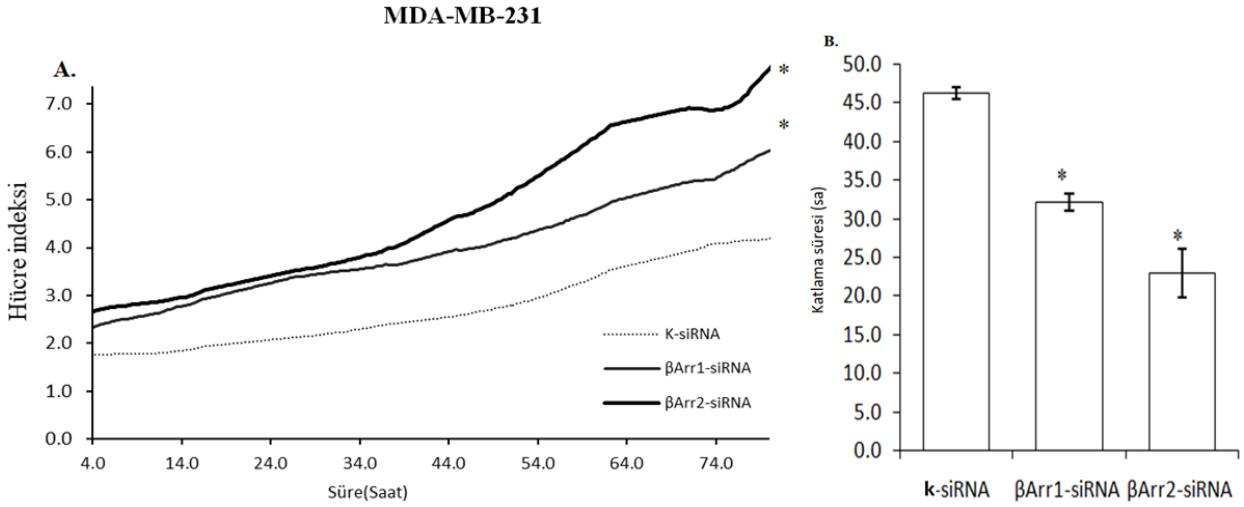
5.1.2. XCELLİGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ (RTCA) SİSTEMİ İLE SUSTURULMUŞ HÜCRELERDE PROLİFERASYON İNCELENMESİ

Hücrelerin proliferasyon indeksi hücrelerin e-plakaya ekilmesini takiben 72, saate kadar ölçüldü. Dördüncü saatin sonu hücre indeksinin başlangıç çizgisi olarak tanımlandı. Başlangıç çizgisinin (Baseline) kat değişimi (fold change) sonraki ölçümler için belirlendi ve hücre indeksinin normalizasyonu için kullanıldı.

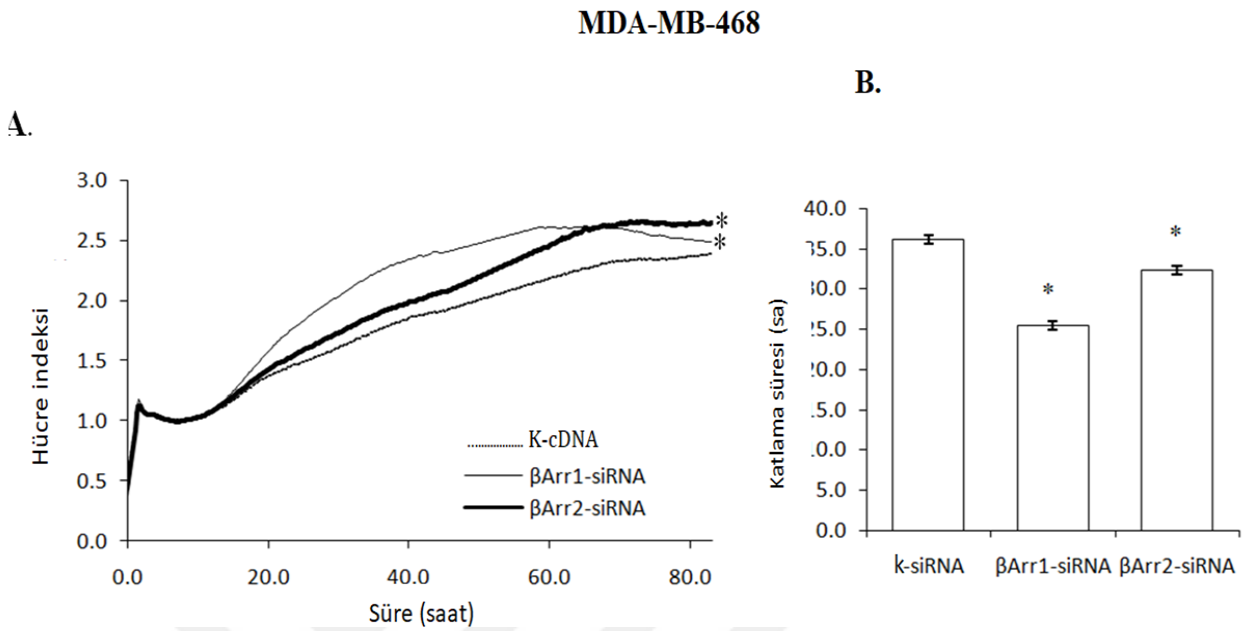
Şekil 5.2.'nin panel A kısmında görüldüğü gibi Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 siRNA'ları transfekte ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon indeksi incelendi. Proliferasyon indeksi kontrol hücrelerinde 4 iken Beta Arrestin 1 susturulduğu zaman 5.4'e ve Beta Arrestin 2 susturulduğu zaman ise 6.9'a anlamı biçimde yükselmektedir. Aynı

deneyde hücrelerin ikiye katlama süresi bir proliferasyon simgesi olarak panel B'de incelendi. Görüldüğü gibi kontrol MDA-MB-231 hücreleri 45 saatte ikiye katlanırken Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteini susturulduğu zaman hücrelerin ikiye katlanma zamanının sırasıyla 30 ve 25 saate düştüğü saptandı.

Şekil 5.3.'de aynı deneyin MDA-MB-468 hücre hattı üzerindeki sonuçları görülmektedir. Susturma işlemi sonrasında MDA-MB-468 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre hücre indeksinde artma ve ikiye katlanma zamanında azalma saptandı. Hücre indeksi kontrol hücreleri, Beta Arrestin 1 siRNA transfeksiyonu veya Beta Arrestin 2 siRNA transfeksiyonu yapılan hücreler için sırasıyla 1.9, 2.2 ve 2.5 olarak saptandı. İkiye katlanma süresi ise sırasıyla 35, 25 ve 30 saat olarak ölçüldü.



Şekil 5.2. Beta Arrestin 1, Beta Arrestin 2 veya K-siRNA'lar ile transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon seviyelerinin xCelligence Hücre Analiz sistemi ile incelenmesi. n sayısı 7, *= p <0.05. Panel A, Hücre indeksi, panel B, katlanma süresi parametreleri açısından Kontrol-siRNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

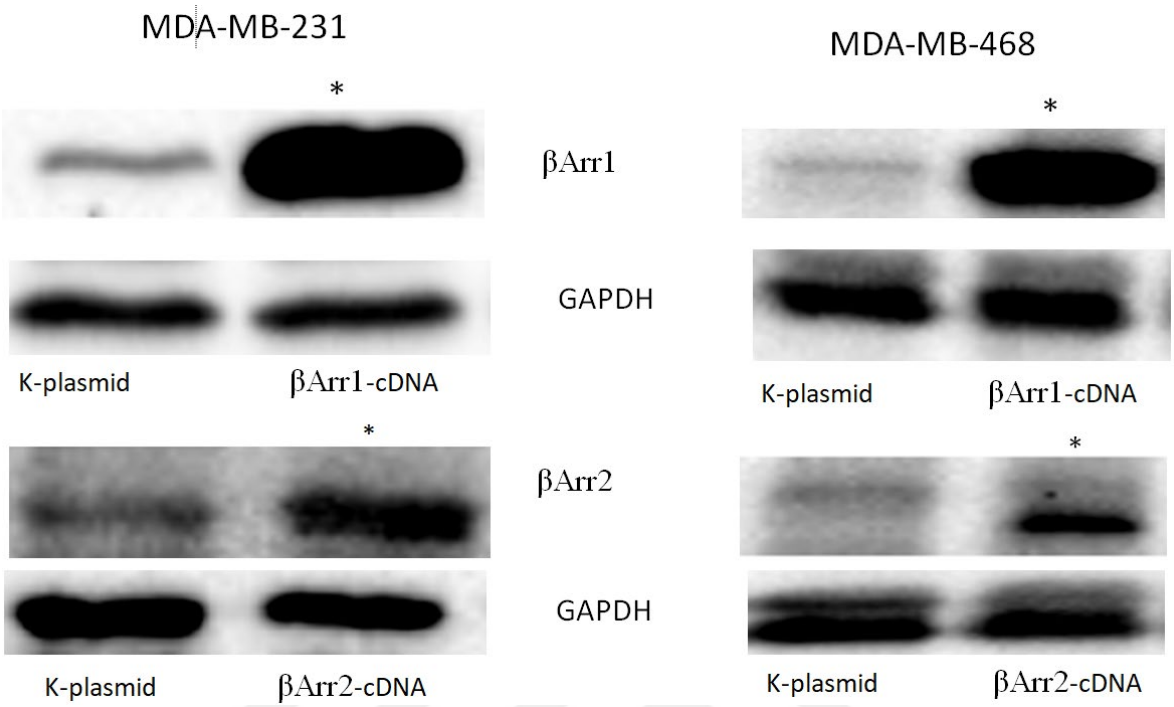


Şekil 5.3. Beta Arrestin 1, Beta Arrestin 2 veya K-siRNA'larla transfekte edilmiş MDA-MB-468 hücrelerinde (panel A) proliferasyon seviyelerinin, (panel B) katlanma süresi parametrelerinin xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP sistemi ile ölçümü. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. n sayısı 7, *= p <0.05. Panel A, Hücre indeksi, panel B, katlanma süresi parametreleri açısından Kontrol-siRNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

5.2. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2'NİN AŞIRI İFADESİ VE HÜCRE PROLİFERASYONU ÖLÇÜMÜ

5.2.1. MDA-MB-231 VE MDA-MB-468 HÜCRELERİNDE BETA ARRESTİN 1 VEYA 2 PROTEİNLERİNİN AŞIRI İFADESİ VE HÜCRE PROLİFERASYONU

Şekil 5.4.'de görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücrelerinde Beta Arrestin 1 proteininin ifade miktarı bazal ifade miktarına (K-cDNA) göre yaklaşık 12 kat, Beta Arrestin 2 proteininin ifade miktarı ise yaklaşık 3 kat artmaktadır. MDA-MB-468 hücre hatlarında ise bu mikar Beta Arrestin 1'de yaklaşık 18 kat, Beta Arrestin 2'de yaklaşık 3 kat artmış olarak saptandı.



Şekil 5.4. Beta Arrestin 1, Beta Arrestin 2 veya K-cDNA'larıyla (k-plasmid) transfekte edilmiş MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatlarında Beta Arrestin 1 veya 2 proteinlerinin ifade seviyeleri Western Blot yöntemi ile incelendi. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 cDNA'larnın transfeksiyonu bu proteinlerin ifade seviyelerini kontrol ile kıyasla anlamlı ölçüde arttırdı. Proteinlerin ifade düzeyleri GAPDH proteininin ifade miktarına göre normalize edilmiştir. n sayısı, 10, ve *= p <0.05, Kontrol cDNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

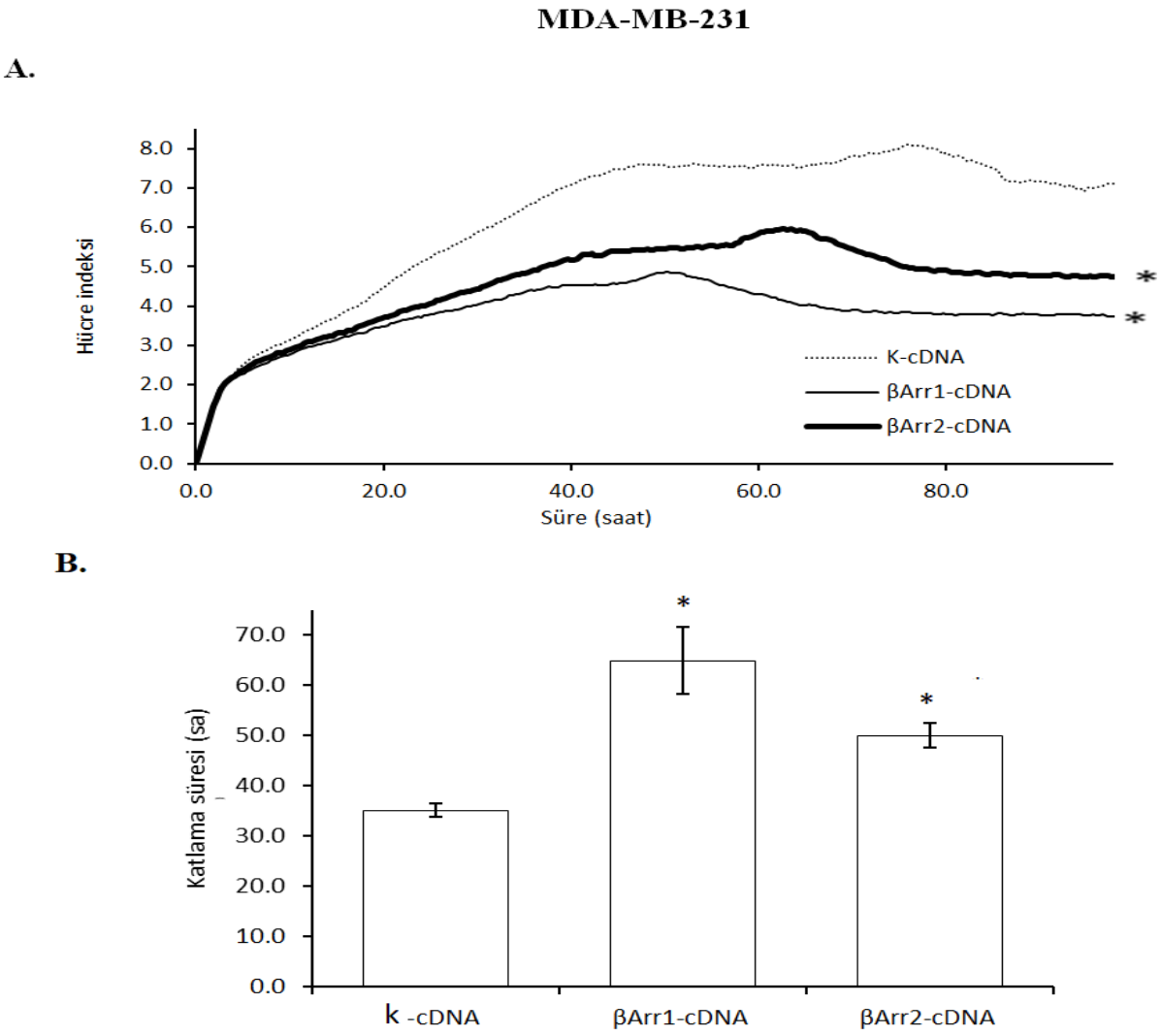
5.2.2. XCELLİGENCE GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZ (RTCA) SİSTEMİ İLE PROLİFERASYON SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

Hücrelerin proliferasyon indeksi hücrelerin e-plakaya ekilmesini takiben 72 saate kadar ölçüldü. Dördüncü saatin sonu hücre indeksinin başlangıç çizgisi olarak tanımlandı.

Şekil 5.5.'in panel A kısmında görüldüğü gibi Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 cDNA'larını transfekte ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon indeksi incelendi. Proliferasyon indeksi kontrol hücrelerinde 7,5 iken Beta Arrestin 1'de 4.1'e ve Beta Arrestin 2' ise 4.9'a anlamı biçimde azalmıştır. Aynı deneyde hücrelerin ikiye katlama süresi bir proliferasyon simgesi olarak panel B'de incelendi. Görüldüğü gibi kontrol MDA-MB-231

hücreleri 38 saatte ikiye katlanırken Beta Arrestin 1 veya 2 proteini ifadesi arttığı zaman hücrelerin ikiye katlanma zamanının sırasıyla 65 ve 50 saate çıktığı saptandı.

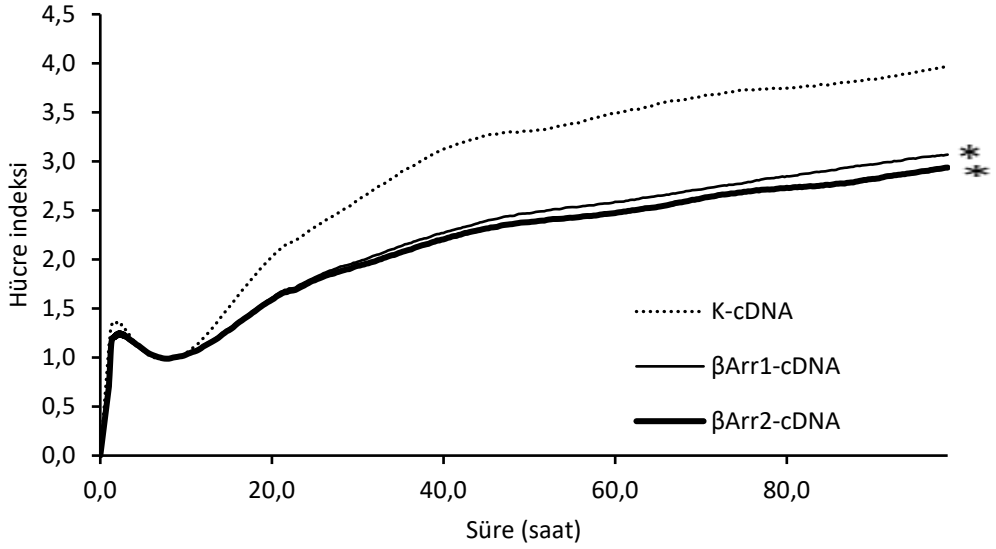
Şekil 5.6.'da aynı deneyin MDA-MB-468 hücre hattı üzerindeki sonuçları görülmektedir. Beta arrestinler aşırı ifade edildikten sonra MDA-MB-468 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre, hücre indeksinde azalma ve ikiye katlanma zamanında artma saptandı. Hücre indeksi kontrol hücreleri (control c-DNA transfekte edilen), Beta Arrestin 1 cDNA transfeksiyonu veya Beta Arrestin 2 cDNA transfeksiyonu yapılan hücreler için sırasıyla 4, 2.7 ve 2.6 olarak saptandı. İkiye katlanma süresi ise sırasıyla 35, 45 ve 48 saat olarak ölçüldü.



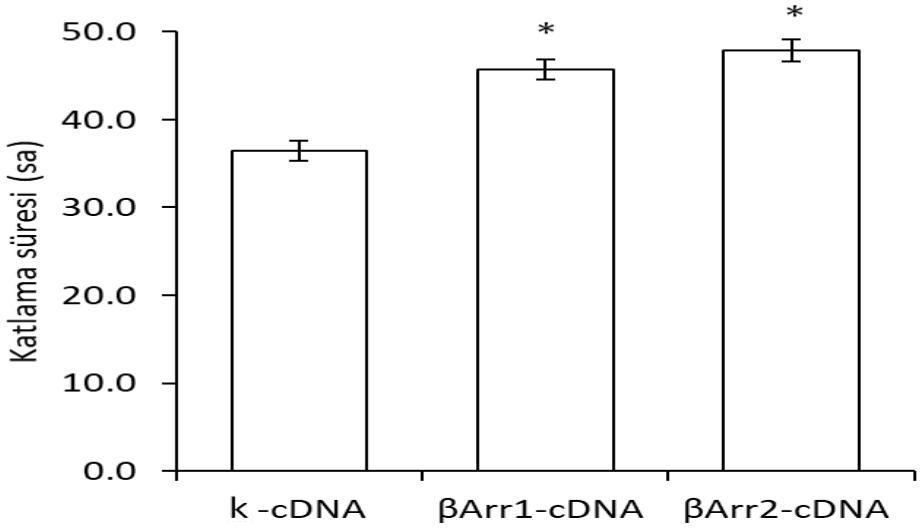
Şekil 5.5. Beta arrestin 1, Beta Arrestin 2 (βArr1 ve βArr2) veya K- cDNA'larıyla transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde proliferasyon seviyelerinin incelenmesi. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. n sayısı 7, *= $p < 0.05$. Panel A, Hücre indeksi, panel B, katlanma süresi parametreleri açısından Kontrol cDNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

MDA-MB-468

A.



B.



Şekil 5.6. βArr1, βArr2 veya K-cDNA'larıyla transfekte edilmiş MDA-MB-468 hücre hattında proliferasyon seviyelerinin incelenmesi. Veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. n sayısı 6, *= p <0.05. Panel A, Hücre indeksi, panel B, katlanma süresi parametreleri açısından Kontrol cDNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

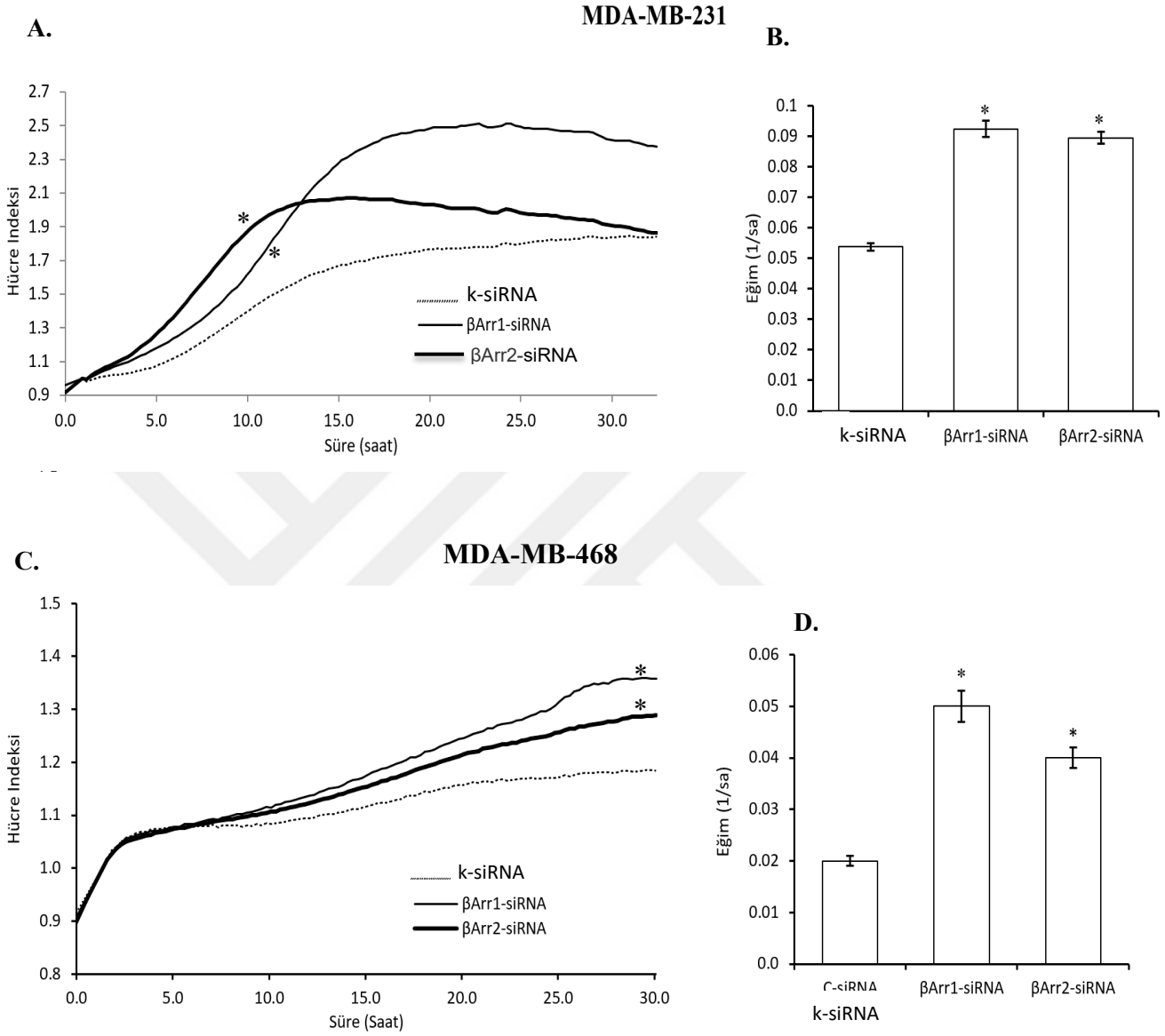
5.3. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2'NİN İFADELERİNİN SUSTURULMASI VE HÜCRE İNVAZYONU ÖLÇÜMÜ

Hücrelerin invazyonu, Matrigel kaplı CIM plakalarında ve xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz sistemi kullanılarak 36-48 saat süresince kaydedildi. Beta Arrestin 1, 2 ve Kontrol-siRNA transfekte edilmiş MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücreleri CIM plakaların matrigel ile kaplı bölmesine (üst kısım) ekildi ve empedans ölçümleri 48 saat boyunca yapıldı. Hücre indeksinin eğimi invazyon göstergesi olarak kullanıldı. Birim zamanda plakanın üst kısmından alt kısmına geçen hücre sayısını hızı ve miktarı arttıkça hücre indeksinin eğimi de artmaktadır.

Şekil 5.7.'nin A ve C panellerinde görüldüğü gibi her iki hücre hattında invazyon oranında anlamlı olarak artış görüldü. İnvazyon oranı hücreler cim-plakalara konulduktan ve 30 dk bekletildikten sonra 48 saat ölçüm alınarak saptandı. Şekil 5.7.'nin A panelinde görüldüğü gibi kontrol hücrelerinde 4'üncü saat ile 15 inci saat aralığında en hızlı geçiş gerçekleşmiş ve hücre indeksi 0.9'dan 1.68'e ulaşmıştır. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 susturulmuş hücrelerde ise aynı indekse ulaşma zamanı sırayla 8.5 ve 10'üncü saatte gerçekleşmiştir ve maksimum olarak 2.50 ve 2.06 hücre indeksine ulaşmaktadırlar.

Şekil 5.7.'nin C panelinde görüldüğü gibi kontrol hücrelerinde 4'üncü saat ile 24 inci saat aralığında hafif geçiş gerçekleşmiş ve hücre indeksi 1.05'dan 1.16'e ulaşmıştır. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 susturulmuş hücrelerde ise aynı indekse ulaşma zamanı sırayla 15 ve 16'ıncı saatte gerçekleşmiştir ve maksimum solarak 1.30 ve 1.26 hücre indeksine ulaşmaktadırlar.

Şekil 5.7.'nin panel B ve D'sinde görüldüğü grafikte Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 susturulmuş hücrelerde K-siRNA'ya karşı invazyon eğrilerinin eğiminde anlamlı artış saptandı. MDA-MB-231 hücrelerinde bu eğim K-siRNA, Beta Arrestin 1 siRNA transfeksiyonu ve Beta Arrestin 2 siRNA transfeksiyonunda yaklaşık olarak sırasıyla 0.055, 0.09 ve 0.085 birim/saat olarak ölçüldü. MDA-MB-468 hücrelerinde ise sırasıyla 0.02, 0.05 ve 0.04 birim/saat olarak ölçüldü.



Şekil 5.7. βArr1, βArr2 veya K-siRNA'lar ile transfekte edilmiş MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde invazyon oranlarının xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP sistemi ile incelenmesi. Veriler ortalama ± standart hata olarak hesaplanmıştır**;** n sayısı 5, *= p <0.05. Panel A, Hücre indeksi, panel B, eğim parametreleri açısından Kontrol-siRNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

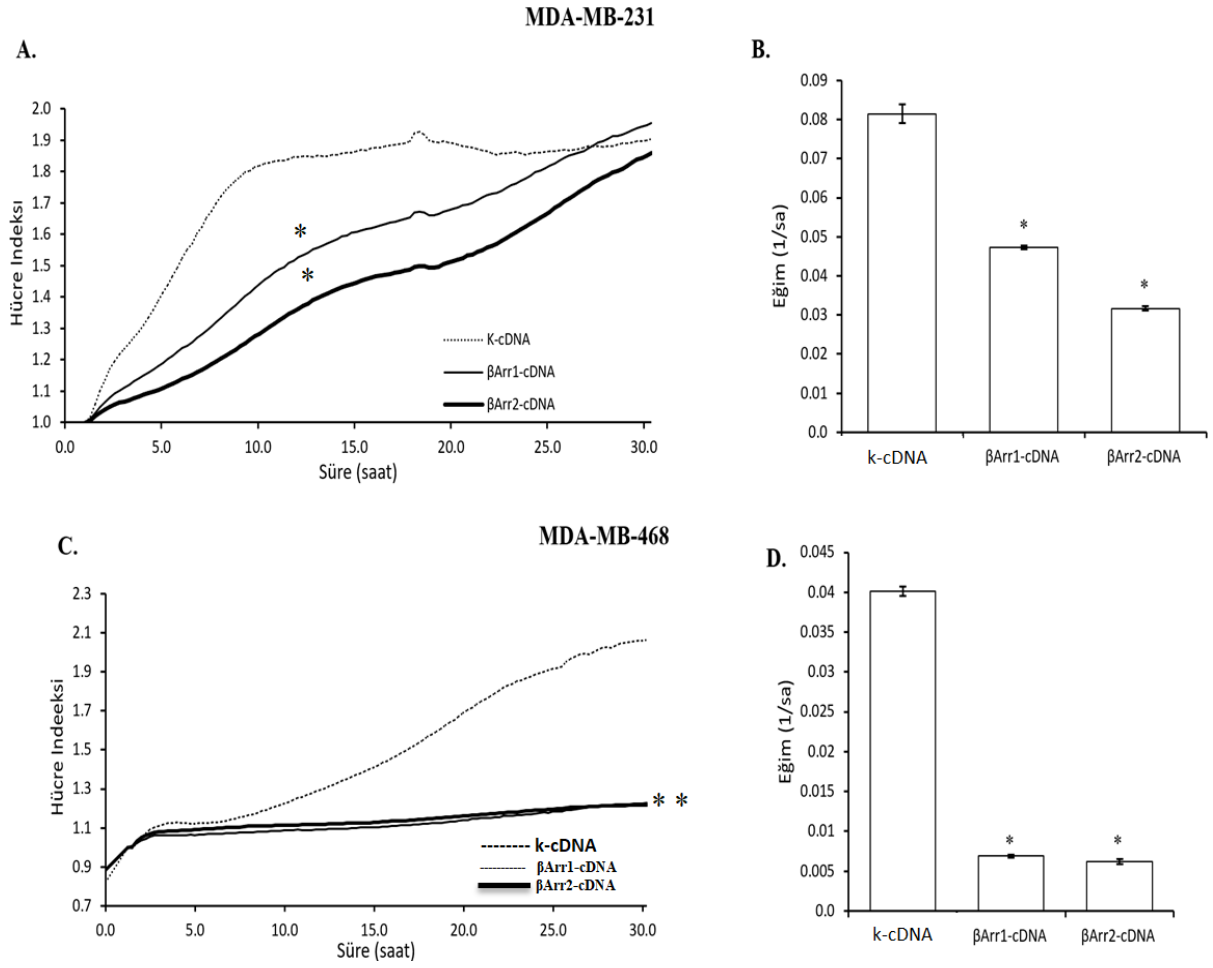
5.4. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİN AŞIRI İFADESİ VE HÜCRE İNVAZYONU ÖLÇÜMÜ

Hücrelerin invazyon oranı, Matrigel kaplı CIM plakalarında ve xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz sistemi kullanılarak incelendi.

Şekil 5.8.'in A ve C panellerinde görüldüğü gibi her iki hücre hattında invazyon oranında anlamlı olarak azalma görüldü. İnvazyon oranı 48 saat süresince ölçülerek elde edildi. Şekil 5.8.'in A panelinde görüldüğü gibi kontrol hücrelerinde 4'üncü saat ile 10 inci saat aralığında en hızlı geçiş gerçekleşmiş ve hücre indeksi 1.3'dan 1.85'e ulaşmıştır. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 aşırı ifade edilmiş hücrelerde ise aynı indekse ulaşma zamanı sırayla 25 ve 29'üncü saatte gerçekleşmiştir.

Şekil 5.8.'in C panelinde görüldüğü gibi kontrol hücrelerinde 6'inci saat ile 21'inci saat aralığında en hızlı geçiş gerçekleşmiş ve hücre indeksi 1.1'dan 1.8'e ulaşmıştır. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 aşırı ifade edilmiş hücrelerde ise gerçek geçiş görülmedi ve hücre indekslerinde zamana karşı değişiklik gerçekleşmemiştir.

Şekil 5.8.'in panel B ve D'sinde görüldüğü grafikte Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 aşırı ifade edilden hücrelerde k-cDNA'ya karşı invazyon eğrilerinin eğiminde anlamlı azalma saptandı. MDA-MB-231 hücrelerinde bu eğim k-cDNA, Beta Arrestin 1 cDNA transfeksiyonu ve Beta Arrestin 2 cDNA transfeksiyonunda yaklaşık olarak sırasıyla 0.08, 0.05 ve 0.03 birim /saat olarak ölçüldü. MDA-MB-468 hücrelerinde ise sırasıyla 0.04, 0.005 ve 0.005 birim/saat olarak ölçüldü.

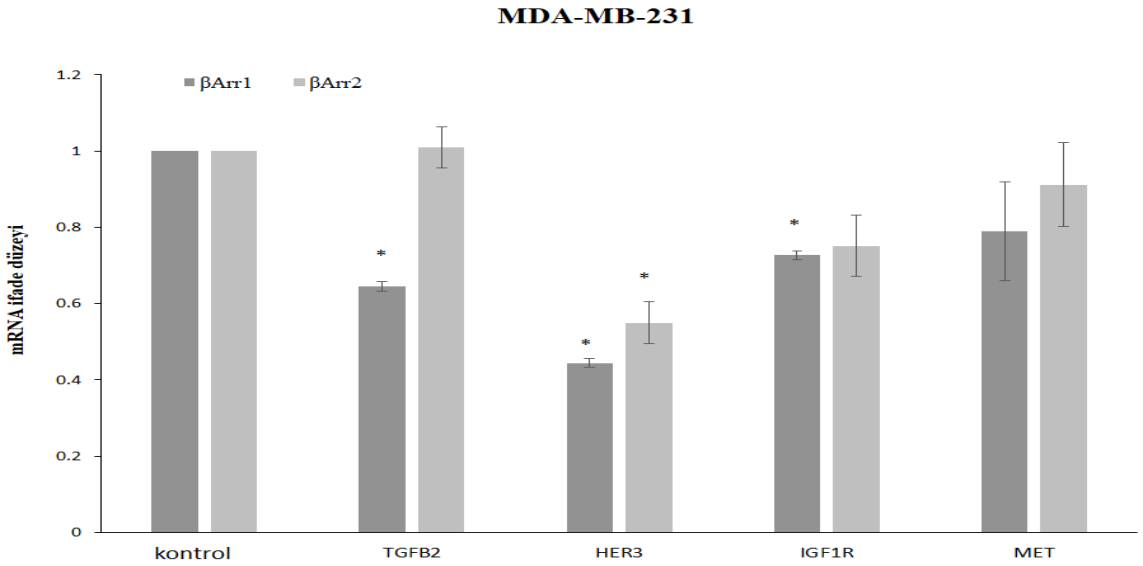


Şekil 5.8. βArr1, βArr2 veya K-cDNA'larıyla transfekte edilmiş MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde invazyon oranlarının xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP sistemi ile incelenmesi. Veriler ortalama ± standart hata olarak hesaplanmıştır; n sayısı= 5, ve *= p <0.05. Panel A, Hücre indeksi, panel B, eğim parametreleri açısından Kontrol-cDNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

5.5. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİ AŞIRI İFADE EDİLMİŞ MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE İNVAZYON İLE İLGİLİ ÖNEMLİ GENLERİN MRNA DEĞERLERİNİN QRT-PCR YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Şekil 5.9.'da görüldüğü gibi özellikle Beta Arresin 1 aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde, TGFB2, HER3 ve IGF1R gen ifadelerinde k-cDNA'ya karşı anlamlı ölçüde

azalma görülürken Beta Arrestin 2 transfekte edilmiş hücrelerde sadece HER3 ve IGF1R genlerinde anlamlı azalma görülmüştür. Aynı deneyde MET genin ifade düzeylerinde değişiklik görüldü.

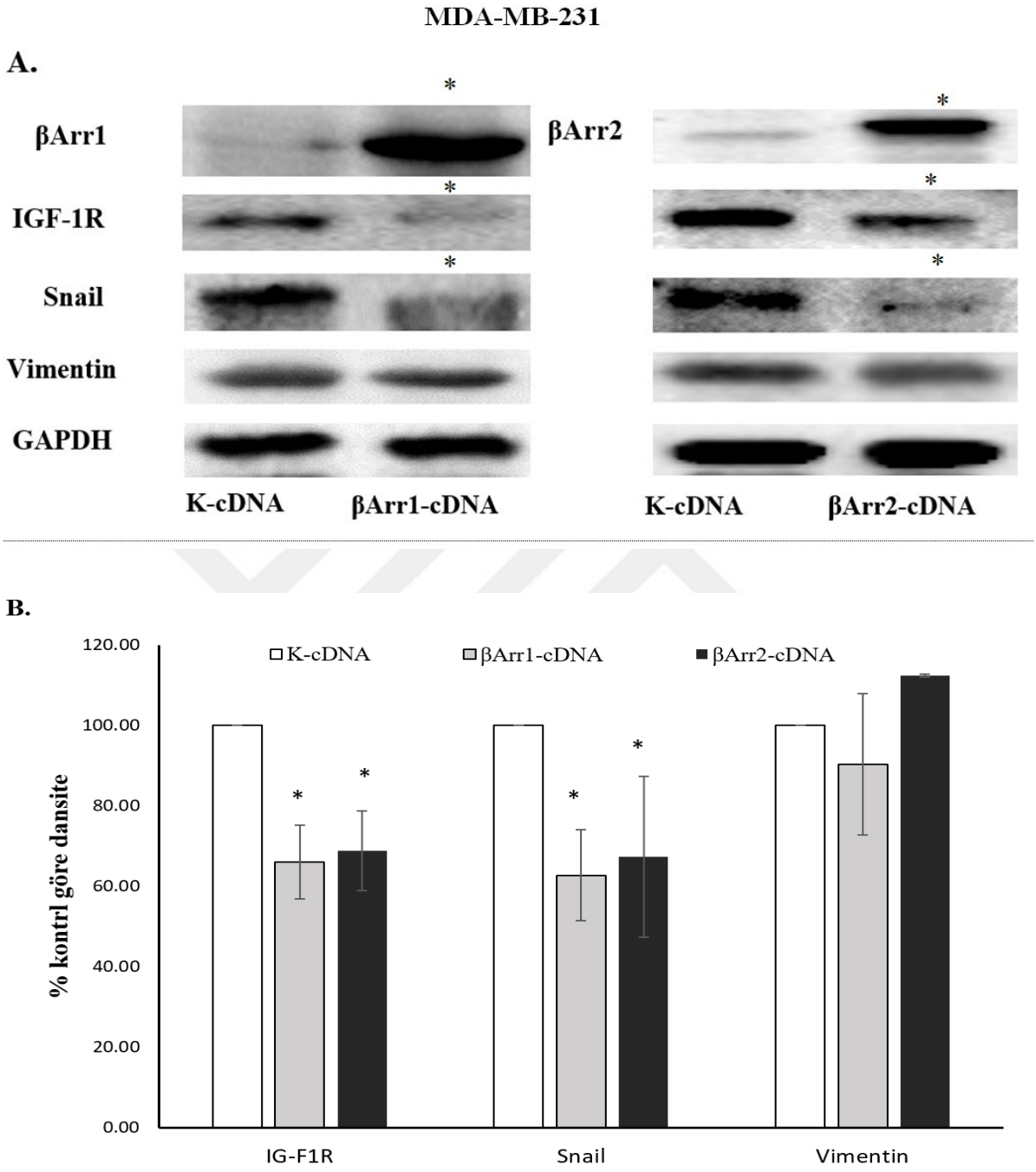


Şekil 5.9. Hücre invazyon ilişkili genler ile gerçekleştirilen Eş-zamanlı PCR sonuçlarıı. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde mikrodizin analizi sonucuna göre elde edilen hücre invazyonu ile ilişkili genlerin mRNA değerlerinin qRT-PCR sistemi ile değerlendirilmesi. Y ekseni, ifade düzeyinde kat değişimini göstermektedir. Sonuçlar, iki biyolojik ve teknik tekrarın ortalama ve standart sapması olarak gösterilmektedir (Beta Arrestin 1/ kontrol için * $p < 0.05$; Beta Arrestin 2/ kontrol için # $p < 0.05$; t-testi).

5.6. MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE İNVAZYON İLE İLGİLİ GENLERİN PROTEİN DÜZELERİNİN WESTERN BLOT İLE İNCELENMESİ

Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 ifadesinin artırılması ile hücre invazyonunda gözlemlediğimiz azalmanın moleküler mekanizmaları daha detaylı araştırılmıştır. Öncelikle mikrodizin analizi sonuçları değerlendirilmiş ve özellikle TGFbeta, HER3 ve IGFR genlerinin Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2'in ifadesinin artırılması ile azalmasının hücre

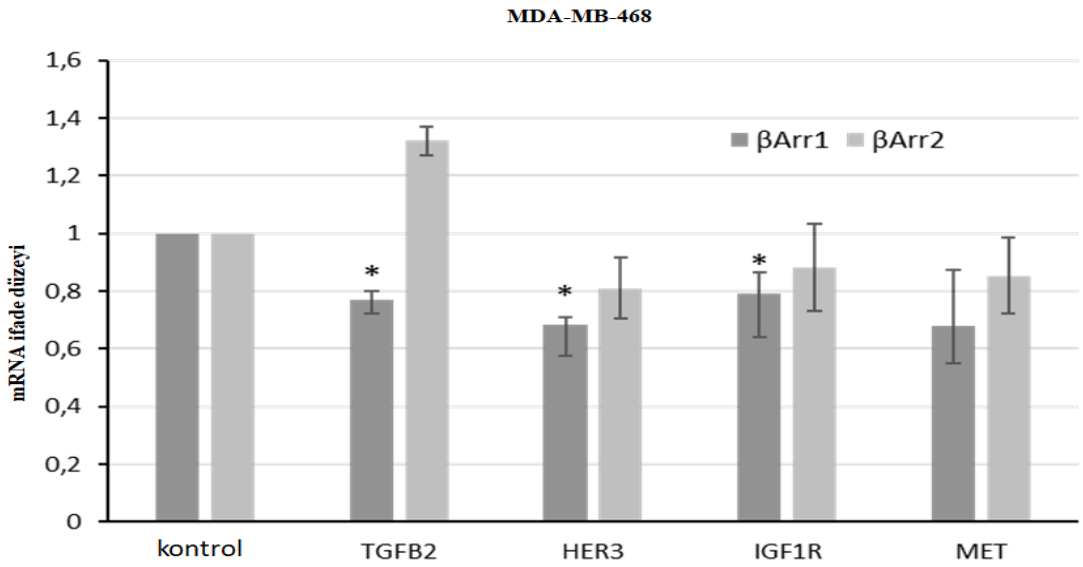
invazyonundaki azalma ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu verilere ek olarak hücre hareketliliğinde önemli olan Vimentin, Snail, Cadherin proteinlerinin düzeyi western-blot ile araştırılmıştır. Cadherin proteini MDA-MDA-231 hücrelerinde ifade olmadığı için saptanamamış ve diğer iki protein araştırılmıştır. Şekil 5.10.'ün panel A kısmında görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücrelerinde Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerin ifadesinin artırılması IGF-R1 ve Snail proteinlerin ifade düzeylerinde anlamlı olarak azalmaya neden olmuştur. Vimentin proteininde ise anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Şekil 5.10.'ün panel B kısmında görüldüğü üzere IGFR ve Snail proteininin ifade miktarı bazal ifade miktarına (K-cDNA) göre yaklaşık %40 oranında azalmaktadır.



Şekil 5.10. İnvazyon ile ilgili genlerin protein düzeylerinin western blot ile incelenmesi. Beta Arrestin 1 (βArr1) veya Beta Arrestin 2 (βArr2) proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde IGF-1R ve Snail proteinlerinin ifadelerinin anlamlı şekilde azaldığı görülürken, vimentin proteininin ifadesinin değişmediği görüldü. Panel B, ilgili proteinlerin GAPDH proteinine göre normalize edilmiş bant yoğunluklarının dansitometrik analizini göstermektedir. Veriler ortalama ± standart hata olarak hesaplanmıştır, n sayısı 6 olacak şekildedir, $p < 0.05$ Kontrol cDNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

5.7. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİ AŞIRI İFADE EDİLMİŞ MDA-MB-468 HÜCRELERİNDE İNVAZYON İLE İLGİLİ ÖNEMLİ GENLERİN MRNA DEĞERLERİNİN QRT-PCR YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

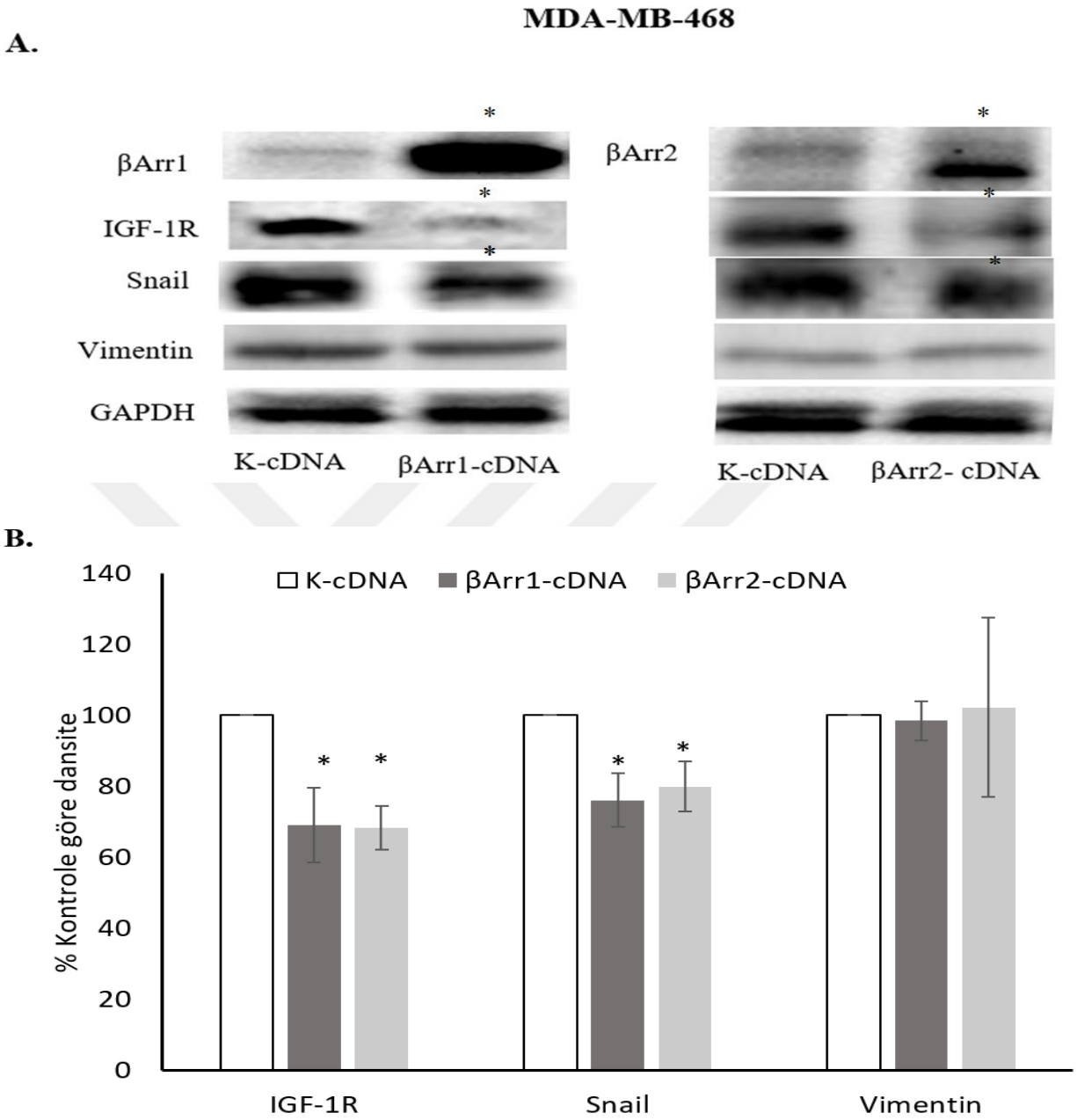
Şekil 5.11.'de görüldüğü gibi Beta Arrestin 1 aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-468 hücrelerde TGFB2, HER3 ve IGF1R gen ifadelerinde k-cDNA'ya karşı anlamlı ölçüde azalma görülürken Beta Arrestin 2 transfekte edilmiş hücrelerde TGFB2, HER3 ve IGF1R genlerinde anlamlı değişiklik izlenmedi. Aynı deneyde Beta Arrestin 1 ve 2 proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz hücrelerde MET genin ifade düzeylerinde değişiklik görülmedi.



Şekil 5.11. βArr1 veya βArr2 proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-468 hücrelerinde invazyonuyla ilişkili genlerin mRNA değerlerinin qRT-PCR sistemi ile incelenmesi. Sonuçlar iki biyolojik ve teknik tekrarın ortalama ve standart sapması olarak gösterilmektedir (βArr1 / kontrol için * $p < 0.05$; βArr2 / kontrol için # $p < 0.05$; t-testi).

5.8. BETA ARRESTİN 1 VEYA BETA ARRESTİN 2 AŞIRI İFADE EDİLMİŞ MDA-MB-468 HÜCRELERİNDE İNVAZYON İLE İLGİLİ PROTEİNLERİN DÜZEYLERİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ

Hücre invazyonunda önemli olan Vimentin, Snail ve İGFR1 proteinlerinin düzeyleri western-blot ile araştırıldı. Şekil 5.12.'nin panel A kısmında görüldüğü üzere MDA-MDA-468 hücrelerinde Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerinin ifadesi K- cDNA'ya (Basal ifade) karşı sırasıyla yaklasık 6 ve 2 kat artırıldı. Şekil 5.12.'nin panel B kısmında görüldüğü gibi İGFR ve Snail proteinlerinin ifadelerinde hem Beta Arrestin 1 transfeksiyonu hem de Beta Arrestin 2 transfeksiyonu sonucunda K-cDNA'ya (Basal ifade) karşı anlamlı düzeyde azalma görüldü. Bu azalma Beta Arrestin 1 transfeksiyonu için yaklaşık %32 ve Beta Arrestin 2 transfeksiyonu için yaklaşık %20 olarak saptandı. Vimentin proteininin ifade düzeyinde ise anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

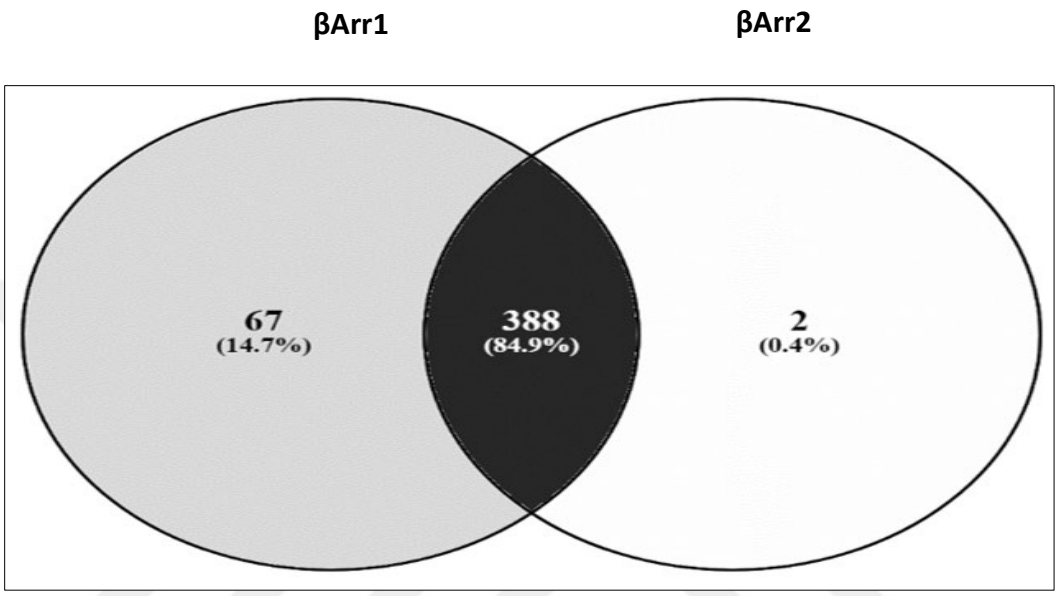


Şekil 5.12. βArr1 veya βArr2 proteinlerin aşırı ifade edilmesi ve IGF-1R, Snail ve Vimentin proteinlerin westrn blot ile incelenmesi. MDA-MB-468 hücrelerinde Beta Arrestin 1 (βArr1) veya Beta Arrestin 2 (βArr2) proteinlerinin cDNA'larının transfeksiyonu sonucunda bu proteinlerin miktarlarını kontrol hücrelerine göre anlamlı şekilde arttırıldı, transfeksiyon sonrasında IGF-1R ve Snail proteinlerinin ifadelerinin anlamlı şekilde azaldığı görülürken Vimentin proteininin ifadesinin değişmediği görüldü. Panel B grafiği ilgili proteinlerin GAPDH enzimine göre normalize edilmiş bant yoğunluklarının dansitometrik analizini göstermektedir. Veriler ortalama ± standart hata olarak hesaplanmıştır, n sayısı 5 olacak şekildedir, *= $p < 0.05$, Kontrol cDNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

5.9. MİKRODİZİN ANALİZİ

Mikrodizin analizi sadece MDA-MB-231 hücrelerinde gerçekleştirildi. Beta Arrestin proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz hücreler ile kontrol cDNA'lı hücrelerin mRNA ifade düzeyleri mikrodizin analizi ile incelendi. Mikrodizin sonuçlarından ortaya çıkan farklı mRNA (Bazı genlerde azalma ve bazılarında çoğalma) ifadeleri üzerinde yolak analizi yapıldı.

Kanser ile ilgili yolaklarda, kontrol cDNA'ya karşı Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 aşırı ifade ettiğimiz hücrelerde anlamlı olarak sırasıyla 455 ve 390 adet farklı düzeyde ifade edilmiş mRNA bulduk. Şekil 5.13.'de görüldüğü gibi ortak değişim gösteren genleri saptamak için Venny analizi yapılmıştır. Tespit edilen bu mRNA'ların 388'inin ifadesi kontrol cDNA'lı hücrelere kıyasla, Şekil 5.13.'de görüldüğü gibi, hem Beta Arrestin 1 hem de Beta Arrestin 2 aşırı ifade ettirilen hücrelerde değişmiştir. Beta Arrestin 1'i aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerde anlamlı olarak ifade değişimi gösteren genlerin hangi yolaklar ve hücresel fonksiyonlar ile ilişkili olabileceğini ortaya çıkarmak amacıyla yolak zenginleştirme (pathway enrichment) analizi yapıldı. İfadesinde farklılık saptanan genlerin kanser ile ilişkili yolaklar Çizelge 5.1.'de görüldüğü gibi hücre döngüsü, P53, Jak-STAT gibi yolaklarda zenginleştiği saptandı.



Şekil 5.14. βArr1, βArr2 ve Kontrol cDNA'lar ile transfekte edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin mikrodizin analizi ile incelenmesinin Venn Diyagramı ile şematize edilmesi. Kanser ile ilgili yolaklarda, B-arrestin 1 ve B-arrestin 2 aşırı ifade edilen hücrelerde kontrol cDNA ile transfekte edilen hücrelere karşı mRNA düzeyindeki ifade farklılıklarının Venn Diyagramı ile gösterilmesi.

5.9.1. MİKRODİZİN VERİLERİNİN ANALİZİ SONUCUNDA FARKLILIK GÖSTEREN GENLERLE YAPILAN YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZİ

Venn diyagramında görüldüğü gibi toplam 457 değişen gen arasında; Sadece Beta Arrestin 1 ifadesinin artırılması ile 67 gen, Beta Arrestin 2 ifadesinin artırılması ile 2 gen değişiminin ortak olmadığı görüldü ve Beta Arrestin 1 ve 2 proteinlerin aşırı ifadesi sonucunda 388 genin ifadesindeki değişimlerde ortak etkiyi gösterdikleri saptandı. Bu sonuçlar doğrultusunda Beta-Arrestin 1 ifadesinin artırılması ile ortaya çıkan gen ifadesindeki değişimin Beta-Arrestin 2 ifadesindeki artış ile gözlemlenebilecek değişikliği büyük ölçüde kapsadığı görüşü doğmuştur. Anlamlı olarak ifade değişimi gösteren genlerin hangi yolaklar

ve hücresel fonksiyonlar ile ilişkili olabileceğini ortaya çıkarmak amacıyla yolak zenginleştirme (pathway enrichment) analizi yapılmıştır. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (Webgestalt) kullanılarak KEGG analizi gerçekleştirildi. İfadesinde farklılık saptanan genlerin kanser ile ilişkili hücre döngüsü, P53, Jak-STAT, 'Natural killer' hücre aracılı sitotoksisite gibi yolaklarda zenginleştiği bulunmuştur.

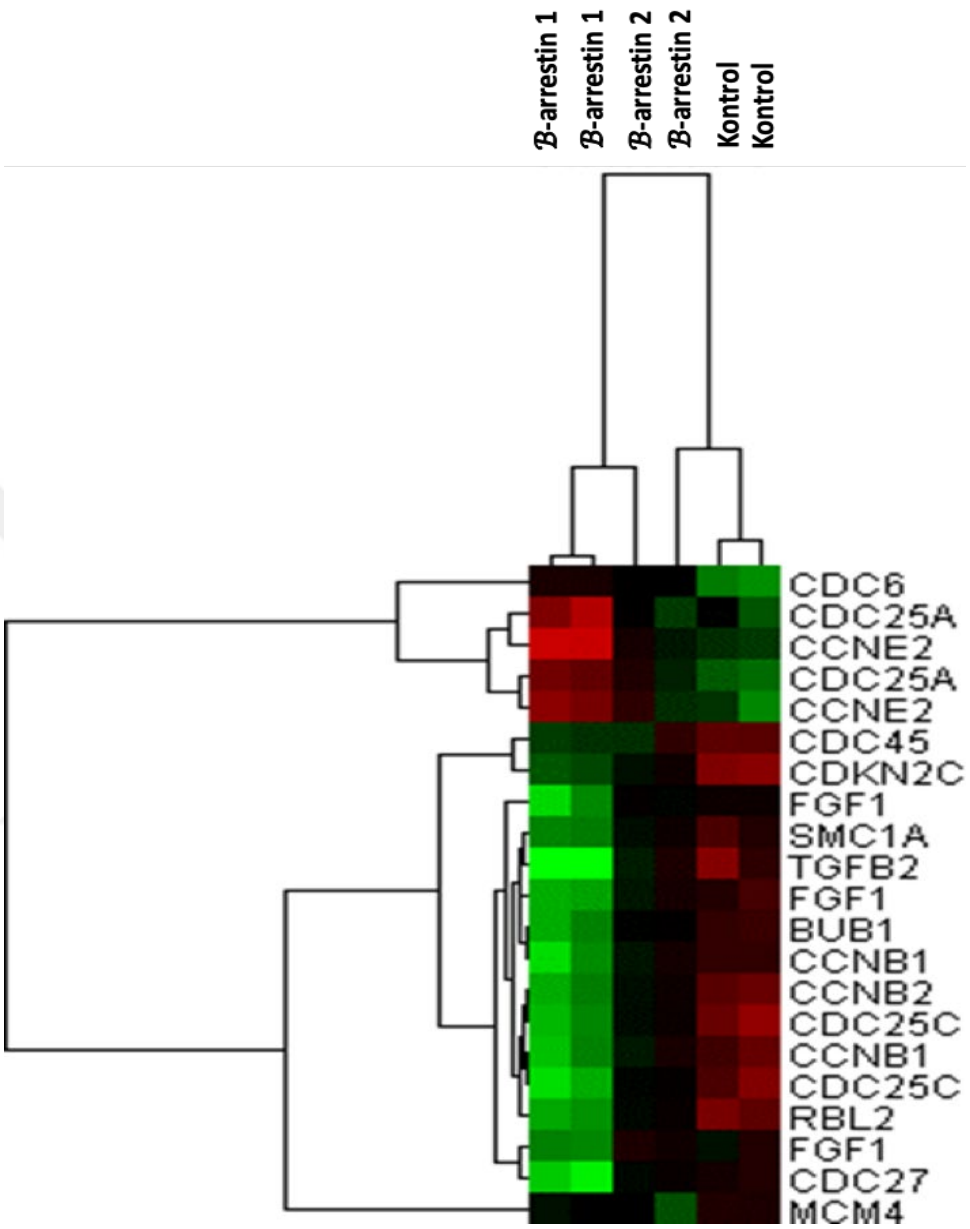
Çizelge 5.1.'de görüldüğü gibi kanser ile ilgili yolaklarda Beta Arrestin 1 aşırı ifade ettiğimiz hücrelerde kontrol cDNA'lı hücrelere kıyasla mRNA düzeyindeki ifade farklılığı hücre döngüsü yolaklarındaki genlerde daha fazla izlendi. Yolaklarda değişen genlerin sayısı ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlılığını ifade eden p değerleri Çizelge 5.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2. Beta Arrestin 1 aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde mikrodizin verilerinin analizi sonucunda farklılık gösteren genlerle yapılan yolak analiz.

Yolak İsmi	**Gen**	**p Değeri**
Hücre döngüsü	14	4.30e-07
p53 Sinyal yolağı	7	0.0007
Jak-STAT Sinyal yolağı	9	0.0054
'Natural killer' hücre aracılı sitotoksisite yolagğı	7	0.0195

5.9.2. MİKRODİZİN'DEN ELDE EDİLEN HÜCRE DÖNGÜSÜ İLE İLGİLİ FARKLI İFADE GÖSTEREN GENLER İÇİN HİYERARŞİK SINIFLANDIRMA 'HIERARCHICAL CLUSTERING' ANALIZI

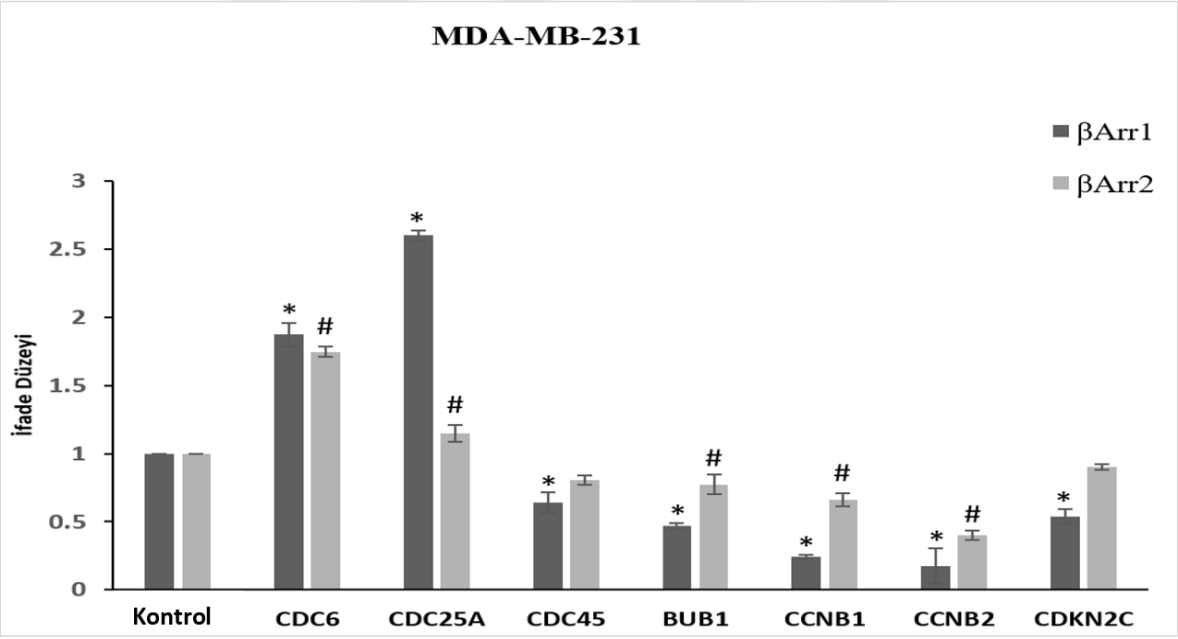
Şekil 5.14.'de görüldüğü gibi Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde mikrodizin analizinden elde edilen hücre döngüsü genlerindeki farklı ifade profilinin görülmüştür. Bunun sonucunda daha detaylı analiz yapmak amacıyla, Beta Arrestin 1 aşırı ifade ettğimiz hücre döngüsü ile ilgili farklı ifade gösteren genler için hiyerarşik sınıflandırma 'Hierarchical clustering' analizi yapılmıştır ve kontrole göre değişenler arasında, CDC6, CDC25A, CDC45, BUB1, CCNB1, CCNB2 ve CDKN2C daha fazla öne çıkmışlar.



Şekil 5.15. İfadesi farklılık gösteren "Hücre Döngüsü" genleri ile gerçekleştirilmiş hiyerarşik sınıflandırma analizi. Hücre döngüsü genleri ile gerçekleştirilen hiyerarşik sınıflandırmaya göre Beta Arrestin 1'in aşırı ifade edildiği hücreler kontrol hücrelerinden ve Beta Arrestin 2'nin aşırı ifade edildiği hücrelerden ayrı sınıflanmıştır. Yeşil kutucuklar ifade azalmasını temsil ederken kırmızı kutucuklar ifade artışını göstermektedir.

5.9.3. MİKRODİZİN SONUÇLARINA GÖRE HÜCRE DÖNGÜSÜNE ÖZGÜ DEĞİŞEN GENLERİN QRT-PCR YÖNTEMİ İLE İFADE DÜZEYLERİNİN DOĞRULANMASI

Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB -231 hücrelerinde, mikrodizin analizi sonucunda elde edilen verilerle gerçekleştirilen hiyerarşik sınıflandırma sonucunda grupları birbirinden anlamlı olarak ayırabilen genler eş zamanlı PCR yöntemiyle doğrulanmıştır. Şekil 5.15.'de görüldüğü gibi mikrodizin sonuçları ile uyumlu olarak CDC6 ve CDC25A hem Beta Arrestin 1 hem de Beta Arrestin 2 aşırı ifade ettiğimiz hücrelerde kontrole hücrelere göre ifade artışı gösterirken CDC45, BUB1, CCNB1, CCNB2 ve CDKN2C her iki hücre grubunda da kontrole göre azalmıştır. İfade artış ve azalışlarının özellikle Beta Arrestin 1'in ifade artışının gerçekleştiği hücrelerde daha belirgin olduğu saptanmıştır.



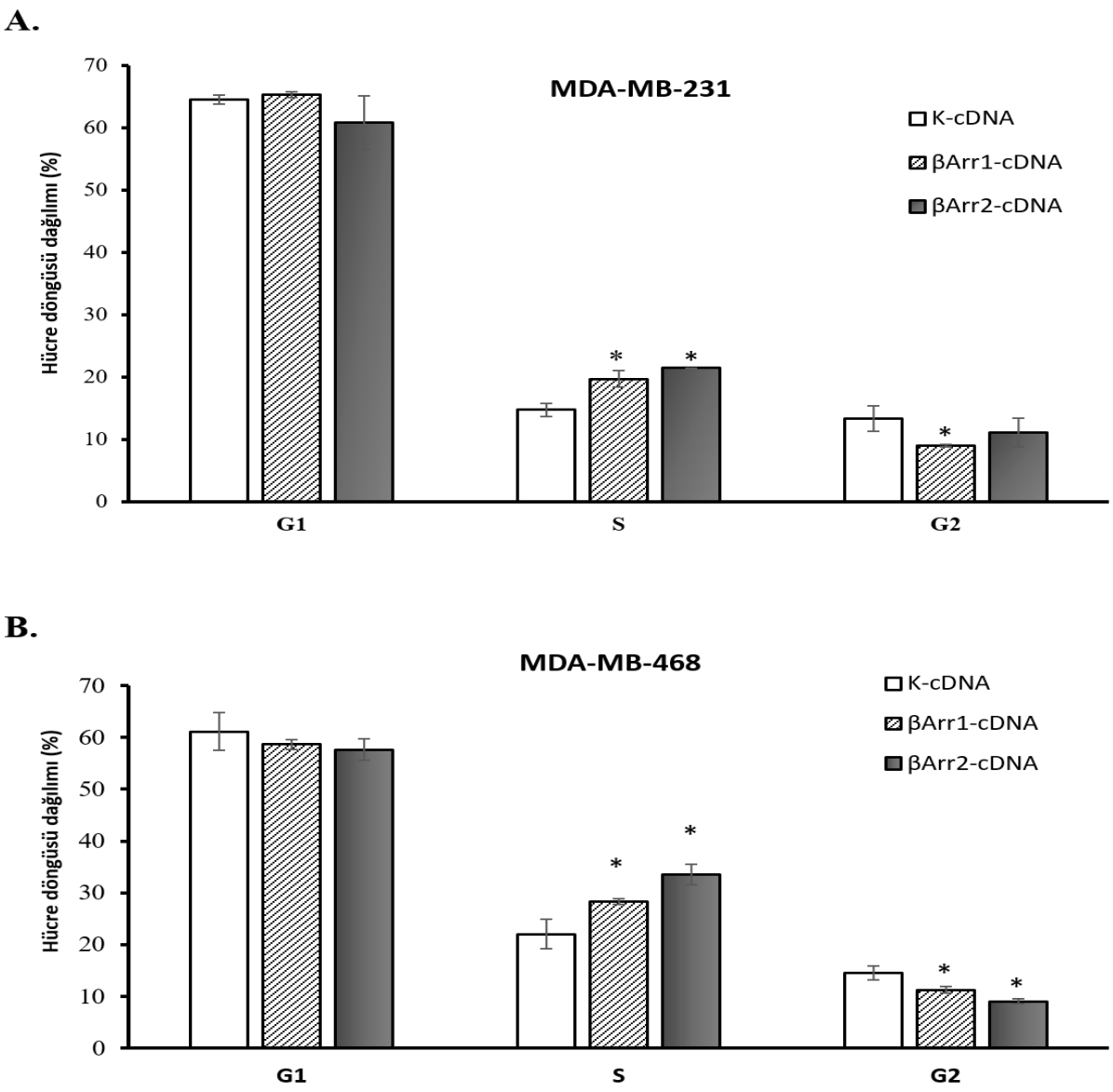
Şekil 5.16. Hücre döngüsü genlerinin ifade profilleri qRT-PCR yöntemi ile doğrulanması. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde kontrole göre değişen mRNA değerleri, mikrodizin verilerini izleyerek eş zamanlı kantitatif PCR sistemi ile valide edildi. Y ekseni, ifade düzeyinde kat değişimini göstermektedir. Sonuçlar, iki biyolojik ve teknik tekrarın ortalama ve standart sapması olarak gösterilmektedir (Beta Arrestin 1 / kontrol için * $p < 0.05$; Beta Arrestin 2 / kontrol için # $p < 0.05$; t-testi).

5.10. AKIŞ SİTOMETRİ İLE HÜCRE DÖNGÜSÜ ANALİZİ

MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinleri aşırı ifade edildikten sonra akış sitometri sistemi kullanılarak hücre döngüsü incelendi.

Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 aşırı ekspresyonunu takiben, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde S faz fraksiyonu anlamlı biçimde artarken, G2 faz fraksiyonunda anlamlı olarak azalma görüldü. Şekil 5.16.'nın A panelinde görüldüğü gibi MDA-MB-231 hücrelerinde S fazındakı hücre döngüsü dağlımı k-cDNA, Beta Arrestin 1 cDNA transfeksiyonu veya Beta Arrestin 2 cDNA transfeksiyonunda yaklaşık olarak sırasıyla %14, %20.5 ve %23 olarak ölçüldü. G2 fazındakı hücre döngüsü dağlımı k-cDNA, Beta Arrestin 1 cDNA transfeksiyonu veya Beta Arrestin 2 cDNA transfeksiyonunda yaklaşık olarak sırasıyla %13, %9 ve %11.5 olarak ölçüldü.

Şekil 5.16.'nın B panelinde görüldüğü gibi MDA-MB-468 hücrelerinde S fazındakı hücre döngüsü dağlımı k-cDNA, Beta Arrestin 1 cDNA transfeksiyonu veya Beta Arrestin 2 cDNA transfeksiyonunda yaklaşık olarak sırasıyla %21.5, %29 ve %34 olarak ölçüldü. G2 fazındakı hücre döngüsü dağlımı k-cDNA, Beta Arrestin 1 cDNA transfeksiyonu veya Beta Arrestin 2 cDNA transfeksiyonunda yaklaşık olarak sırasıyla %14, %9.5 ve %8 olarak ölçüldü.

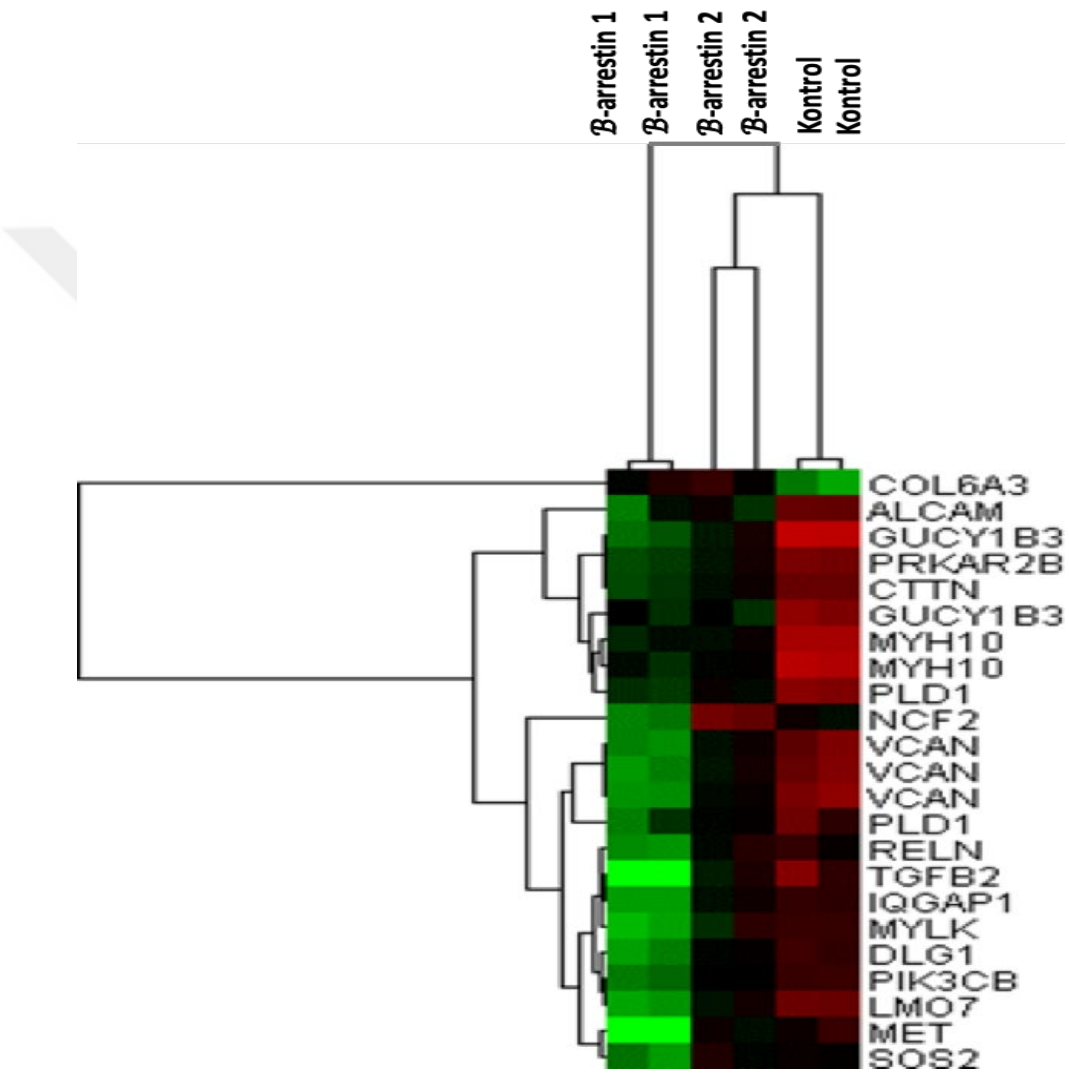


Şekil 5.17. Hücre döngüsü analizi; Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 (βArrl ve βArr2) proteinlerini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231(Panel A.) ve MDA-MB-468 (Panel B.) hücre hatlarında yapıldı. Sonuç olarak, her iki hücre hattının S fazındaki (Sentetik faz) hücre popülasyonlarının anlamlı ölçüde arttığını gözlemledik. Dolayısıyla G2 (Gap 2) fazındaki hücrelerin miktarının her iki hücre hattında anlamlı olarak azaldığını tespit ettik. **S**onuçlar NovoExpress 1.0.2 analiz yazılımı ile analiz edilmiştir. Veriler, ortalama ± standart hatası şeklinde verilmiştir, n sayısı 4, *= $p < 0.05$, Kontrol cDNA'ya karşı anlamlı kabul edilmiştir.

5.11. MİKRODİZİN'DEN ELDE EDİLEN İNVAZYON İLE İLGİLİ FARKLI İFADE GÖSTEREN GENLER İÇİN HİYERARŞİK SINIFLANDIRMA 'HIERARCHICAL CLUSTERING' ANALIZI YAPILMASI

MDA-MB-231 hücrelerinde Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 artışı ile xCelligence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA) DP sistemi ile ölçüm sonuçlarını göz önüne alarak ve mikrodizin sonuçlarında anlamlı olarak ifade farklılığı gösteren genlerin analizi sırasında özellikle hücre invazyonu ile ilişkili olabilecek genler dikkat çekmiştir. Bu genler ile hiyerarşik sınıflandırma analizleri ve Gerçek-zamanlı PCR ile doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu genlerin ifade düzeylerine bakıldığında özellikle Beta Arrestin 1 ifadesinin arttırıldığı hücrelerde invazyon ile ilgili genlerin ifadelerinde azalma olduğu saptandı. Hiyerarşik sınıflandırma analizlerinde Beta Arrestin 1 ve Beta Arrestin 2 transfekte hücreler kontrol hücrelerinden farklı gruplanmıştır. Beta Arrestin 1 aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 hücrelerinde TGFB2 ve MET genlerin ifade düzeylerinde anlamı miktarda azalma görüldü.

5.12. İNVAZYON İLE İLGİLİ GENLER İÇİN HİYERARŞİK SINIFLANDIRMA 'HIERARCHICAL CLUSTERING' ANALIZI

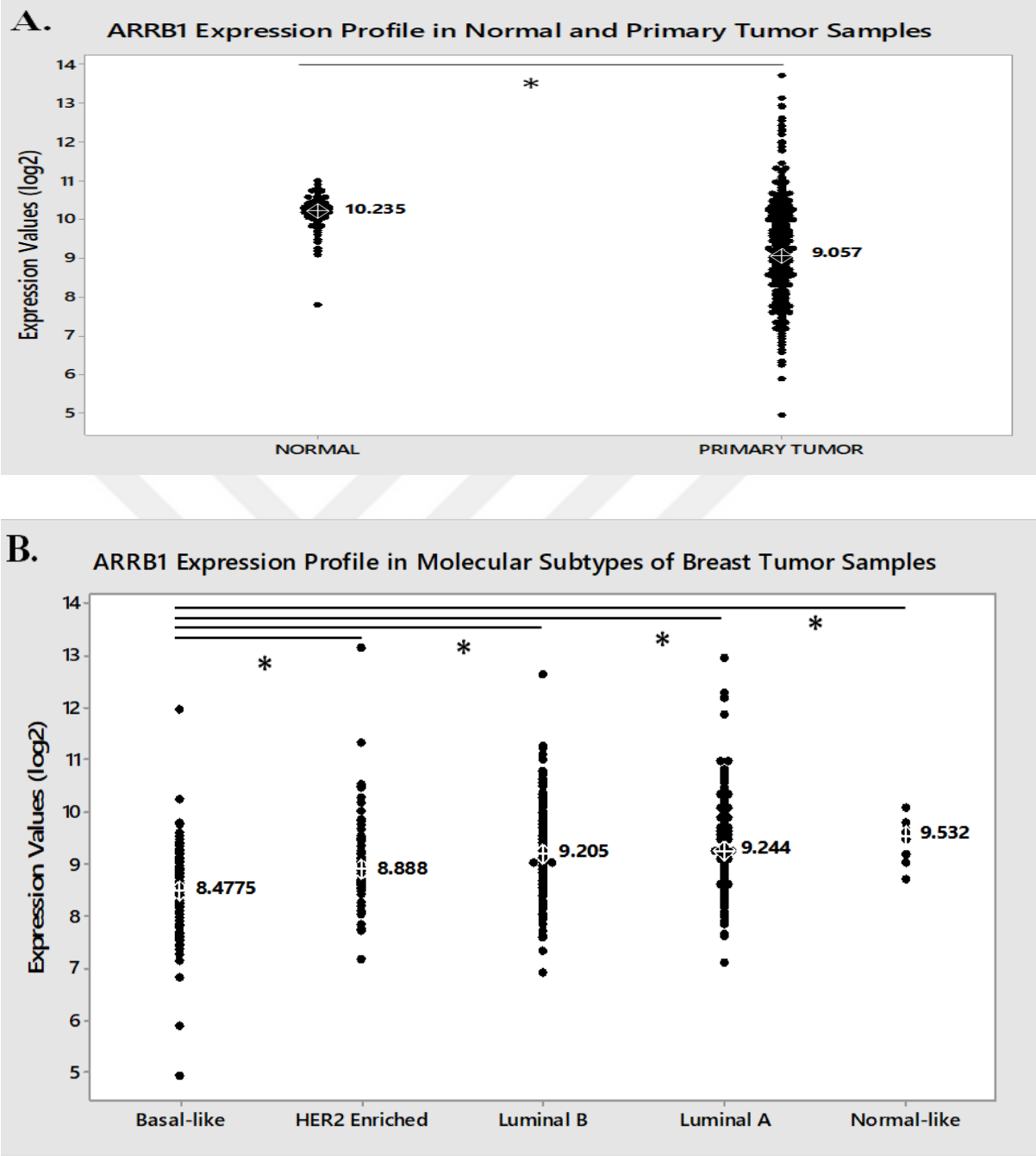


Şekil 5.18. Hücre hareketliliği ve invazyon ile ilgili olabilecek İfadesi farklılık gösteren genler ile gerçekleştirilmiş hiyerarşik sınıflandırma analizi. Mikrodizin veri analizinden invazyon ile ilgili olabilecek seçilen genler ile gerçekleştirilen hiyerarşik sınıflandırmaya göre özellikle Beta Arrestin 1'in aşırı ifade edildiği hücreler kontrol hücrelerinden ve Beta Arrestin 2'nin aşırı ifade edildiği hücrelerden ayrı sınıflanmıştır. Yeşil kutucuklar ifade azalmasını temsil ederken kırmızı kutucuklar ifade artışını göstermektedir.

5.13. TCGA VERİ ANALİZİ

5.13.1. BETA ARRESTİN 1 PROTEİNİNİN TCGA VERİ ANALİZİ

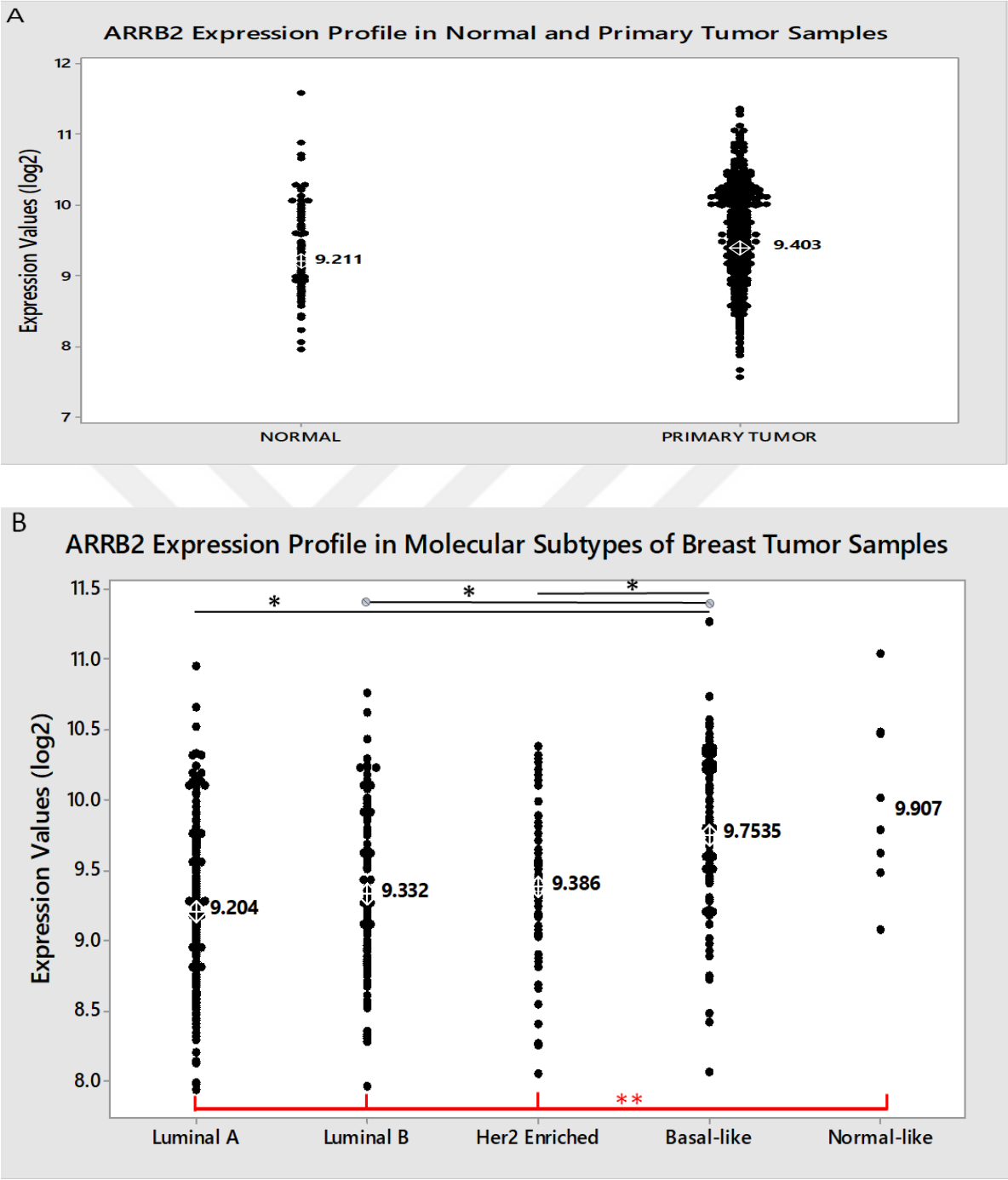
Beta Arrestin 1 ve 2 proteininin klinik önemini belirlemek için bu iki genin ifade profilleri ‘*’Xena Browser*’’ aracılığıyla TCGA veri tabanında araştırıldı (122). Şekil 5.18.’in panel A kısmında görüldüğü gibi, meme kanserlerinde normal dokulara kıyasla Beta Arrestin 1 ekspresyonunun anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Panel B kısmında meme kanserlerinin moleküler alt tiplerinde yapılan analiz gösterilmiştir. Bu analize göre Beta Arrestin 1 proteininin ekspresyonu luminal A alt tipinden daha agresif alt tiplere doğru kademeli olarak azaldığı görülmektedir.



Şekil 5.19. Klinik verilere dayanarak Beta Arrestin 1 proteininin meme kanserindeki ifade düzeyinin TCGA veri tabanı aracılığıyla incelenmesi. Panel A; Normal doku ile tümör dokusunun Beta Arrestin1 proteini seviyesinin kıyaslanması, Beta Arrestin 1 proteini seviyesi tümör dokularında anlamlı biçimde düşük saptandı. Tek yönlü anova, p= 0.000 (f=77.84). Panel B; Beta Arrestin 1 proteini ifade seviyesi, PAM50 (*Prediction Analysis of Microarray 50*) sınıflandırmasına göre Normal benzeri alt tipinden Bazal benzeri alt tipe doğru gidildikçe anlamlı olarak azalmaktadır. Tek yönlü anova, p = 1.799e-14 (f = 18.84).

5.13.2. BETA ARRESTİN 2 PROTEİNLERİN TCGA VERİ ANALİZİ

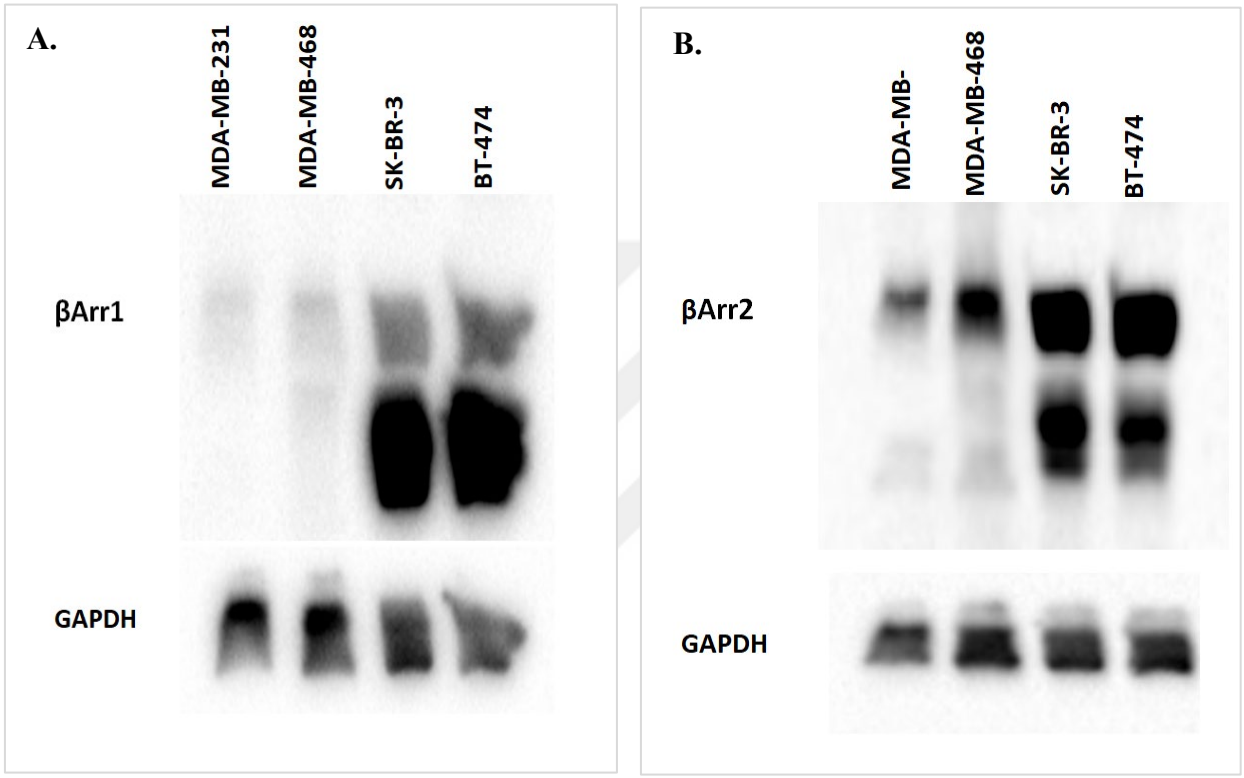
Beta Arrestin 2 proteini için yapılan TCGA analizi, Şekil 5.19.'ün panel A kısmında görüldüğü gibi tümör dokusu ve normal dokulardan alınan örnekler arasında anlamlı bir farklılık izlenmedi. Fakat meme kanserinin moleküler alt tipleri değerlendirildiğinde, Şekil 5.19'ün panel B kısmında görüldüğü normal benzeri tipinden daha agresif alt tiplere doğru Beta Arrestin 2 proteininin ifadesinin azaldığı saptandı.



Şekil 5.20. Klinik verilere dayanarak Beta Arrestin 2 proteininin meme kanserlerindeki ifade düzeylerinin TCGA veri tabanı aracılığı ile incelenmesi. Panel A; Normal dokularla tümör dokuları arasında Beta Arrestin 2 ifade seviyelerinde anlamlı fark görülmedi. Tek yönlü anova. p = 0.09138 (f = 2.397). Panel B; Beta Arrestin 2 ifade seviyesi, PAM50 sınıflandırmasına göre Normal benzeri alt tipten Bazal benzeri alt tipine doğru anlamlı olarak azalmaktadır. Tek yönlü anova. p =1.117e-13 (f = 17.77).

5.14. BETA ARRESTİN 1 VEYA 2 PROTEİNLERİN IFADE DÜZEYLERİNİN FARKLI HÜCRE HATLARINDA İNCELENMESİ

Şekil 5.21.'de görüldüğü gibi Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerinin farklı meme kanseri hücrelerinde ifade düzeyleri TCGA datalar ile paralel olarak analmı şekilde farklık güstermektedir. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde Beta Arrestinlerin ifadesi Üçlu Negatif olmayan SKBR3 ve BT474 meme kanseri hücre hatlarına karşı anlamlı ölçüde azalma görülmektedir.



Şekil 5.21 Farklı meme kanseri hücre hatlarında Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerin ifade seviyeleri; Proteinlerin ifadeleri GAPDH proteininin ifade düzeyine göre normalize edilmiştir. n sayısı, 4, *p <0.05.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Arrestin proteinleri 1986 yılında Herman Kuhn tarafından görsel rodopsin sisteminde G-protein bağlı reseptörlerin (GPKR'ler) aktivitesini düzenleyen mekanizmanın bir parçası olarak keşfedilmiştir (125). Aynı zamanda bu proteinlerin β-adrenerjik reseptörler üzerinde de etkili rol aldıkları, Martin Lohse ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Keşif tarihlerinden bu zamana kadar Beta Arrestin proteinlerinin çeşitli hücresel mekanizmalarda yer aldıkları gösterilmiştir (59). Bu ailedeki proteinlerin ilk tanımlanan görevleri reseptör desensitizasyonu olduğu için, Arrestinler denilmiş ve isimlerinin Beta kısmı, β2-adrenerjik reseptörlere bağlanma kabiliyetlerinin rhodopsinlere göre daha fazla olduğu için verilmiştir(126).

Beta Arrestinler G protein kenetli reseptörler ile iyi karakterize edilmiş rollerinin ötesinde, hücre döngüsü regülasyonu, hücre göçü ve apoptotik sinyal dahil olmak üzere birçok temel hücresel fonksiyonun düzenlenmesinde rol almaktadırlar.

Son zamanlarda Beta Arrestinlerin kanser gelişimi ve progresyonunda düzenleyici görevleri olduğuna dair artan miktarda kanıt vardır. Genel olarak bu çalışmalar, Beta Arrestinlerin G proteini bağımlı ve bağımsız olarak GPKR sinyalleri üzerinde düzenleyici etkileri olduğu için bu proteinlerin kanser üzerindeki etkileri GPKR üzerindeki düzenleyici etkilerine odaklanmaktadır. Genel olarak bu çalışmalarda Beta Arrestinlerin kanser hücrelerindeki etkileri GPKR'ler üzerinden dolaylı olarak açıklanmaktadır. Kanser hücrelerinde birbirlerinden yapı ve fonksiyon bakımından farklı birçok GPKR'nin farklı farklı etkinlikleri söz konusu olması nedeniyle Beta Arrestinlerin kanser araştırmalarındaki rolü hakkında çelişkili sonuçların elde edilmesi kaçınılmazdır. Ancak Beta Arrestinlerin kanser hücreleri üzrinde doğrudan etkisi ve kanser hücrelerinin gen ifade düzeyleri üzerindeki etkileri konusunda az sayıda çalışma yapılmıştır (127).

Bu çalışmada Beta Arrestinlerin meme kanser hücrelerinin fonksiyonları ve regülasyonlarına olan etkilerini mümkün olduğunca daha doğrudan gözlemlemeyi ve bu proteinlerin meme kanseri hücrelerindeki gen ifade düzeyleri üzerinde etkilerini araştırmayı hedefledik.

İlk aşamada Beta Arrestin 1 ve Beta Arrestin 2 proteinleri, ilgili siRNA'larını kullanarak susturuldu. Bunun sonucunda MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde proliferasyon miktarının arttığı, invazyonun ise kolaylaştığı görüldü. Bunun yanısıra, Beta Arrestin 1 ve 2'nin aşırı ifade edilmesiyle her iki hücre hattında proliferasyon ve invazyonun azaldığı saptanmıştır. Yaptığımız deneylerin sonuçları bu proteinlerin ÜÇLÜ NEGATIF MEME KANSER hücre hatlarında potansiyel bir tümör baskılayıcı etkisi olduğu yönündedir.

Beta arrestinlerin hücre proliferasyonu, apoptoz, invazyon ve tümör büyümesi üzerindeki etkilerini gösteren çelişen sonuçların varlığına rağmen, çalışmamızla paralel sonuçlar gösteren çalışmalar da mevcuttur (112)(128)(129)(130).

Bizim sonuçlarımızı destekleyen çalışmalardan, Cao ve arkadaşları, Beta Arrestin 2 ekspresyonunun azalmasının böbrek kanseri hücre hatlarında proliferasyonun ve invazyonun artmasına neden olduğunu ve aynı deneyde bu proteinin ifade artışının tam tersine bu bahsedilen etkileri azalttığını göstermişlerdir (129). Başka bir çalışmada Sun ve arkadaşları, Beta Arrestin 2 proteininin azaltılmasının hepatoselüler karsinoma hücrelerinde invazyonu arttırdığını, Beta Arrestin 2 proteininin düşük düzeylerinin kötü prognozla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (131). Ayrıca, Raghuwashi ve arkadaşları Beta Arrestin 2 proteininin beta arr2-deficient mice (beta arr2(-/-) olmadığı iki farklı akciğer fare kanseri modelinde anjiyogenez, tümör gelişimi ve metastazı hızlandırıp arttırdığını göstermişlerdir (92).

Beta Arrestinlerin potansiyel antikanser etki mekanizmalarını anlamak ve tanımlayabilmek için, microarray analizi yapıldığında Beta Arrestin 1 ve 2 proteininin aşırı ifade edilmesi sonucu MDA-MB-231 hücrelerinde gen ifade düzeylerinde farklılıkların olduğu gözlemlendi. Bu farklı ifade olan genler ile hiyerarşik kümeleme ve yolak analizleri yapıldığında beta-arrestinlerin aşırı ifadesi ile özellikle hücre döngüsü, p53, jak stat ve

‘Natural killer’ hücre aracılı sitotoksisite yolakları ile ilgili genlerde kümeleşmenin olduğu görüldü. Bu sonuçlar, Beta Arrestin 1 veya 2 proteininin hücre döngüsü genleri üzerinde etkisi olduğunu ve etkinin hücre proliferasyonunda gözlemlenen azalmayı açıklayabileceğini göstermektedir. Beta Arrestin 1 ve 2 proteinini aşırı ifade ettiğimiz MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinde hücre döngüsü değerlendirdiğimizde, hücre döngüsünün S fazında uzama olduğunu ve G2 fazın azaldığını gözlemledik. Hücre döngüsünde gözlemlenen bu etkinin proliferasyonundaki azalmayı açıklayabileceğini düşünüyoruz. Mikroarray’den elde edilen hücre döngüsü ile ilgili bazı genler qRT-PCR ile valide edildi. Beta Arrestin 1 ve 2 proteinini aşırı ifade ettiğimiz hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla CDC6 ve CDC25a genlerinin upregüle olduğu görüldü.

CDC6 proteini, DNA replikasyonunda görev alan ana proteinlerden biridir ve bu proteinin upregülasyonunun mitozu önlediğine dair kanıtlar mevcuttur (132).

Bu çalışmada Beta Arrestin 1 ve 2 proteininin overekspresyonuyla CDC6 proteini aracılı antiproliferatif bir yanıt oluşabileceği gözlenmiştir.

Siklin bağımlı kinaz’ler (CDK; Cyclin-dependent kinases) hücre döngüsünün ilerlemesini ve aktivitesini sıkı bir biçimde kontrol eden proteinlerdir. Bu kontrolü bir defosforilasyon enzimi olan CDC25A aracılığı ile yaparlar (133) ve aynı zamanda aşırı ya da anormal CDK aktivitesi DNA’da çift zincir kırıklıklarına ve DNA hasarlarına yol açabilir (134)(135). Beta Arrestin 1 ve 2 proteinini aşırı ifade ettiğimiz hücrelerde CDC25A’nın upregülasyonu CDK aktivitesini attırabilir ve bu artış S fazının uzamasının altında yatan sebeplerden biri olabilir. Ayrıca çalışmamızda Beta Arrestin 1 ve 2 proteinini aşırı ifade ettiğimiz hücrelerde CDK4 ve Farklı meme kanseri hücre hatlarında Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerin ifade seviyeleri; Farklı meme kanseri hücre hatlarında Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerin ifade seviyeleri; CDK6 inhibitörü olarak bilinen CDKN2C (p18) miktarının azaldığını gösterdik. CDKN2C’nin downregüle olması CDK aktivitesinin anormal artmasına yol açabilir. Üçlü negatif meme kanseri ailesine ait olan BT-20 meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada CDKN2c geni nokta mutasyonu ile inaktive edilmiş ve bu hücrelerde hücresel büyümenin baskılandığı görülmüştür (136). Bu çalışmada görülen CDK düzeyindeki

artış ÜÇLÜ NEGATIF MEME KANSER'lerde saptanan hücre döngüsüne ve hücre çoğalmasıa olan etki ile ilişkili olabileceği yönündedir.

Beta Arrestin 1 ve 2 proteininin aşırı ifadesinin proliferasyon ve hücre döngüsü üzerindeki etkisinin altında yatan bir diğer mekanizma ise CDC45 azalması ile ilgili olabilir. Bazı çalışmalarda CDC45 varlığının ve aktivitesinin, bölünen hücrelerde ve hücre döngüsünün S fazında önemli görevleri olabileceği, ayrıca CDC45 seviyelerinin sağlıklı hücrelerle kıyaslandığında kanser hücrelerinde daha fazla bulunduğu gösterilmiştir (137)(138).

Bir diğer önemli gen ise BUB1'dir ve aynı isimli proteini kodlamaktadır. Bu proteinin ifadesini shRNA kullanarak susturulması MDA-MB-231 hücrelerinde kanser kök hücre potansiyelini azaltmıştır. Ayrıca proteinin xenograft fare modellerinde antikanser etkisi olduğu gösterilmiştir (139). Bu çalışmada Beta Arrestin 1 ve 2 proteini aşırı ifade edilen MDA-MB-231 hücrelerinde BUB1 proteini ekspresyonunun önemli oranda azaldığı saptanmıştır. Beta Arrestin 1 ve 2 proteinini aşırı ifade ettiğimiz hücrelerde CCNB1 ve CCNB2 genlerinde anlamlı şekilde azalma gözlemledik. Bu genlerin kodladığı proteinler kanserle ilişkili olup ve meme kanseri dahil çeşitli kanser tiplerinde yüksek oranda ifade edilmektedirler. Ayrıca bu genlerin downregülasyonunun tümör gelişimini inhibe edebileceği ve antikanser ilaçların etkililiğini artırabileceği bildirilmiştir (140)(141). Bunlara ek olarak, bu proteinlerin ifade seviyelerinin ölçülmesinin kanser progresyonu için bir biomarker olarak kullanılabileceği de öne sürülmüştür (142)(143).

Beta Arrestin 1 ve 2 proteininin hücre motilitesi migrasyonu ve invazyonu üzerine olan etkileri ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (128)(130)(131)(144)(92). Birkaç çalışmada GPKR aracılı hücre motilitesinin Beta Arrestinlere bağlı olduğu söylenirken Beta Arrestin 2 ekspresyonunun azalmasının CXCR4 (chemokine receptor type 4aracılı hücre göçünü azalttığından da bahsedilmektedir (130)(144)(145). Diğer yandan, Raghuwani ve Sun, Beta Arrestin 2 proteininin downregulasyonunun fare hücrelerinde oluşturulan akciğer ve hepatoselüler kanser modellerinde tümör metastazını ve invazyonunu arttırdığını göstermişlerdir (131)(92). Bizim sonuçlarımız, MB-231 ve MB-468 hücre hatlarında Beta

Arrestin 1 ve 2 proteininin overekspresyonunun hücre invazyonunu anlamlı derecede düşürdüğünü göstermiştir.

Bu gözlemlerin altında yatan mekanizmayı daha iyi anlamak için, hücre motilitesinde görev alan farklı proteinlerin ifade düzeylerini inceledik. Beta Arrestin 1 ve 2 proteinini aşırı ifade ettiğimizde, IGF1-R, HER-3 ve Snail ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. Bizim bulgularımızı destekleyecek nitelikte Beta Arrestin 1 ve 2 proteinlerinin, IGF-IR'nin ubiquitinasyon ile yıkılmasında temel öneme sahip oldukları gösterilmiştir (146)(147). Beta Arrestin 1 ve 2 proteininin IGF-1R sinyal yolağı üzerindeki negatif etkisinin Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde gözlemlenen proliferasyon ve invazyonu azaltıcı etkide önemli olduğu düşüncesindeyiz.

HER3 reseptörü meme kanserlerinin davranışlarının oluşumunda önemli görevleri olan düzenleyici bir proteindir. HER3'ün HER2 ve EGFR ile heterodimerize olarak uyardığı yolaklar hücre proliferasyonu, tümör gelişimi, invazyon ve metastazı arttırmaktadır. (148)(149).

E-cadherin, SNAIL ve Vimentin hücre motilitesi ve metastazı ile ilişkili olduğu bilinen epitelyal-mezenkimal geçiş belirteci olan proteinlerdir. E-cadherin'in düşük düzeyde, SNAIL ve Vimentin'in yüksek seviyede ekspresyonunun invazyonu ve metastaz riskini arttırdığı düşünülmektedir (150)(151). E-cadherin ve Snail'i önemli ölçüde ifade etmeyen MDA- MB-231 hücrelerinde Beta Arrestin 1 ve 2 proteinini aşırı ifade ettiğimiz zaman bu hücrelerde Snail'in ifade düzeyinde anlamlı azalma görülürken, E-cadherinde anlamlı bir değişim gözlenmedi. MDA-MB-468 hücrelerinde ise Beta Arrestin 1 ve 2 proteinini aşırı ifade ettiğimiz zaman Snail'in ifade seviyesinde anlamlı miktarda azalma tespit ettik. Bu sonuçları göz önüne aldığımızda Beta Arrestin 1 ve 2 proteininin aşırı ifadesinin hücre motilitesine etkisinin HER3, IGF-1R ve Snail proteinlerinin ifade seviyesindeki azalmayla ilişkili olabileceğini düşündük.

Beta Arrestin 1 ve 2'nin çekirdekteki çeşitli genlerin ekspresyonu üzerinde düzenleyici etkileri olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (127)(90). Bu çalışma Beta Arrestin 1 ve

2 proteininin CDC45, BUB1, CCNB1, CCNB2, CDKN2C, HER-3 ve Snail'in ifade seviyeleri üzerindeki etkisini gösteren ilk çalışmadır. IGFR-1R ifade seviyesi de dahil olmak üzere bu etkilerin altında yatan mekanizmaları aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmanın devamında bizim çalışmalarımız ve Beta Arrestin proteinlerinin klinik verileri arasındaki ilişkiyi değerlendirerek sonuçlarımızın çeşitli meme kanserlerinde önemini araştırdık.

İlk aşamada meme kanser hücrelerindeki Beta Arrestin 1 ve 2 proteinlerinin ifade profillerini TGCA veri seti üzerinden inceledik ve meme kanseri üzerindeki klinik önemini araştırdık. TGCA veri taban üzerindeki yapılan analizler sonucunda Beta Arrestin 1 proteininin ifadesi luminal A alt tip meme kanserinden, bazal benzer agresif kanser alt tiplerine doğru kademeli olarak azaldığı görülmüştür. Beta Arrestin 1 veya Beta Arrestin 2 proteinlerin ifade düzeylerini Üçlü negatif meme kanseri olmayan hücre hatlarında western blot ile incelediğimizde'de Beta Arrestin proteinlerin ifade seviyeleri Üçlü negatif meme kanseri olmayanlarda daha fazla ifade olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar TGCA analiz sonuçlar ile paralel olduğunu göstermektedirler.

PAM 50 sınıflandırma sistemi ile TGCA verilerini kullanarak tümör verileri ve normal veriler karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar bu genin potansiyel bir tümör supressor olabileceğini ve meme kanserinde prognostik bir değere sahip olabileceğini göstermektedir (123).

Buna ek olarak Michal ve arkadaşlarının immünofloresan bazlı çalışmasında meme kanserinin agresifliğinin artmasının Beta Arrestin 1 ekspresyonunda anlamlı şekilde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada Beta Arrestin 1 proteininin azalması tümör boyutu, çekirdek çapı ve lenf nodu metastazında artış ve hayatta kalma süresinde bir azalma ile ilişkili olduğu bulunmuştur (97).

Bu kapsamda, Lundgren ve arkadaşları tarafından öne sürülen Beta Arrestin 1 proteininin meme kanserinde potansiyel prognostik bir marker olabileceği fikrini de desteklemektedir (96).

Bu çalışmada; TGCA analizlerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde tümör doku örneklerindeki Beta Arrestin 2 proteininin ifade düzeyinde kontrole göre anlamlı bir fark görülmedi, ancak normol benzer fenotipli kanser örnekleri ile karşılaştırıldığında meme kanserinin moleküler alt tiplerinde downregüle olduğu gözlenmiştir.

TGCA verilerinin analizi ile elde edinilen bilgilere göre Beta Arrestinlerin değişik düzeyde ifade edilmelerinin kanser meme dokularının davranışlarını değiştirdiğini ve bu durumun klinik veriler içinde önemli olduğunu tespit ettik.

TCGA veri analizine ve mikrodizi sonuçlarına göre Beta Arrestin 1 proteini klinik olarak daha anlamlı göründüğü için, Beta Arrestin 1 ve 2 proteininin ÜÇLÜ NEGATIF MEME KANSER hücrelerindeki antikanser etkilerinin moleküler mekanizmaları arasındaki farklar İleriye yönelik çalışmalar ile aydınlatılmalıdır.

6.2. SONUÇ

Sonuç olarak Beta Arrestin 1 ve 2 proteinlerinin ifadesindeki artış ÜÇLÜ NEGATIF MEME KANSER hücrelerinin proliferasyon ve invazyon kapasitesini azaltmaktadır. Moleküler analiz sonuçları bize Beta Arrestinlerin hücre döngüsü genleri, büyüme faktör reseptörleri, IGF-1R, HER3, Snail ve hücre invazyonu ile ilişkili gen/proteinler üzerindeki etkilerinin olduğunu ve bu etkilerin hücre hareketliliğini ve hücre döngüsünün S fazında duraklama ile proliferasyonu azaltıcı yönde olabileceğini göstermektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçların klinik veriler ile uyum içinde ve paralel olduğu saptanmıştır. İleriye yönelik çalışmalar ile Beta Arrestin 1 ve 2'nin antikanser ve tümör baskılayıcı etkileri preklinik olarak hayvanlarda yapılacak meme kanser modelleri üzerinde araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Kalimutho M, Nones K, Srihari S, Duijf PHG, Waddell N, Khanna KK. Patterns of Genomic Instability in Breast Cancer. Trends Pharmacol Sci [Internet]. 2019;40(3):198–211. Available from: https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.01.005

2. Roche. Breast cancer A guide for journalists on breast cancer and its treatment. Roche. 2016;3–6.

3. World Health Organization (WHO). Internacional Agency for Research on Cancer. Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, all cancers, both sexes, all ages. GLOBOCAN Cancer Today [Internet]. 2018;2018. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2018&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&gro

4. Nounou MI, Elamrawy F, Ahmed N, Abdelraouf K, Goda S, Syed-Sha-Qhattal H. Breast cancer: Conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies supplementary issue: Targeted therapies in breast cancer treatment. Breast Cancer Basic Clin Res. 2015;9:17–34.

5. Society AC. Breast Cancer. NCCN Guidel Breast Cancer Patients,. 2017;(February):6.

6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin [Internet]. 2018;68(6):394–424. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593

7. Tanis PJ, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Kroon BBR. Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. J Am

Coll Surg. 2001;192(3):399–409.

8. Aronson KJ, Miller AB, Wooleott CG, Sterns EE, McCready DR, Lickley LA, et al. Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000;9(1):55–63.

9. Breast Cancer. 2018;

10. Alaa Alkhazraji, Mohamed Elgamal, Shi Hui Ang, Velizar Shivarov. All cancer hallmarks lead to diversity. Int J Clin Exp Med. 2019;12(1):132–57.

11. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2018. 2018;

12. Wang C, Kar S, Lai X, Cai W, Arfuso F, Sethi G, et al. Triple negative breast cancer in Asia: An insider's view. Cancer Treat Rev. 2018;62:29–38.

13. ABDEL R. OMRAN. The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change. Milbank Q [Internet]. 2005;83(4):731–57. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2690264/pdf/milq0083-0398.pdf

14. Gersten O, Wilmoth JR. The cancer transition in Japan since 1951. Demogr Res. 2002;7(August):271–306.

15. Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagyi GN. Breast carcinoma in men: A population-based study. Cancer. 2004;101(1):51–7.

16. Gross RE. Breast cancer: risk factors, screening, and prevention. Semin Oncol Nurs [Internet]. 2000;16(3):176–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967790

17. Couto E, Hemminki K. Estimates of heritable and environmental components of familial breast cancer using family history information. Br J Cancer. 2007;96(11):1740–2.

18. La Vecchia C, Giordano SH, Hortobagyi GN, Chabner B. Overweight, Obesity, Diabetes, and Risk of Breast Cancer: Interlocking Pieces of the Puzzle. Oncologist. 2011;16(6):726–9.

19. Gunter MJ, Wang T, Cushman M, Xue X, Wassertheil-Smoller S, Strickler HD, et al. Circulating Adipokines and Inflammatory Markers and Postmenopausal Breast Cancer Risk. J Natl Cancer Inst. 2015;107(9):1–10.

20. Hildebrand JS, Gapstur SM, Campbell PT, Gaudet MM, Patel A V. Recreational physical activity and leisure-time sitting in relation to postmenopausal breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2013;22(10):1906–12.

21. Little MP. Cancer and non-cancer effects in Japanese atomic bomb survivors. J Radiol Prot. 2009;29(2).

22. Moran MS. Radiation therapy in the locoregional treatment of triple-negative breast cancer. Lancet Oncol [Internet]. 2015;16(3):e113–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71104-0

23. Pillai S, Vakili-Azghandi M, Sandry R, Yin Lam AK, Nassiri M, Kooshyar MM, et al. Hereditary breast cancer; Genetic penetrance and current status with BRCA. J Cell Physiol. 2018;(August 2018):5741–50.

24. Turnbull C, Rahman N. Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2008;9(1):321–45.

25. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkas K, Roberts J, et al. Breast-Cancer Risk in Families With Mutations in PALB2 EDITORIAL COMMENT. N Engl J Med. 2014;371(6):497–506.

26. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers : clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of

Switzerland. 2009;(December 2008):628–35.

27. Kerlikowske K. Epidemiology of Ductal Carcinoma In Situ. 2010;139–41.

28. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Research article Infiltrating lobular carcinoma of the breast : tumor characteristics and clinical outcome. 2004;7–11.

29. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. J Breast Cancer [Internet]. 2016;19(3):223. Available from: https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4048/jbc.2016.19.3.223

30. Provenzano E, Ulaner GA. M o l e c u l a r C l a s s i f i c a t i o n of B re a s t Ca n c e r. Positron Emiss Tomogr [Internet]. 2019;13(3):325–38. Available from: https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004

31. Lehmann BD, Shyr Y, Pietenpol JA, Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. J Clin Invest. 2011;121(7):2750–67.

32. Reen ANRG. Molecular classification of breast cancer : what the pathologist needs to know. 2017;49(February):111–9.

33. Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, et al. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. BMC Res Notes. 2012;5.

34. Perou CM. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. Oncologist [Internet]. 2011;16(Supplement 1):61–70. Available from: http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.2011-S1-61

35. Riley MA, Wertz JE. B ACTERIOCINS : Evolution , Ecology , and Application. 2002;

36. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-

negative breast cancer—the road to new treatment strategies. Lancet [Internet]. 2017;389(10087):2430–42. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0

37. Anjum F, Razvi N, Masood MA. Breast Cancer Therapy: A Mini Review. MOJ Drug Des Dev Ther. 2017;1(2).

38. Reis-filho JS, Ph D. Triple-Negative Breast Cancer. 2010;

39. Uscanga-Perales GI, Santuario-Facio SK, Ortiz-López R. Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. Med Univ [Internet]. 2016;18(71):105–14. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1665579616300667

40. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. Nat Rev Clin Oncol [Internet]. 2016;13(11):674–90. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.66

41. Hwang S-Y, Park S, Kwon Y. Recent therapeutic trends and promising targets in triple negative breast cancer. Pharmacol Ther [Internet]. 2019; Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725819300208

42. Lee A, Djamgoz MBA. Triple negative breast cancer: Emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. Cancer Treat Rev. 2018;62:110–22.

43. Pareja F, Geyer FC, Marchiò C, Burke KA, Weigelt B, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. npj Breast Cancer [Internet]. 2016;2(1):16036. Available from: http://www.nature.com/articles/npjbcancer201636

44. Marotti JD, de Abreu FB, Wells WA, Tsongalis GJ. Triple-Negative Breast Cancer: Next-Generation Sequencing for Target Identification. Am J Pathol [Internet].

2017;187(10):2133–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.05.018

45. Garrido-castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into Molecular Classifi cations of Triple-Negative Breast Cancer : Improving Patient Selection for Treatment. 2019;(February).

46. Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, Olafsdottir K, Steinarsdottir M, Valgeirsdottir S, et al. Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. Breast Cancer Res. 2009;11(4):1–14.

47. He J, Yang J, Chen W, Wu H, Yuan Z, Wang K, et al. Molecular features of triple negative breast cancer: Microarray evidence and further integrated analysis. PLoS One. 2015;10(6).

48. Hubalek M, Czech T, Müller H. Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. Breast Care. 2017;12(1):8–14.

49. Lehmann BD, Jovanović B, Chen X, Estrada M V., Johnson KN, Shyr Y, et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. PLoS One. 2016;11(6):e0157368.

50. Nuber S, Zabel U, Lorenz K, Nuber A, Milligan G, Tobin AB, et al. HHS Public Access. 2016;531(7596):661–4.

51. Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, et al. β-Arrestin2, a novel member of the arrestin/β-arrestin gene family. J Biol Chem. 1992;267(25):17882–90.

52. Abe T, Yamaki K, Tsuda M, Singh VK, Suzuki S, Mckinnon R, et al. Rat pineal S-antigen : sequence analysis reveals presence of a-transducin homologous sequence. 1989;247(2):307–11.

53. Shukla AK, Manglik A, Kruse AC, Xiao K, Reis RI, Tseng WC, et al. Structure of active β-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. Nature

[Internet]. 2013;497(7447):137–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature12120

54. Isolation of retinal lymphocytes in experimental autoimmune uveoretinitis: Phenotypic and functional characterization. Immunology. 1993;78(3):393–8.

55. Stadel JM, Nambi P, Shorr RGL, Sawyer DF, Caron MG, Lefkowitzt RJ. Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the. 1983;80(June):3173–7.

56. Natl MHP, Sci A, Natl IDP, Sci A, Strasser H, Sibley DR, et al. A Novel Catecholamine-Activated Adenosine Cyclic 3 ', 5 ' -Phosphate Independent Pathway for ,& Adrenergic Receptor Phosphorylation in Wild-Type and Mutant S49 Lymphoma Cells : Mechanism of Homologous Desensitization of Adenylate. 1986;(1983):1371–7.

57. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, et al. b-arrestin-dependent formation of b2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. Science (80-) [Internet]. 1999;283(5402):655–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924018%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/283/5402/655.full.pdf

58. Wilden U, Hall SW, Kühn H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(5):1174–8.

59. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. I-Arrestin : A Protein That Regulates [I-Adrenergic. 1984;

60. Hirsch JA, Schubert C, Gurevich V V, Sigler PB. The 2.8 Å Crystal Structure of Visual Arrestin: A Model for Arrestin's Regulation. Cell. 1999;97:257–69.

61. Gurevich V V., Gurevich E V., Uversky VN. Arrestins: structural disorder creates rich

functionality. Protein Cell [Internet]. 2018;1–18. Available from: https://doi.org/10.1007/s13238-017-0501-8

62. Lefkowitz RJ. Arrestins come of age: A personal historical perspective [Internet]. 1st ed. Vol. 118, Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier Inc.; 2013. 3–18 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394440-5.00001-2

63. Gurevich E V., Gurevich V V. Arrestins: Ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. Genome Biol. 2006;7(9).

64. Han M, Gurevich V V, Vishnivetskiy SA, Sigler PB, Schubert C. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 A: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. Structure [Internet]. 2001;9(9):869–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566136%5Cnhttp://ac.els-cdn.com/S096921260100644X/1-s2.0-S096921260100644X-main.pdf?_tid=34d6e796-92e1-11e2-8224-00000aacb361&acdnat=1363950852_147a0d21244dd88d0f0a36b7b8c56fee

65. Gu YJ, Sun WY, Zhang S, Wu JJ, Wei W. The emerging roles of β-arrestins in fibrotic diseases. Acta Pharmacol Sin [Internet]. 2015;36(11):1277–87. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/aps.2015.74

66. Philipp M, Evron T, Caron MG. The role of arrestins in development. Prog Mol Biol Transl Sci. 2013;118:225–42.

67. Hamdan FF, Rochdi MD, Breton B, Fessart D, Michaud DE, Charest PG, et al. Unraveling G protein-coupled receptor endocytosis pathways using real-time monitoring of agonist-promoted interaction between β-arrestins and AP-2. J Biol Chem. 2007;282(40):29089–100.

68. Bayburt TH, Vishnivetskiy SA, McLean MA, Morizumi T, Huang CC, Tesmer JJG, et al. Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. J Biol Chem. 2011;286(2):1420–8.

69. Fan H. β-Arrestins 1 and 2 are critical regulators of inflammation. Innate Immun. 2014;20(5):451–60.

70. McDonald PH. beta -Arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3. Science (80-). 2000;290(5496):1574–7.

71. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. Luttrell-Lefkowitz (secuencias LIEF-RXR). 2002;

72. Gurevich V V., Gurevich E V. The molecular acrobatics of arrestin activation. Trends Pharmacol Sci. 2004;25(2):105–11.

73. Barak LS, Ferguson SS, Zhang J, Caron MG. A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. J Biol Chem. 1997;272(44):27497–500.

74. Goodman OB, Krupnick JG, Gurevich V V, Benovic JL, Keen JH. Arrestin / Clathrin Interaction. 1997;272(23):15017–22.

75. Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. The interaction of β-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. J Biol Chem. 2000;275(30):23120–6.

76. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Shenoy & Lefkowitz, 2005. 2005;(14):1–22.

77. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. β-Arrestins and Cell Signaling. Annu Rev Physiol [Internet]. 2007;69(1):483–510. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749

78. Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, et al. -arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2010;107(2):628–32. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912852107

79. Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, et al. The stability of the G protein-coupled receptor-β-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. J Biol Chem. 2003;278(8):6258–67.

80. Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol Sci [Internet]. 2010;31(5):221–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2010.02.002

81. Lohse MJ, Calebiro D. Receptor signals come in waves. Nature. 2013;495(7442):457–8.

82. Moore CAC, Milano SK, Benovic JL. Regulation of Receptor Trafficking by GRKs and Arrestins. Annu Rev Physiol [Internet]. 2007;69(1):451–82. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712

83. Beaulieu JM, Caron MG. B-Arrestin Goes Nuclear. Cell. 2005;123(5):755–7.

84. Rosanò L, Cianfrocca R, Masi S, Spinella F, Di Castro V, Biroccio A, et al. Beta-arrestin links endothelin A receptor to beta-catenin signaling to induce ovarian cancer cell invasion and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(8):2806–11.

85. Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM, DuBois RN. Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(5):1492–7.

86. Bagnato A, Rosanò L. New Routes in GPCR / β -Arrestin- Driven Signaling in Cancer Progression and Metastasis. 2019;10(February).

87. Zhang Z, Hao J, Zhao Z, Ben P, Fang F, Shi L, et al. β-Arrestins facilitate ubiquitin-dependent degradation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and attenuate H2O2-induced apoptosis. Cell Signal [Internet]. 2009;21(7):1195–206. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.03.010

88. Vines CM, Revankar CM, Maestas DC, LaRusch LL, Cimino DF, Kohout TA, et al. N-Formyl Peptide Receptors Internalize but Do Not Recycle in the Absence of Arrestins. J Biol Chem. 2003;278(43):41581–4.

89. Chen W, Hu LA, Semenov M V., Yanagawa S, Kikuchi A, Lefkowitz RJ, et al. B-Arrestin 1 Modulates Lymphoid Enhancer Factor Transcriptional Activity Through Interaction With Phosphorylated Dishevelled Proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(26):14889–94.

90. Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, et al. A nuclear function of β-arrestin1 in GPCR signaling: Regulation of histone acetylation and gene transcription. Cell. 2005;123(5):833–47.

91. Parathath SR, Mainwaring LA, Fernandez-L A, Guldal CG, Nahlé Z, Kenney AM. B-Arrestin-1 Links Mitogenic Sonic Hedgehog Signaling To the Cell Cycle Exit Machinery in Neural Precursors. Cell Cycle. 2010;9(19):4013–24.

92. Raghuwanshi SK, Nasser MW, Chen X, Strieter RM, Richardson RM. Depletion of β-Arrestin-2 Promotes Tumor Growth and Angiogenesis in a Murine Model of Lung Cancer. J Immunol. 2008;180(8):5699–706.

93. Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K. Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both β-arrestin-1 and -2. J Biol Chem. 2004;279(53):55419–24.

94. Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(12):1999–2004.

95. Li TT, Alemayehu M, Aziziyeh AI, Pape C, Pampillo M, Postovit L-M, et al. -Arrestin/Ral Signaling Regulates Lysophosphatidic Acid-Mediated Migration and Invasion of Human Breast Tumor Cells. Mol Cancer Res [Internet]. 2009;7(7):1064–77. Available from: http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-08-0578

96. Lundgren K, Tobin NP, Lehn S, Stål O, Rydén L, Jirström K, et al. Stromal Expression of ɴʟ -Arrestin-1 Predicts Clinical Outcome and Tamoxifen Response in Breast Cancer. JMDI [Internet]. 2011;13(3):340–51. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.01.009

97. Michal AM, Peck AR, Tran TH, Liu C, Rimm DL, Rui H, et al. Differential expression of arrestins is a predictor of breast cancer progression and survival. Breast Cancer Res Treat. 2011;130(3):791–807.

98. Sibbering M, Courtney CA. Management of breast cancer: Basic principles. Surg (United Kingdom) [Internet]. 2016;34(1):25–31. Available from: https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.01.004

99. Lima-fernandes E, Scott MGH. Arrestins as Regulatory Hubs in Cancer Signalling Pathways Arrestins as Regulatory Hubs in Cancer Signalling Pathways. 2014;(January).

100. Shenoy SK, Han S, Zhao YL, Hara MR, Oliver T, Cao Y, et al. B-arrestin1 mediates metastatic growth of breast cancer cells by facilitating HIF-1-dependent VEGF expression. Oncogene. 2012;31(3):282–92.

101. Gurevich V V., Gurevich E V. Synthetic biology with surgical precision: Targeted reengineering of signaling proteins. Cell Signal [Internet]. 2012;24(10):1899–908. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.05.012

102. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. β-Arrestins and Cell Signaling. Annu Rev Physiol [Internet]. 2007;69(1):483–510. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749

103. Povsic TJ, Kohout TA, Lef RJ. ɴʟ -Arrestin1 Mediates Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Anti-apoptosis *. 2003;278(51):51334–9.

104. Wang P, Kumar P, Wang C, Fea KADE. Differential regulation of class IA phosphoinositide 3-kinase catalytic subunits p110 α and β by protease-activated receptor 2 and β -arrestins. 2007;230:221–30.

105. Beaulieu J, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG, et al. An Akt / NL -Arrestin 2 / PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior. 2005;122:261–73.

106. Bunnett NW, Defea KA, Vaughn ZD, Nishijima D. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a NL -arrestin-dependent scaffolding complex. 2000;

107. Revankar CM, Vines CM, Cimino DF, Prossnitz ER. Arrestins Block G Protein-coupled Receptor-mediated Apoptosis *. 2004;279(23):24578–84.

108. Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ. New Roles for β-Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors. Mol Cell. 2006;24(5):643–52.

109. Manuscript A. recycling and apoptosis. 2010;10(9):1286–300.

110. Kaparianos A, Argyropoulou E, Spiropoulos K. The role of Beta-arrestins in respiratory pathophysiology and tumorigenesis: going a step beyond the cell surface. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2012;16(13):1781–94.

111. Li J, Guo A, Wang Q, Li Y, Zhao J, Lu J, et al. NF-kB directly regulates b-arrestin-1 expression and forms a negative feedback circuit in TNF-a-induced cell death. FASEB J. 2018;32(8):4096–106.

112. Lefkowitz RJ, Rajagopal K, Whalen EJ. New Roles for β-Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors. Mol Cell [Internet]. 2006;24(5):643–52. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.007

113. Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, Patel DD. Defective

lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2002;99(11):7478–83. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12032308

114. Décaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits β-arrestin to enhance cell migration. J Biol Chem. 2011;286(37):32188–97.

115. Zou L, Yang R, Chai J, Pei G. Rapid xenograft tumor progression in beta-arrestin1 transgenic mice due to enhanced tumor angiogenesis. FASEB J. 2008;22(2):355–64.

116. Zheng K, He Z, Kitazato K, Wang Y. Selective autophagy regulates cell cycle in cancer therapy. Theranostics. 2019;9(1):104–25.

117. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. Nat Rev Cancer [Internet]. 2017;17(2):93–115. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.138

118. Girnita L, Shenoy SK, Sehat B, Vasilcanu R, Vasilcanu D, Girnita A, et al. β-arrestin and Mdm2 mediate IGF-1 receptor-stimulated ERK activation and cell cycle progression. J Biol Chem. 2007;282(15):11329–38.

119. No Title [Internet]. p. https://www.origene.com/products/vectors/untagged-. Available from: https://www.origene.com/products/vectors/untagged-cloning-vectors

120. Simon R, Lam A, Li MC, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-array tools. Cancer Inform. 2007;3(301):11–7.

121. Hoon M De, Imoto S, Miyano S. The C Clustering Library. Library (Lond). 2003;C(C):1453–4.

122. Goldman M, Craft B, Hastie M, Repečka K, Kamath A, McDade F, et al. The UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and

interpretation. bioRxiv. 2018;326470.

123. Bastien RR, Rodríguez-Lescure Á, Ebbert MT, Prat A, Munárriz B, Rowe L, et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. BMC Med Genomics. 2012;5.

124. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. Nucleic Acids Res. 2013;41(Web Server issue):77–83.

125. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell. 1993;75(2):263–74.

126. Benovic JL, Strassert RH, Caront MG, Lefkowitz RJ. j3-Adrenergic receptor kinase : Identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. 1986;83(May):2797–801.

127. Ma L, Pei G. Beta-Arrestin Signaling and Regulation of Transcription. J Cell Sci [Internet]. 2007;120(2):213–8. Available from: http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.03338

128. Song Q, Ji Q, Li Q. The role and mechanism of β-arrestins in cancer invasion and metastasis (Review). Int J Mol Med. 2018;41(2):631–9.

129. Cao Y, Zhou Y, He X, Zhou C, Cui L, Zhuang Q, et al. Overexpression of β -arrestin2 induces G1-phase cell cycle arrest and suppresses tumorigenicity in renal cell carcinoma. 2017;1729–37.

130. Hu S, Wang D, Wu J, Jin J, Wei W, Sun W. Involvement of β-arrestins in cancer progression. Mol Biol Rep. 2013;40(2):1065–71.

131. Sun WY, Hu SS, Wu JJ, Huang Q, Ma Y, Wang QT, et al. Down-regulation of β-arrestin2 promotes tumour invasion and indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma. Sci Rep. 2016;6(October):1–14.

132. Clay-Farrace L, Pelizon C, Santamaria D, Pines J, Laskey RA. Human replication protein Cdc6 prevents mitosis through a checkpoint mechanism that implicates Chk1. EMBO J. 2003;22(3):704–12.

133. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends Biochem Sci. 2005;30(11):630–41.

134. Beck H, Nahse-Kumpf V, Larsen MSY, O'Hanlon KA, Patzke S, Holmberg C, et al. Cyclin-Dependent Kinase Suppression by WEE1 Kinase Protects the Genome through Control of Replication Initiation and Nucleotide Consumption. Mol Cell Biol. 2012;32(20):4226–36.

135. Anda S, Rothe C, Boye E, Grallert B. Consequences of abnormal CDK activity in S phase. Cell Cycle. 2016;15(7):963–73.

136. Lapointe J, Lachance Y, Labrie Y, Labrie C. A p18 mutant defective in CDK6 binding in human breast cancer cells. Cancer Res. 1996;56(20):4586–9.

137. Köhler C, Koalick D, Fabricius A, Parplys AC, Borgmann K, Pospiech H, et al. Cdc45 is limiting for replication initiation in humans. Cell Cycle. 2016;15(7):974–85.

138. Pollok S, Bauerschmidt C, Sänger J, Nasheuer HP, Grosse F. Human Cdc45 is a proliferation-associated antigen. FEBS J. 2007;274(14):3669–84.

139. Han JY, Han YK, Park GY, Kim SD, Kim JS, Jo WS, et al. Bub1 is required for maintaining cancer stem cells in breast cancer cell lines. Sci Rep. 2015;5.

140. Yuan J, Krämer A, Matthess Y, Yan R, Spänkuch B, Gätje R, et al. Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo. Oncogene. 2006;25(12):1753–62.

141. Tan Y, Wang Q, Xie Y, Qiao X, Zhang S, Wang Y, et al. Identification of FOXM1 as a specific marker for triple-negative breast cancer. Int J Oncol. 2019;54(1):87–97.

142. Colak D, Nofal A, AlBakheet AB, Nirmal M, Jeprel H, Eldali A, et al. Age-Specific Gene Expression Signatures for Breast Tumors and Cross-Species Conserved Potential Cancer Progression Markers in Young Women. PLoS One. 2013;8(5).

143. Ding K, Li W, Zou Z, Zou X, Wang C. CCNB1 is a prognostic biomarker for ER+ breast cancer. Med Hypotheses [Internet]. 2014;83(3):359–64. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2014.06.013

144. Li TT, Alemayehu M, Aziziyeh AI, Pape C, Pampillo M, Postovit L, et al. β -Arrestin / Ral Signaling Regulates Lysophosphatidic Acid – Mediated Migration and Invasion of Human Breast Tumor Cells. 2009;7(July):1064–78.

145. Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G. β-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. J Biol Chem. 2002;277(51):49212–9.

146. Girnita L, Shenoy SK, Sehat B, Vasilcanu R, Girnita A, Lefkowitz RJ, et al. ??-arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth Factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. J Biol Chem. 2005;280(26):24412–9.

147. Suleymanova N, Crudden C, Shibano T, Worrall C, Oprea I, Tica A, et al. Functional antagonism of β-arrestin isoforms balance IGF-1R expression and signalling with distinct cancer-related biological outcomes. Oncogene [Internet]. 2017;36(41):5734–44. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/onc.2017.179

148. Balz LM, Bartkowiak K, Andreas A, Pantel K, Niggemann B, Zänker KS, et al. The interplay of HER2/HER3/PI3K and EGFR/HER2/PLC-γ1 signalling in breast cancer cell migration and dissemination. J Pathol. 2012;227(2):234–44.

149. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2(2):127–37.

150. Santos-Zas I, Gurriarán-Rodríguez U, Cid-Díaz T, Figueroa G, González-Sánchez J, Bouzo-Lorenzo M, et al. β-Arrestin scaffolds and signaling elements essential for the obestatin/GPR39 system that determine the myogenic program in human myoblast cells. Cell Mol Life Sci. 2016;73(3):617–35.

151. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. Sci Signal. 2014;7(344):re8.

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Saber

Soyadı: Yari bostanabad

Doğum Yeri: İran- Bostanabad

Yabancı Dili: İngilizce, İtalyanca (başlangıç seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lisans: Muahakegh Ardebili Üniversitesi (1999-2004)

Yüksek Lisans: Zanjan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genetik (2005-2008)

Tabriz Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Merkezi (BRC) (2006-2008)

Yayınlar ve Bildiriler

İş Tecrübesi

Kurumu: TUBİTAK SBAG-17S203 "G Protein Kenetli Reseptörler (GPCR) Aracılı Büyüme Hormonu Reseptörlerinin Transaktivasyonunun Kanser Hücrelerinde Araştırılması"

Görevi: Proje Bursiyeri **Yılları:** 2013-2016

Kurumu: TUBİTAK SBAG-17S203 ''Üçlü Negatif Meme Kanser Hücrelerinin Regülasyonunda, DualSpesifik-Fosfataz1, Protein Fosfataz1 ve Beta-Adrenerjik Reseptörlerin Rolü''

Görevi: Proje Bursiyeri **Yılları:** 2017-2020

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

“The role of dual-specificity phosphatase 1 and protein phosphatase 1 in β2-adrenergic receptor-mediated inhibition of extracellular signal regulated kinase 1/2 in triple negative breast cancer cell lines”MatildaMerveTuglu , Saber YariBostanabad, GozdeOzyon, BasakDalkilic, HakanGurdal. 24, 2017 DOI: 10.3892/mmr.2017.8092

Partial agonistic effect of cetuximab on epidermal growth factor receptor and Src kinase activation in triple-negative breast cancer cell lines

HAKAN GURDAL[1], MATILDA MERVE TUGLU[1], SABER YARI BOSTANABAD[2] and BAŞAK DALKILIÇ[1]

[1]Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Ankara, 06100 Ankara; [2]Biotechnology Institute of Ankara University, 06110 Ankara, Turkey

Received August 23, 2018; Accepted January 15, 2019

DOI: 10.3892/ijo.2019.4697

Abstract. Cetuximab is a monoclonal antibody developed to inhibit the binding of growth factors and the subsequent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR). Triple-negative breast cancer (TNBC) is resistant to cetuximab treatment. The aim of the present study was to examine the partial agonistic properties of cetuximab, which not only blocks ligand binding, but also partially triggers EGFR activation, which may lead to cetuximab resistance in TNBC. The phosphorylation of growth factor receptors and their signalling pathways were evaluated by determining the phosphorylation of EGFR, insulin-like growth factor receptor (IGF-1R), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2, Src kinase, phosphoinositide-3-kinase (PI3K), extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) and serine/threonine-specific protein kinase (Akt) and the degradation of EGFR, and by assessing the morphology and proliferation of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. Cetuximab treatment led to the phosphorylation of EGFR, VEGFR-2, IGF-1R and downstream signalling molecules, Src kinase and PI3K in these cells, as well as Akt in the MDA-MB-231 cells. The cetuximab-mediated phosphorylation of IGF-1R, VEGFR-2 and Akt was inhibited by the EGFR kinase inhibitor, AG1478, and the Src kinase inhibitor, PP2. Cetuximab treatment led to the degradation of EGFR. The cetuximab-induced phosphorylation and EGFR degradation were less prominent compared with those induced by EGF. Cetuximab partially inhibited EGF-mediated responses. Cetuximab, similar with EGF, altered cellular morphology in a serum-free medium. In both cell lines, the Src kinase inhibitor enhanced the cetuximab-induced anti-proliferative response. These results indicate that cetuximab exerts a partial agonistic effect on EGFR, which activates Src kinase and subsequently transactivates IGF-1R and VEGFR-2. This partial agonistic property is likely one of the mechanisms underlying the resistance of TNBC to cetuximab.

Correspondence to: Professor Hakan Gurdal, Department of Medical Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Ankara, 6 Adnan Saygun Street, Sihhiye, 06100 Ankara, Turkey
E-mail: gurdal@medicine.ankara.edu.tr

Abbreviations: Akt, serine/threonine-specific protein kinase; EGFR, epidermal growth factor receptor; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; IGF-1R, insulin-like growth factor receptor; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; TNBC, triple-negative breast cancer; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor

Key words: epidermal growth factor receptor, breast cancer, cetuximab, partial agonist, Src kinase, insulin-like growth factor receptor, vascular endothelial growth factor receptor, transactivation, monoclonal antibody, MDA-MB231, MDA-MB-468, PP2, triple-negative breast cancer

Introduction

Epidermal growth factor (EGF) receptor (EGFR) is a receptor tyrosine kinase (RTK) and a member of the ErbB family. EGFR agonists, such as EGF, transforming growth factor-α and epiregulin, bind to the extracellular domain of EGFR and cause the homodimerization or heterodimerization of Erb family receptors, which leads to the phosphorylation of intracellular EGFR sites, such as the Tyr1173 and Tyr1068 residues. The phosphorylation of these sites activates signalling pathways, such as the RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/serine/threonine-specific protein kinase (Akt) and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (Jak/Stat) pathways (1-5). The activation of these pathways mediates cellular proliferation and transformation, which may cause cancer occurrence, growth, invasion and metastasis.

Triple-negative breast cancer (TNBC) does not express human epidermal growth factor receptor type (HER)2, progesterone receptor (PR) or oestrogen receptor (ER), but does express EGFR (6,7). There is evidence that EGFR overexpression is associated with an aggressive phenotype and a poor clinical outcome in breast cancers, including TNBC (8-12).

Therefore, blocking the EGFR-mediated signalling pathway is a therapeutic target for treating EGFR-expressing cancer types, such as TNBC. Cetuximab (CTX) was developed to bind to the extracellular domain of EGFR, which blocks the binding of EGF and inhibits the subsequent phosphorylation and activation of EGFR and downstream signalling pathways, such as RAS/MAPK, PI3K/Akt and Jak/Stat (13-15). CTX has been used in the treatment of metastatic colorectal cancer and head and neck squamous cell carcinoma, both as monotherapy and in combination with chemotherapy and radiotherapy (14,16).

However, certain types of cancer, such as TNBC and lung and colon cancer are resistant to CTX treatment (4,16,17). Primary and acquired resistance to anti-EGFR treatment has been described (4), with several studies reporting that genetic alterations in key regulators, such as KRAS, BRAF, phosphatase and tensin homologue (PTEN) and phosphoinositide-3-kinase, catalytic subunit α (PIK3CA), in the signalling pathways of RTKs are an important mechanism underlying resistance to anti-EGFR treatment (4,6,17-20). These alterations lead to the activation of RAS/MAPK and PI3K/Akt, independently of the activation status of growth factor receptors. As a result, the blocking of EGFR by antibodies or tyrosine kinase inhibitors becomes ineffective in shutting down these signalling pathways. TNBC cells, such as MDA-MB-231, harbour mutations in KRAS and BRAF, whereas MDA-MB-468 cells do not have the Akt signalling pathway-inhibiting gene, PTEN, as a tumour suppressor (21). Hence, these cell lines often exhibit resistance to anti-EGFR treatment. However, the mutations in KRAS, BRAF, PTEN and PIK3CA cannot fully explain this resistance, since it is also observed in wild-type breast and colon cancer cells, which do not harbour these mutations (20,22).

The ligands of RTKs possess partial agonist properties, which cause homo- or heterodimer formation and, subsequently, receptor phosphorylation and activation (23). Some antibodies directed against RTKs to block the binding of growth factors may also act as partial agonists (24-26). One study evaluating the targeting strategies of RTKs emphasised that the binding of an antibody with partial agonist properties to the receptor may cause phosphorylation, which triggers the ubiquitination and degradation of the receptor, resulting in irreversible antagonism of the RTK (26), the inhibition of the malignant response and cell proliferation, which may lead to a significant anticancer response in cancer cells.

On the other hand, the partial agonistic action of an antibody on the RTK may induce the phosphorylation of receptor tyrosine residues, activating PI3K/Akt, RAS/MAPK and PLCγ/PKC, similar to EGF or a full agonist. Therefore, a partial agonist antibody may lead to RTK activation, which may cause resistance to this antibody in cancer cells. For example, trastuzumab binds to ErbB2, induces phosphorylation and exerts an agonistic effect on this receptor (27-29). Yoshida *et al* (30) demonstrated that matuzumab and CTX activated EGFR by inducing the phosphorylation of the Tyr845, Tyr1068 and Tyr1173 residues in the non-small-cell lung cancer cell lines, H292 and H460. Similarly, Raben *et al* (31) observed that CTX induced the phosphorylation of the Tyr845, Tyr992 and Tyr1068 residues of EGFR in H322 and H292 cells. Furthermore, CTX treatment has been shown to enhance the phosphorylation of EGFR Tyr845 residues in MDA-MB-231 cells (32) and Tyr1068 in MDA-MB-468 cells (33).

The aim of the present study was to examine the partial agonistic effect of CTX on EGFR in the TNBC cell lines, MDA-MB-231 and MDA-MB-468. For this purpose, by treating TNBC cells with EGF or CTX, we measured the phosphorylation levels of EGFR (Tyr1173), PI3K, Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 and Src kinase, the cellular level of EGFR and cellular morphology, using impedance measurement as an indication of RTK activity. Since the agonistic action on EGFR may lead to the transactivation or cross-activation of insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 (34,35), the phosphorylation status of these receptors with CTX or EGF treatment of TNBC cells was also determined. Finally, the anti-proliferative response of the cells to CTX was evaluated in the presence or absence of the Src kinase inhibitor, PP2, which inhibits the partial agonist action of CTX on EGFR.

Materials and methods

Reagents and antibodies. The EGFR kinase inhibitor, AG1478, the PI3K inhibitor, LY294002 [2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride], the Src kinase inhibitor, PP2 [4-amino-3-(4-chlorophenyl)-1-(t-butyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine], EGF and CTX were obtained from Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The antibodies used were as follows (dilution, catalogue number, host and clonality used for western blot analysis): p-VEGFR-2-Tyr1175 (1:1,000, 3770, rabbit monoclonal), p-Src-Tyr416 (1:1,000, 2101, rabbit polyclonal) from Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA; p-EGFR-Tyr1173 (1:1,000, sc-12351-R, rabbit polyclonal), EGFR (1:1,000, sc-53274, mouse monoclonal), p-IGF-1R-Tyr1161 (1:1,000, sc-101703, rabbit polyclonal), p-Erk1/2 (1:5,000, sc-136521, mouse monoclonal), ERK1/2 (1:1,000, sc-514302, mouse monoclonal), p-Akt-Ser473 (1:1,000, sc-7985, rabbit polyclonal), Akt (1:1,000, sc-8312, rabbit polyclonal), p-PI3K (1:1,000, sc-12929, goat polyclonal), GAPDH (1:5,000, sc-47724, mouse monoclonal), mouse anti-rabbit (1:10,000, sc-2357), rabbit anti-goat IgG-HRP (1:10,000, sc-2768) and donkey anti-mouse IgG-HRP (1:10,000, sc-2314) all from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). In all control experiments, the cells were incubated with the corresponding dilution of solvent used for the ligand.

Cell culture, treatments, protein isolation and western blot analysis. The MDA MB 231 and MDA MB 468 TNBC cell lines, which are negative for ER, PR and HER2, but positive for EGFR, were employed in this study. The cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were grown in 75-cm^2 non-treated cell culture flasks (Corning, Tewksbury, MA, USA) in Dulbecco's modified Eagle's medium and Eagle's minimal essential medium, respectively, enriched with 10% foetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin at 5% CO_2, 37˚C, with 90-95% humidity. For each experiment, the cells ($2.5x10^5$

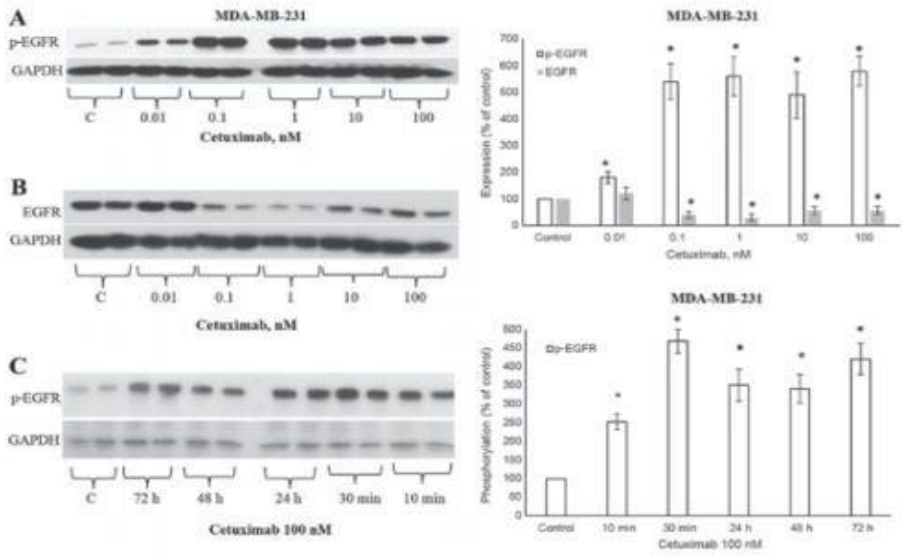


Figure 1. Cetuximab leads to EGFR phosphorylation in MDA-MB-231 cells. Treatment of the cells with cetuximab (2 h) at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 nM (A) increased EGFR phosphorylation and (B) decreased EGFR levels. (C) CTX-stimulated phosphorylation was observable after 10 min of incubation at the 100 nM concentration and persisted for 72 h in the MDA-MB-231 cells. Representative western blot bands for p-EGFR and EGFR are presented along with two replicate bands for the control (indicated by 'C'), and for the treatment groups as various concentrations of CTX (A and B) and for the treatment groups in different treatment periods with CTX (C). Since CTX decreases EGFR levels, GAPDH bands are presented as a control of the loading amount of protein. Band intensities were normalized to GAPDH and presented as a percentage of phosphate buffered saline-treated control cells. Data are presented as the means ± standard error of the mean, n=4-5 experiments. *P<0.05 vs. the control cells. CTX, cetuximab; EGFR, epidermal growth factor receptor.

cells/well) were plated in 6-well plates and treated with CTX (0.01, 0.1, 1, 10 or 100 nM) or EGF (1 nM) on the third day following overnight serum starvation. The concentration of ligands and the duration of cell treatment are specified in the results section. In some experiments, prior to CTX or EGF stimulation, the cells were pre-treated with one of the following inhibitors: AG1478 (10 μM), LY294002 (10 μM) or PP2 (10 μM) for 30 min. Following stimulation, the cells were immediately placed on ice and washed with ice-cold phosphate-buffered saline and homogenised in 100 μl lysis buffer (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany) containing 1% Nonidet P40, 0.02 M sodium orthovanadate and protease inhibitors. Following homogenization, the cells were incubated for 15 min and centrifuged at 5,000 x g for 5 min at 4˚C. After collecting the supernatant, the protein concentration was determined using the Bradford protein assay and the samples were stored at -80˚C. Electrophoresis and western blot analysis were performed as previously described (36). Band intensities were corrected against t-ERK1/2, t-AKT or GAPDH expression. As a control of the loading amount of protein, GAPDH bands were used and the band intensities of p-EGFR, p-IGF-1R or p-VEGFR-2 were corrected against the GAPDH bands. The band intensities of EGFR, IGF-1R and VEGFR-2 were not used for the corrections, due to internalization and/or degradation of these receptors following ligand stimulation.

Real-time cellular morphology and cell proliferation assay by impedance measurements. These assays were performed as previously described (37-39), using the xCelligence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP system (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA). Briefly, the MDA-MB-231 or MDA-MB-468 cells (6,500 cells/well; E-plate) were seeded into each well. Subsequently, the impedance of each well of the E-plate was measured continuously for 20-24 h at 37˚C with 5% CO_2. For the cell proliferation assay, after the first 20-24 h, CTX or EGF was added to the wells and the impedance measurement was recorded for 72-96 h. For cellular morphology measurement, after the first 20-24 h, the medium in each well was replaced with serum-free medium and incubated for 4 h at 37˚C with 5% CO_2. CTX or EGF was then added to the wells and impedance was recorded for 24 h. The results were analysed using RTCA data analysis software 1.0 (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA).

Cell viability was also assessed by the WST-1 proliferation assay according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

Statistical analysis. Data are reported as the means ± standard error of the mean, while 'n' represents the number of independent experiments for each indicated condition. The results were obtained from 4-5 independent experiments. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 software for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Comparisons between multiple groups were performed with one-way analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test. P<0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

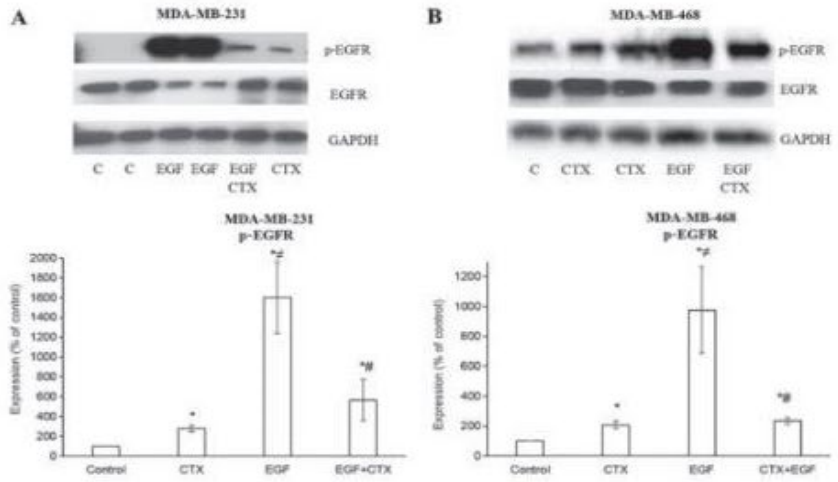


Figure 2. Cetuximab partially antagonizes the EGF-stimulated phosphorylation of EGFR. Cetuximab (100 nM, 30 min) produced significantly less EGFR phosphorylation than EGF (1 nM, 30 min). Pre-treatment of the cells with CTX (100 nM, 30 min) significantly, but not completely inhibited the EGF-induced phosphorylation (1 nM, 30 min) of EGFR in (A) MDA-MB-231 and (B) MDA-MB-468. Representative western blot bands for p-EGFR and EGFR are presented along with two replicate bands for the control (indicated by 'C'), for the EGF treatment groups in (A), and for CTX in (B). Band intensities were normalized to GAPDH and presented as a percentage of phosphate buffered saline-treated control cells. Data are presented as the means ± standard error of the mean, n=4-5 experiments. *P<0.05 vs. the control cells; #P<0.05 vs. CTX; ≠P<0.05 vs. EGF. CTX, cetuximab; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor.

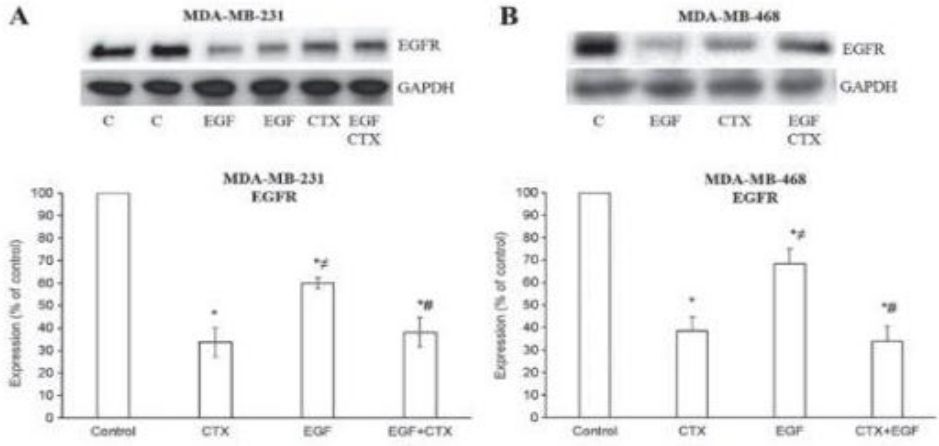


Figure 3. Cetuximab causes the degradation of EGFR. EGF (1 nM, 2 h) and CTX (100 nM, 2 h) both reduced the EGFR level, but CTX has a significantly less prominent effect on the EGFR level than EGF. Pre-treatment of the cells with CTX (100 nM, 30 min) significantly, but not completely inhibited the EGF-induced degradation (1 nM, 2 h) of EGFR in the (A) MDA-MB-231 and (B) MDA-MB-468 cells. Representative western blot bands for EGFR are presented. Two replicate bands are presented for the control (indicated as 'C') and for the EGF treatment groups in (A). Band intensities are normalized to GAPDH and presented as a percentage of phosphate-buffered saline-treated control cells. Data are presented as the mean ± standard error of the mean, n=4-5 experiments. *P<0.05 vs. the control cells; #P<0.05 vs. CTX; ≠P<0.05 vs. EGF. CTX, cetuximab; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor.

Results

CTX induces the phosphorylation of EGFR. The ligands that activate EGFR lead to the phosphorylation of the 1173 tyrosine residue of the EGFR receptor (5). CTX at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 nM significantly increased the phosphorylation of the 1173 tyrosine residue of the EGFR receptor (Fig. 1A), similar to EGF (Fig. 2A). The CTX-stimulated phosphorylation was observable after 10 min of incubation at 100 nM and persisted for 72 h in the MDA-MB-231 cells (Fig. 1C). CTX also induced EGFR phosphorylation in the MDA-MB-468 TNBC cells (Fig. 2B).

CTX induces less prominent EGFR phosphorylation compared with EGF. CTX at a concentration of 100 nM [used as the maximum concentration, which is >200-fold its Kd

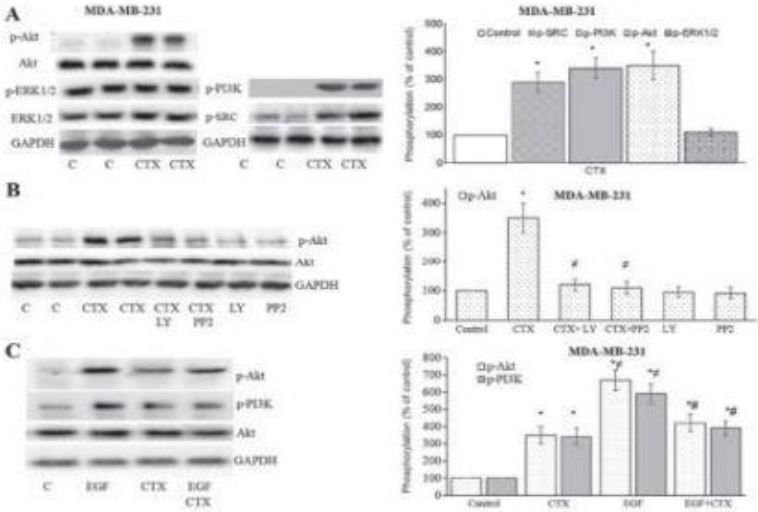


Figure 4. Cetuximab triggers the downstream signalling of EGFR in MDA-MB-231 cells. (A and B) Cetuximab (100 nM, 30 min) induced the phosphorylation of Src kinase, PI3K and Akt, but not that of ERK1/2 in the MDA-MB-231 cells. (B) Pre-treatment of cells with the PI3K inhibitor, LY294002 (10 μM, 30 min), or the Src kinase inhibitor, PP2 (10 μM, 30 min), significantly inhibited CTX-induced Akt phosphorylation. (C) CTX produced significantly less Akt or PI3K phosphorylation than EGF did, while pre-treatment of the cells with CTX (100 nM, 30 min) significantly, but not completely inhibited the EGF-induced phosphorylation (1 nM, 30 min) of PI3K and Akt in the MDA-MB-231 cells. Representative western blot bands for p-SRC, p-PI3K, p-Akt, p-ERK1/2, Akt and GADPH are presented. Two replicate bands are presented for the control or for the CTX treatment groups in (A and B). The p-Akt and p-ERK1/2 band intensities are normalized to Akt and ERK1/2, respectively, and the p-SRC and p-PI3K band intensities are normalized to GADPH and presented as a percentage of phosphate-buffered saline-treated control cells. Data are presented as the means ± standard error of the mean, n=4-5 experiments. *P<0.05 vs. control cells; #P<0.05 vs. CTX; $P<0.05 vs. EGF. CTX, cetuximab; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor.

(dissociation constant) of 0.39 nM and sufficient to saturate EGFR] produced significantly less EGFR phosphorylation compared with 1 nM EGF, a full agonist, in both the MDA-MB-231 (Fig. 2A) and MDA-MB-468 (Fig. 2B) cells.

CTX partially inhibits EGF-mediated EGFR phosphorylation. It is well known that a partial agonist causes the incomplete inhibition of the response induced by a full agonist. Accordingly, CTX (100 nM) incompletely inhibited EGF-induced EGFR phosphorylation at the 1 nM EGF concentration in both the MDA-MB-231 (Fig. 2A) and MDA-MB-468 (Fig. 2B) cells.

CTX causes the degradation of EGFR and partially inhibits the EGF-mediated degradation of EGFR. When measuring the EGFR levels following treatment of the cells with CTX (100 nM) or EGF (1 nM), a decreased level of EGFR was observed in the MDA-MB-231 (Figs. 1B and 3A) and MDA-MB-468 (Fig. 3B) cells. These results indicate that CTX functions like a partial agonist in the degradation of EGFR and, as expected, CTX reduces the EGFR levels to a lesser extent compared with EGF (Fig. 3). Furthermore, CTX only partially inhibited the EGF-mediated decrease in EGFR levels (Fig. 3).

CTX triggers the EGFR downstream pathway. After observing Tyr1173 phosphorylation of EGFR with CTX, the downstream signalling of EGFR was investigated. In the MDA-MB-231 cells, CTX treatment significantly enhanced the phosphorylation of Src kinase, PI3K and Akt, but not ERK1/2 (Fig. 4A and B). The phosphorylation of Akt was antagonized by the Src kinase inhibitor, PP2, and the PI3K inhibitor, LY294002 (Fig. 4B). It was therefore deduced that the stimulation of EGFR by CTX activates Src kinase and PI3K, and causes the phosphorylation of Akt. The CTX-mediated phosphorylation of PI3K and Akt was less prominent compared with that induced by EGF, and it also partially inhibited the EGF-stimulated phosphorylation of PI3K and Akt in the MDA-MB-231 cells (Fig. 4C).

In the MDA-MB-468 cells, CTX also increased the phosphorylation of Src kinase and PI3K, but not that of Akt and ERK1/2 (Fig. 5A). The CTX-mediated phosphorylation of PI3K was less prominent compared with that induced by EGF, and it also partially inhibited the EGF-stimulated phosphorylation of PI3K in the MDA-MB-468 cells (Fig. 5B). These results indicate that the partial agonistic activity of CTX is observable in the EGFR downstream signalling pathway.

The possible reasons as to why CTX did not increase the basal phosphorylation of ERK1/2 in the MDA-MB231 cells or the phosphorylation of ERK1/2 and Akt in the MDA-MB-468 cells are addressed below in the Discussion.

CTX induces IGF-1R and VEGFR-2 phosphorylation. In the present study, the effects of CTX or EGF on the phosphorylation status of IGF-1R and VEGFR-2 were also evaluated. CTX and EGF induced the phosphorylation of both IGF-1R and VEGFR-2 in the MDA-MB231 (Fig. 6) and MDA-MB-468 (Fig. 7) cells. This induced phosphorylation was inhibited by the EGFR tyrosine kinase inhibitor, AG1478, and the Src kinase inhibitor, PP2, in both the MDA-MB-231 (Fig. 6A and B) and MDA-MB-468 (Fig. 7A and B) cells. These results suggest that

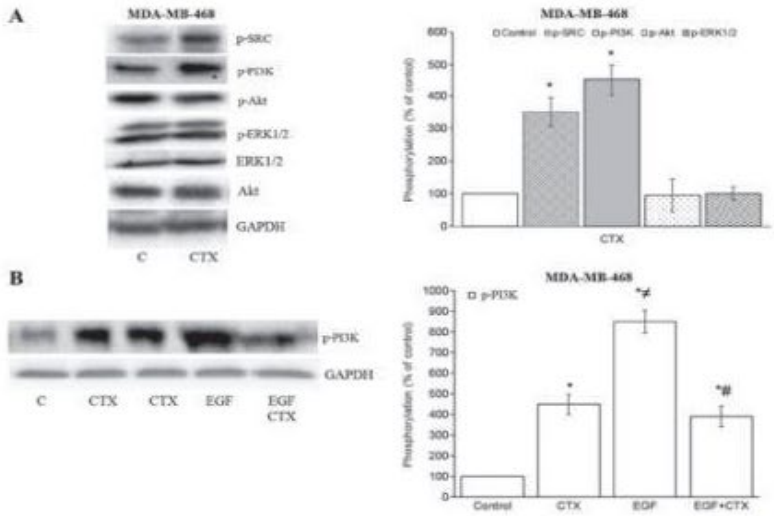


Figure 5. Cetuximab triggers the downstream signalling of EGFR in MDA-MB-468 cells. (A and B) Cetuximab (100 nM, 30 min) induced the phosphorylation of Src kinase and PI3K, but not that of Akt or ERK1/2 in MDA-MB-468 cells. (B) CTX produced significantly less PI3K-phosphorylation than EGF did, while pre-treatment of the cells with CTX (100 nM, 30 min) significantly, but not completely inhibited the EGF-induced phosphorylation (1 nM, 30 min) of PI3K in MDA-MB-468 cells. Representative western blot bands for pSrc, pPI3K, pAkt, pERK1/2, Akt and GADPH are presented. Two replicate bands are presented for CTX in (B). The p-Akt and p-ERK1/2 band intensities are normalized to Akt and ERK1/2, respectively, and the p-Src, p-PI3K band intensities are normalized to GADPH and presented as a percentage of phosphate-buffered saline-treated control cells. Data are presented as the means ± standard error of the mean, n=4-5 experiments. *P<0.05 vs. the control cells; #P<0.05 vs. CTX; ≠P<0.05 vs. EGF. CTX, cetuximab; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor.

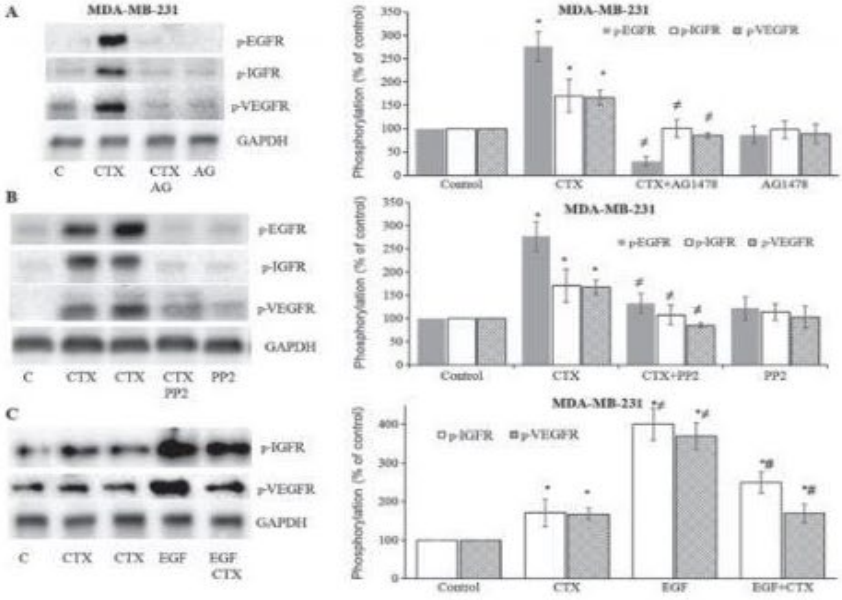


Figure 6. Cetuximab leads to the phosphorylation of IGF-1R and VEGFR-2 in MDA-MB-231 cells. (A and B) Cetuximab (100 nM, 30 min) induced the phosphorylation of EGFR, IGF-1R and VEGFR-2, while pre-treatment of the cells with the EGFR tyrosine kinase inhibitor, AG1478 (10 μM, 30 min), or the Src kinase inhibitor, PP2 (10 μM, 30 min), significantly inhibited EGFR, IGF-1R and VEGFR-2 phosphorylation in MDA-MB-231 cells. (C) CTX produced significantly less IGF-1R and VEGFR-2-phosphorylation than EGF did, while pre-treatment of the cells with CTX (100 nM, 30 min) significantly, but not completely inhibited EGF-induced phosphorylation (1 nM, 30 min) of IGF-1R and VEGFR-2 in MDA-MB-231cells. Representative western blot bands for p-EGFR, p-IGF-1R, p-VEGFR-2 and GADPH are presented. Two replicate bands are presented for CTX in (B and C). The band intensities are normalized to GADPH and presented as a percentage of phosphate-buffered saline-treated control cells. Data are presented as the means ± standard error of the mean, n=4-5 experiments. *P<0.05 vs. control cells; #P<0.05 vs. CTX; ≠P<0.05 vs. EGF. CTX, cetuximab; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor.

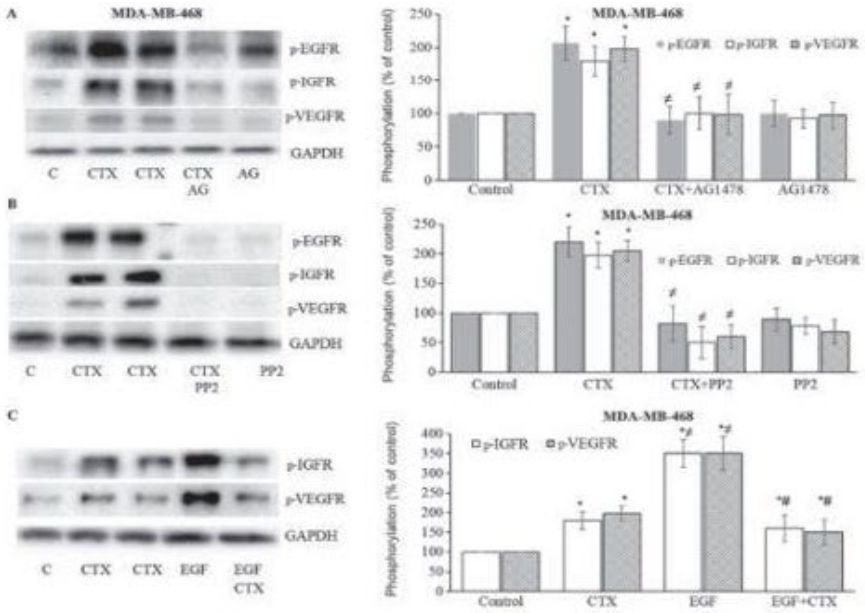


Figure 7. Cetuximab leads to the phosphorylation of IGF-1R and VEGFR-2 in MDA-MB-468 cells. (A and B) Cetuximab (100 nM, 30 min) induced the phosphorylation of EGFR, IGF-1R, VEGFR-2, while pre-treatment of the cells with the EGFR tyrosine kinase inhibitor, AG1478 (AG) (10 μM, 30 min), or the Src inhibitor, PP2 (10 μM, 30 min), significantly inhibited EGFR, IGF-1R and VEGFR-2 phosphorylation in MDA-MB-468 cells. (C) CTX produced significantly less IGF-1R and VEGFR-2 phosphorylation than EGF did, while pre-treatment of the cells with CTX (100 nM, 30 min) significantly but not completely inhibited the EGF-induced phosphorylation (1 nM, 30 min) of IGF-1R and VEGFR-2 in MDA-MB-468 cells. Representative western blot bands for p-EGFR, p-IGF-1R, p-VEGFR-2 and GADPH are presented. Two replicate bands are presented for CTX. The band intensities are normalized to GADPH and presented as a percentage of phosphate-buffered saline-treated control cells. Data are presented as the means ± standard error of the mean, n=4-5 experiments. *P<0.05 vs. control cells; #P<0.05 vs. CTX; ‡P<0.05 vs. EGF. CTX, cetuximab; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor.

the CTX-mediated activation of EGFR and Src kinase trigger the phosphorylation of IGF-1R and VEGFR-2.

CTX partially inhibits EGF-mediated IGF-1R and VEGFR-2 phosphorylation. As with EGFR phosphorylation, CTX treatment at 100 nM produced significantly less IGF-1R and VEGFR-2 phosphorylation compared with the full agonist, EGF at 1 nM (Figs. 6C and 7C). CTX also functioned as a partial agonist, partially inhibiting the IGF-1R and VEGFR-2 phosphorylation induced by EGF (1 nM) in the MDA-MB-231 (Fig. 6C) and MDA-MB-468 cells (Fig. 7C).

CTX alters cellular morphology in a manner similar to EGF. Immediate morphological changes induced by growth factors can be detected using real-time cell-based impedance measurement (38-40). In this study, cell-based impedance technology was also used to evaluate the rapid morphological changes induced by RTK activity triggered by EGF or CTX in the MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. Both CTX (100 nM) and EGF (1 nM) induced significant morphological changes during 4-10 h of cell stimulation (Fig. 8). These results indicate that CTX induces RTK activity similar to EGF in terms of cellular morphology in both the MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells.

Src kinase inhibitor enhances the CTX-mediated anti-proliferative effect. The effect of CTX on cellular proliferation was examined in the presence of the Src kinase inhibitor, PP2, which antagonizes the CTX-induced phosphorylation of Src kinase, PI3K, Akt, IGF-1R and VEGFR-2. CTX alone did not affect the proliferation of the MDA-MB-231 cells, but induced a 15% inhibition of the proliferation of the MDA-MB-468 cells (Fig. 9). The Src kinase inhibitor, PP2, at 10 μM induced a 20 and 27% inhibition of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell proliferation, respectively. In combination with CTX, however, this response increased to 38% in the MDA-MB-231 cells and to 45% in the MDA-MB-468 cells (Fig. 9). The results obtained by assessing cell viability by WST-1 assay (data not shown) and the RTCA system were similar.

Model of CTX-mediated partial agonistic action. Based on the observations that the CTX-mediated phosphorylation of EGFR, IGF-1R and VEGFR-2, PI3K and Akt were inhibited by the EGFR tyrosine kinase inhibitor, AG1478, and the Src kinase inhibitor, PP2, it was suggested that the partial agonistic action of CTX leads to the phosphorylation of EGFR and Src kinase, which mediates the phosphorylation of IGF-1R, VEGFR-2, PI3K and Akt (Fig. 10).

Discussion

The blocking and/or silencing of the EGFR signalling pathway is one of the fundamental treatment strategies for TNBC, since EGFR overexpression is associated with an aggressive phenotype and a poor clinical outcome (8-12). Several antibodies have been developed to shut down EGFR signalling

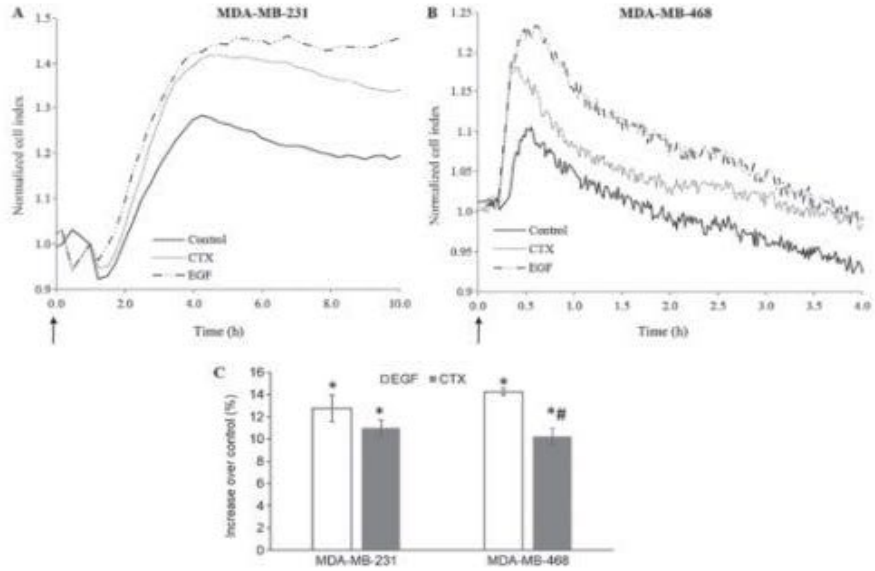


Figure 8. Cetuximab and EGF alter cell morphology. (A-C) Impedance measurement of cell morphology with the real-time cell electronic sensing system with cetuximab (100 nM) or EGF (1 nM) treatment in serum-free medium in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. CTX and EGF produced significant increase in the cell index. The cell index recorded just before CTX or EGF treatment was defined as the baseline and fold change of the baseline was determined for further measurements and shown as cell index fold change in (A and B). The peak level of cell index fold change was defined as the maximum value reached after treatment. The percentage of phosphate-buffered saline-treated control cells at the peak level was calculated and percentage increase over control cells was presented as a bar graph in (C). The arrows indicate when the treatments were started. Data are presented as the means ± standard error of the mean, n=4-5 experiments. *P<0.05 vs. the control cells; #P<0.05 vs. EGF. CTX, cetuximab; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor.

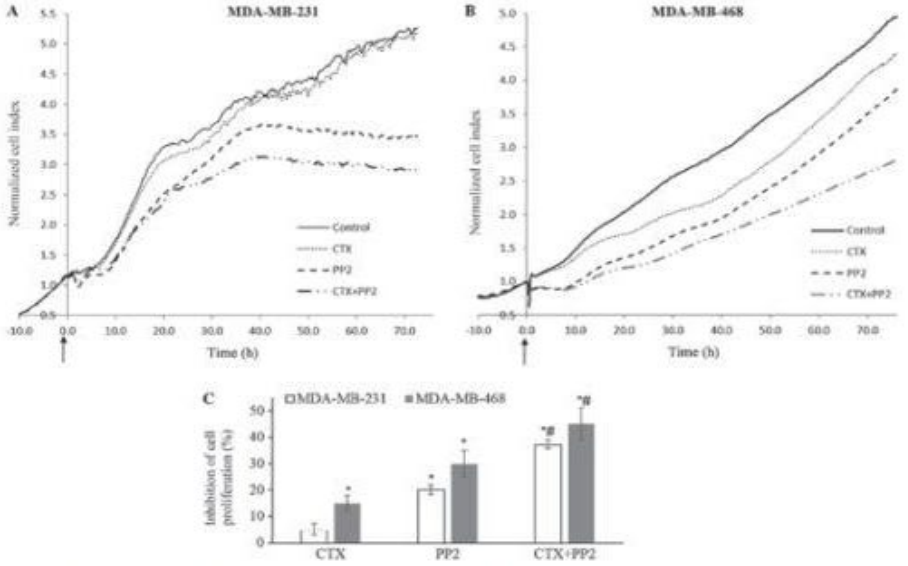


Figure 9. Src kinase inhibition enhances the cetuximab-mediated anti-proliferative response. (A-C) Impedance measurement of cell proliferation with the real-time cell electronic sensing system with cetuximab (100 nM), PP2 (10 μM) and CTX (100 nM) + PP2 (10 μM) treatment of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells in medium with FBS (10%). CTX alone did not alter the proliferation of MDA-MB-231 cells, but it induced a 15% inhibition of the proliferation of MDA-MB-468 cells. The Src kinase inhibitor, PP2, at 10 μM induced 20% and 27% inhibition of cellular proliferation. This response significantly increased to reach 38% and 45% when combined with CTX in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells, respectively. The cell index recorded just before CTX, PP2 or CTX+PP2 treatment was defined as the baseline and fold change of the baseline was determined for further measurements and shown as cell index fold change in (A and B). The arrows indicate when the treatments were started. The cell index fold change at 72 h for each group and the percentage of phosphate-buffered saline-treated control cells was determined and percent inhibition of the cell index obtained from phosphate buffered saline-treated control cells was presented as a bar graph in (C). Data are presented as the means ± standard error of the mean, n=4-5 experiments. *P<0.05 vs. the control cells; #P<0.05 vs. EGF. CTX, cetuximab; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor.

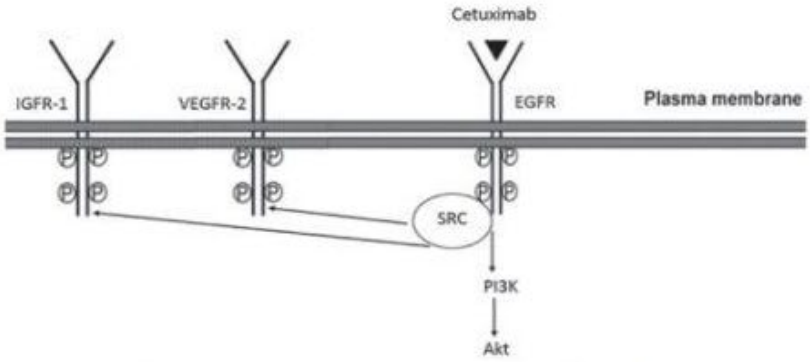


Figure 10. Model of cetuximab effect on epidermal growth factor receptor (EGFR) in breast cancer cell lines. Cetuximab leads to transactivation of IGF-1R and VEGFR-2 via an EGFR and Src kinase-dependent pathway in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells, which also causes activation of phosphoinositide-3-kinase (PI3K) in both cell lines and serine-threonine kinases (Akt) in MDA-MB-231 cells.

by blocking the binding of growth factors. However, these antibodies may not only antagonize the binding of growth factors or completely shut down EGFR signalling, but may also exert agonist-like effects or act like partial agonists (24-26). One of the unavoidable results of this action may be triggering malignant signalling in cancer cells, similar to growth factors, which may explain the lack of an anticancer response pattern in TNBC cells. TNBCs are resistant to treatment with the EGFR antibody, CTX. The primary focus of the present study was to determine whether CTX possesses partial agonist-like properties and triggers the EGFR signalling pathway; we then investigated whether these properties are partly responsible for TNBC cell resistance to CTX.

To define an antibody as a partial agonist, it must exert an agonistic effect upon binding to a receptor. To elucidate this, we initially determined whether CTX causes the auto-phosphorylation of EGFR and triggers its downstream signalling pathway similar to an EGFR agonist. It was observed that the treatment of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells with CTX significantly increased the Tyr1173 phosphorylation of EGFR, which was the first indication that CTX may function as a partial agonist of EGFR. To determine whether the CTX-mediated Tyr1173 phosphorylation of EGFR triggers downstream signalling, the activity status of Src kinase, PI3K, Akt and ERK1/2 in the CTX-treated cells was then evaluated. CTX treatment was found to markedly enhance the phosphorylation of Src kinase, PI3K and Akt in the MDA-MB-231 cells, and the phosphorylation of Src kinase and PI3K in the MDA-M468 cells. However, we observed no increase in the phosphorylation of ERK1/2 with CTX treatment in either the MDA-MB-231 or MDA-MB-468 cells. This may be explained by the high level of ERK1/2 expression in these cells, together with the high basal phosphorylated ERK1/2 level (41), which may also be linked to KRAS and BRAF mutations in MDA-MB-231 cells (21). Therefore, CTX cannot further promote the phosphorylation of ERK1/2 in these cell lines. Similarly, CTX did not enhance Akt phosphorylation in MDA-MB-468 cells, which is also most likely associated with the high basal level of phosphorylated Akt in MDA-MB-468 cells, which lack the functional tumour suppressor Akt-inhibiting gene, PTEN (21,42). By contrast, EGF, as a full agonist, did enhance ERK1/2 and Akt phosphorylation in these cell lines (data not shown). These results indicate that the signal strength must be at the level induced by the full agonist (EGF) on EGFR in order to observe Akt or ERK1/2 phosphorylation, whereas the weak signal induced by the partial agonist (CTX), is not sufficient to achieve phosphorylation of ERK1/2 and Akt in the MDA-MB-468 and ERK1/2 in MDA-MB-231 cells.

Growth factors cause the activation of both their own specific receptors and different types of growth factor receptors (34,35). The EGF stimulation of EGFR leads to the phosphorylation of IGF-1R in an Src kinase-dependent manner (34). There is also a synergistic interaction between EGFR and VEGFR-2, while EGF stimulation increases both the expression and phosphorylation of VEGFR-2 (35), and activation of Src kinase also mediates transactivation of VEGFR-2 (43). After observing the CTX-mediated phosphorylation of EGFR and Src kinase, the effect of CTX on IGF-1R and VEGFR-2 phosphorylation was examined, and it was observed that CTX enhanced the phosphorylation of both, and that this induced phosphorylation was inhibited by the EGFR tyrosine kinase inhibitor, AG1478, and the Src kinase inhibitor, PP2. In our experiments, although CTX treatment led to an increase in the level of phosphorylated IGF-1R and VEGFR-2, it caused some decline or no change in the level of IGR-1 and VEGF-2. After observing this variability in the total level of IGF-1R or VEGF-2 we did not measure their level in each experiment. The stimulation or phosphorylation of tyrosine kinase residues of EGFR, VEGFR-2 and IGF-1R leads to their internalization and degradation but does not increase their cellular level (44-47). We also observed that CTX stimulation significantly decreased the level of EGFR (Figs. 1-3). Taken together, our data suggest that the CTX-mediated phosphorylation of EGFR, VEGFR-2 and IGF-1R is not related to an increase in their expression level. Based on these findings, it is suggested that the CTX-mediated activation of EGFR tyrosine kinase leads to the phosphorylation of EGFR and triggers Src kinase activation, which mediates the phosphorylation of IGF-1R and VEGFR-2 (Fig. 10).

As mentioned above, the stimulation of EGFR by agonists, such as EGF, causes the rapid internalization and degradation of the receptor (44). Based on these and our initial observations

indicating the decline in the level of EGFR with both CTX and EGF treatments, we measured the EGFR levels following treatment with CTX to further evaluate the agonist-like action of CTX. It was observed that CTX treatment led to a decline in EGFR levels in both the MDA-MB-231 and MDA-MB468 cells. In this response pattern, CTX acted as an agonist, but did not reduce the EGFR levels to a greater extent than EGF. Riese (26) proposed that partial agonist/antagonist antibodies trigger the phosphorylation of the Tyr residues of RTKs, leading to the degradation and irreversible inhibition of the receptor. This partial agonistic property of monoclonal antibodies may be an advantage for EGFR-targeted anticancer effectiveness. Ferraro *et al* (48) also suggested an alternative strategy for inhibiting tumour growth by enhancing the internalization of EGFR, increasing its degradation and inhibiting its recycling through the use of EGFR-targeted monoclonal antibodies. From our results, it may be concluded that although CTX causes the degradation of EGFR, this is not sufficient to exert a pronounced anti-proliferative effect on TNBC cells.

Several studies have demonstrated that growth factors and RTK agonists induce immediate morphological or behavioural changes that may be detected using real-time cell-based impedance measurement (38-40). Thus, in this study, we also measured the effect of CTX on cellular behaviour or morphology as another approach to evaluating its partial agonist-like activity. CTX was found to induce significant morphological changes in the cells, similar to EGF, indicating that CTX has a partial agonistic action in terms of cellular morphology. It would also be better to visualize the morphological changes induced with CTX in these cells by using microscopic techniques in a future study.

The second important indication to define an antibody as a partial agonist is that it has a notably lower signal strength compared with a full agonist. We therefore compared CTX- and EGF-mediated responses. All the responses induced by CTX, namely the phosphorylation of EGFR, IGF-1R, VEGFR-2, Akt and PI3K, and reduced EGFR levels, were significantly less pronounced compared with those induced by EGF as a full agonist. These results clearly indicate that CTX can partially, but not fully, activate EGFR. A third typical indication of a partial agonist is that it partially inhibits the response induced by a full agonist. Our results clearly demonstrated that CTX partially, but not fully, inhibited the EGF-mediated responses.

An important aspect of the results of the present study is that the partial agonistic action of CTX causes EGFR phosphorylation on the Tyr1173 residue, leading to the phosphorylation of Src kinase, PI3K, Akt, IGF-1R and VEGFR-2. All these signalling molecules are coupled to a malignant phenotype. Previous research, as well as the present study, have demonstrated that MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells are resistant to CTX treatment (33,49,50). This partial agonistic property may therefore be implicated in the mechanism underlying the resistance of these cell lines to CTX. Based on the observation that the inhibition of Src kinase significantly inhibited the CTX-mediated phosphorylation of PI3K, Akt, IGF-1R and VEGFR-2, we investigated whether the activation of Src kinase could partly explain the resistance of these cells to CTX. For this purpose, the effect of CTX on cellular proliferation was examined in the presence of the Src kinase inhibitor, PP2, in the MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. Indeed, PP2 significantly enhanced the CTX-mediated anti-proliferative response in these cell lines. As expected, however, the partial agonistic action of CTX could not fully explain the resistance observed in these cell lines, since these cells harbour mutations in KRAS/BRAF and PTEN that cause EGFR-independent activation of malignant signalling.

Various results reported in the literature also support our findings that CTX can cause the phosphorylation of EGFR, IGF-1R and Src kinase in several different cancer cell lines, which are primarily refractory or have acquired resistance (30-32,51,52). In particular, CTX-sensitive cancer cells may become resistant following CTX treatment (18,53-55). There is evidence to indicate that EGFR, HER2, HER3, c-Met and VEGFR-2 are overexpressed, and also that Src kinase and PI3K/Akt activity increase in acquired CTX resistance (18-20,54,56-58). CTX can phosphorylate and activate EGFR in non-small cell lung cancer cells or in head and neck squamous cancer cells (30,31,54). Yoshida *et al* (30) reported that CTX led to the dimerization of EGFR and caused the phosphorylation of the Tyr845, Tyr1068 and Tyr1173 residues in the non-small cell lung cancer cells lines, H292 and H460. Accordingly, it is very important to examine and elucidate a possible partial agonist action of CTX and its role in acquired resistance of cancer cells. The CTX-mediated phosphorylation or activation of growth factor receptors have not been specifically addressed to date as a mechanism underlying resistance, and this phenomenon has not been defined as partial agonism. The results of the present study are novel, as they clearly demonstrated the partial agonist action of CTX and, therefore, have drawn attention to the possibility that the partial agonistic action of monoclonal antibodies may be key to the resistance to EGFR-targeted therapies.

To further elucidate the effectiveness of EGFR-targeted antibodies in cancer cells exhibiting high EGFR signalling, it would be valuable to compare the anticancer effectiveness of antibodies with different properties or efficacies; one may act like a neutral antagonist on EGFR, thereby preventing any type of phosphorylation or activation of EGFR or its downstream signalling molecules, whereas another may act like a biased agonist that selectively triggers a specific EGFR signalling pathway. The binding of this type of antibody to EGFR may lead to the phosphorylation of the Tyr residues that trigger its ubiquitination and facilitate its degradation, but without the phosphorylation of the Tyr residues that trigger malignant signalling. Such an antibody could completely shut down EGFR signalling. Therefore, it is crucial to understand the therapeutic effectiveness of EGFR-targeted antibodies with different properties, such as partial agonists, neutral antagonists and biased agonists, in the treatment of cancers that retain high EGFR signalling.

In conclusion, the results of the present study indicate that CTX exerts a partial agonistic effect on EGFR, which leads to the phosphorylation of EGFR, Src kinase, PI3K, Akt, IGF-1R and VEGFR-2, whereas the inhibition of this induced phosphorylation by the Src kinase inhibitor, PP2, enhances its anti-proliferative effect. To the best of our knowledge, this study is the first to emphasize the partial agonist properties of CTX, which are likely implicated in the mechanisms underlying the resistance of MDA-MB231 and MDA-MB468 cells to CTX. The anticancer effectiveness of

CTX should thus be examined further by blocking its partial agonist action through Src kinase inhibition in preclinical and clinical studies.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr Bala Gur Dedeoğlu (Biotechnology Institute, University of Ankara, Ankara, Turkey) for her critical reading of the manuscript.

Funding

The present study was supported by a research grant from the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBITAK; grant no. SBAG-113S396).

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article or are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

HG, MMT and SYB participated in the design of the study. MMT, SYB and BD performed the experiments and generated the data. HG, MMT, SYB and BD analysed and reviewed the Results and Discussion. HG and SYB prepared the manuscript and revised it. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Lewis TS, Shapiro PS and Ahn NG: Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res 74: 49-139, 1998.
2. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M and Yarden Y: Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. Adv Cancer Res 77: 25-79, 2000.
3. Vivanco I and Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer 2: 489-501, 2002.
4. Chong CR and Jänne PA: The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. Nat Med 19: 1389-1400, 2013.
5. Downward J, Parker P and Waterfield MD: Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. Nature 311: 483-485, 1984.
6. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA and Caldas C: Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? J Clin Oncol 23: 7350-7360, 2005.
7. Hurvitz S and Mead M: Triple-negative breast cancer: advancements in characterization and treatment approach. Curr Opin Obstet Gynecol 28: 59-69, 2016.
8. DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, Whalen SG, Moore D II and Thor AD: Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. J Clin Oncol 23: 1152-1160, 2005.
9. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M and Chen B: EGFR gene amplification in breast cancer: Correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. Mod Pathol 18: 1027-1033, 2005.
10. Rimawi MF, Shetty PB, Weiss HL, Schiff R, Osborne CK, Chamness GC and Elledge RM: Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes. Cancer 116: 1234-1242, 2010.
11. Burness ML, Grushko TA and Olopade OI: Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: Promising clinical target or only a marker? Cancer J 16: 23-32, 2010.
12. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, *et al*: Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res 10: 5367-5374, 2004.
13. Sunada H, Magun BE, Mendelsohn J and MacLeod CL: Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. Proc Natl Acad Sci USA 83: 3825-3829, 1986.
14. Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O and Galluzzo S: Cetuximab: From bench to bedside. Curr Cancer Drug Targets 10: 80-95, 2010.
15. Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH and Mendelsohn J: Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: Identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci USA 80: 1337-1341, 1983.
16. Ciardiello F and Tortora G: EGFR antagonists in cancer treatment. N Engl J Med 358: 1160-1174, 2008.
17. Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX, Liu MC, Storniolo AM, Rimawi MF, Forero-Torres A, *et al*: TBCRC 001: Randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. J Clin Oncol 30: 2615-2623, 2012.
18. Brand TM, Iida M and Wheeler DL: Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. Cancer Biol Ther 11: 777-792, 2011.
19. Bardelli A and Siena S: Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. J Clin Oncol 28: 1254-1261, 2010.
20. Sforza V, Martinelli E, Ciardiello F, Gambardella V, Napolitano S, Martini G, Della Corte C, Cardone C, Ferrara ML, Reginelli A, *et al*: Mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer. World J Gastroenterol 22: 6345-6361, 2016.
21. Hollestelle A, Elstrodt F, Nagel JHA, Kallemeijn WW and Schutte M: Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. Mol Cancer Res 5: 195-201, 2007.
22. Hsu HC, Thiam TK, Lu YJ, Yeh CY, Tsai WS, You JF, Hung HY, Tsai CN, Hsu A, Chen HC, *et al*: Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients. Oncotarget 7: 22257-22270, 2016.
23. Macdonald-Obermann JL and Pike LJ: Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation. J Biol Chem 289: 26178-26188, 2014.
24. Prat M, Oltolina F and Basilico C: Monoclonal Antibodies against the MET/HGF Receptor and Its Ligand: Multitask Tools with Applications from Basic Research to Therapy. Biomedicines 2: 359-383, 2014.
25. Deb TB, Zuo AH, Barndt RJ, Sengupta S, Jankovic R and Johnson MD: Pnck overexpression in HER-2 gene-amplified breast cancer causes Trastuzumab resistance through a paradoxical PTEN-mediated process. Breast Cancer Res Treat 150: 347-361, 2015.
26. Riese DJ II: Ligand-based receptor tyrosine kinase partial agonists: New paradigm for cancer drug discovery? Expert Opin Drug Discov 6: 185-193, 2011.
27. Scott GK, Dodson JM, Montgomery PA, Johnson RM, Sarup JC, Wong WL, Ullrich A, Shepard HM and Benz CC: p185HER2 signal transduction in breast cancer cells. J Biol Chem 266: 14300-14305, 1991.

28. Nagata Y, Lan K-H, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, *et al*: PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. Cancer Cell 6: 117-127, 2004.
29. Esteva FJ, Yu D, Hung M-C and Hortobagyi GN: Molecular predictors of response to trastuzumab and lapatinib in breast cancer. Nat Rev Clin Oncol 7: 98-107, 2010.
30. Yoshida T, Okamoto I, Okabe T, Iwasa T, Satoh T, Nishio K, Fukuoka M and Nakagawa K: Matuzumab and cetuximab activate the epidermal growth factor receptor but fail to trigger downstream signaling by Akt or Erk. Int J Cancer 122: 1530-1538, 2008.
31. Raben D, Helfrich B, Chan DC, Ciardiello F, Zhao L, Franklin W, Barón AE, Zeng C, Johnson TK and Bunn PA Jr: The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. Clin Cancer Res 11: 795-805, 2005.
32. Molli PR, Adam L and Kumar R: Therapeutic IMC-C225 antibody inhibits breast cancer cell invasiveness via Vav2-dependent activation of RhoA GTPase. Clin Cancer Res 14: 6161-6170, 2008.
33. El Guerrab A, Bamdad M, Bignon YJ, Penault-Llorca F and Aubel C: Anti-EGFR monoclonal antibodies enhance sensitivity to DNA-damaging agents in BRCA1-mutated and PTEN-wild-type triple-negative breast cancer cells. Mol Carcinog 56: 1383-1394, 2017.
34. Hallak H, Moehren G, Tang J, Kaou M, Addas M, Hoek JB and Rubin R: Epidermal growth factor-induced activation of the insulin-like growth factor I receptor in rat hepatocytes. Hepatology 36: 1509-1518, 2002.
35. Saryeddine L, Zibara K, Kassem N, Badran B and El-Zein N: EGF-Induced VEGF Exerts a PI3K-Dependent Positive Feedback on ERK and AKT through VEGFR2 in Hematological In Vitro Models. PLoS One 11: e0165876, 2016.
36. Tuglu MM, Bostanabad SY, Ozyon G, Dalkiliç B and Gurdal H: The role of dual specificity phosphatase 1 and protein phosphatase 1 in β_2 adrenergic receptor mediated inhibition of extracellular signal regulated kinase 1/2 in triple negative breast cancer cell lines. Mol Med Rep 17: 2033-2043, 2018.
37. Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B and Zheng W: Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. Assay Drug Dev Technol 2: 363-372, 2004.
38. Atienza JM, Yu N, Wang X, Xu X and Abassi Y: Label-free and real-time cell-based kinase assay for screening selective and potent receptor tyrosine kinase inhibitors using microelectronic sensor array. J Biomol Screen 11: 634-643, 2006.
39. Dynamic Monitoring of Receptor Tyrosine Kinase Activation in Living Cells Dynamic Monitoring of Receptor Tyrosine Kinase Activation in Living Cells. ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, 2013.
40. Chinkers M, McKanna JA and Cohen S: Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factors. J Cell Biol 83: 260-265, 1979.
41. Bartholomeusz C, Gonzalez-Angulo AM, Liu P, Hayashi N, Lluch A, Ferrer-Lozano J and Hortobágyi GN: High ERK protein expression levels correlate with shorter survival in triple-negative breast cancer patients. Oncologist 17: 766-774, 2012.
42. Stemke-hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, Carey M, Hu Z, Guan Y, Sahin A, *et al*: An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. Cancer Res 68: 6084-6092, 2008.
43. Petreaca ML, Yao M, Liu Y, Defea K and Martins-Green M: Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. Mol Biol Cell 18: 5014-5023, 2007.
44. Vieira AV, Lamaze C and Schmid SL: Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. Science 274: 2086-2089, 1996.
45. Carpentier JL: Insulin receptor internalization: Molecular mechanisms and physiopathological implications. Diabetologia 37 (Suppl 2): S117-S124, 1994.
46. Bruns AF, Herbert SP, Odell AF, Jopling HM, Hooper NM, Zachary IC, Walker JH and Ponnambalam S: Ligand-stimulated VEGFR2 signaling is regulated by co-ordinated trafficking and proteolysis. Traffic 11: 161-174, 2010.
47. Chow JC, Condorelli G and Smith RJ: Insulin-like growth factor-I receptor internalization regulates signaling via the Shc/mitogen-activated protein kinase pathway, but not the insulin receptor substrate-1 pathway. J Biol Chem 273: 4672-4680, 1998.
48. Ferraro DA, Gaborit N, Maron R, Cohen-Dvashi H, Porat Z, Pareja F, Lavi S, Lindzen M, Ben-Chetrit N, Sela M, *et al*: Inhibition of triple-negative breast cancer models by combinations of antibodies to EGFR. Proc Natl Acad Sci USA 110: 1815-1820, 2013.
49. El Guerrab A, Bamdad M, Kwiatkowski F, Bignon YJ, Penault-Llorca F and Aubel C: Anti-EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors as combination therapy for triple-negative breast cancer. Oncotarget 7: 73618-73637, 2016.
50. Sohn J, Liu S, Parinyanitikul N, Lee J, Hortobagyi GN, Mills GB, Ueno NT and Gonzalez-Angulo AM: cMET activation and EGFR-directed therapy resistance in triple-negative breast cancer. J Cancer 5: 745-753, 2014.
51. Li X, Xu L, Li H, Zhao L, Luo Y, Zhu Z, Liu Y and Qu X: Cetuximab-induced insulin-like growth factor receptor I activation mediates cetuximab resistance in gastric cancer cells. Mol Med Rep 11: 4547-4554, 2015.
52. Rebucci M, Peixoto P, Dewitte A, Wattez N, De Nuncques MA, Rezvoy N, Vautravers-Dewas C, Buisine MP, Guerin E, Peyrat JP, *et al*: Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: Role of AKT inhibition in bypassing this resistance. Int J Oncol 38: 189-200, 2011.
53. Troiani T, Napolitano S, Vitagliano D, Morgillo F, Capasso A, Sforza V, Nappi A, Ciardiello D, Ciardiello F and Martinelli E: Primary and acquired resistance of colorectal cancer cells to anti-EGFR antibodies converge on MEK/ERK pathway activation and can be overcome by combined MEK/EGFR inhibition. Clin Cancer Res 20: 3775-3786, 2014.
54. Bianco R, Rosa R, Damiano V, Daniele G, Gelardi T, Garofalo S, Tarallo V, De Falco S, Melisi D, Benelli R, *et al*: Vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells. Clin Cancer Res 14: 5069-5080, 2008.
55. Leto SM and Trusolino L: Primary and acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer: Impact on future treatment strategies. J Mol Med (Berl) 92: 709-722, 2014.
56. Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, Gondi V, Hsu KT and Harari PM: Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: Role of HER (ErbB) family members. Oncogene 27: 3944-3956, 2008.
57. Iida M, Brand TM, Campbell DA, Starr MM, Luthar N, Traynor AM and Wheeler DL: Targeting AKT with the allosteric AKT inhibitor MK-2206 in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to cetuximab. Cancer Biol Ther 14: 481-491, 2013.
58. Kim SM, Kim JS, Kim JH, Yun CO, Kim EM, Kim HK, Solca F, Choi SY and Cho BC: Acquired resistance to cetuximab is mediated by increased PTEN instability and leads cross-resistance to gefitinib in HCC827 NSCLC cells. Cancer Lett 296: 150-159, 2010.