

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HER2 EKSPRESYONU OLAN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
ÖKARYOTİK ELONGASYON FAKTÖR-2 KİNAZ (eEF2K)
AKTİVASYONUNUN ROLÜ

Dr. Mustafa Emre GEDİK

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2021

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HER2 EKSPRESYONU OLAN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE
ÖKARYOTİK ELONGASYON FAKTÖR-2 KİNAZ (eEF2K)
AKTİVASYONUNUN ROLÜ

Dr. Mustafa Emre GEDİK

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. A. Lale DOĞAN

ANKARA

2021

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HER2 EKSPRESYONU OLAN MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE ÖKARYOTİK
ELONGASYON FAKTÖR-2 KİNAZ (eEF2K) AKTİVASYONUNUN ROLÜ

Mustafa Emre Gedik

Danışman: Prof. Dr. A. Lale Doğan

Bu tez çalışması 22.06.2021 tarihinde jürimiz tarafından “Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Belgin Ataç*
Başkent Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu*
Ankara Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Hande Canpınar*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Gürcan Günaydın*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Gülnihal Kulaksız Erkmen*
Hacettepe Üniversitesi

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

29 Haziran 2021

Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

22/06/2021

Mustafa Emre Gedik

i

ⁱ“**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danişmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezini erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danişmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezini erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danişmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. A. Lale DOĞAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Mustafa Emre Gedik

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu özveriyle büyük emek sarfeden, hiçbir zaman yardımını ve desteğini benden esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. A. Lale Doğan'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yapmış olduğumuz ortak çalışmalarda ve her konuda desteğini yanımda bulduğum, tecrübe ve bilgisinden oldukça yararlandığım Sayın Doç. Dr. Gürcan Günaydın'a şükranlarımı sunarım.

Tüm eğitimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, gerek akademik gerek sosyal hayatımda, sahip olduğu bilimsel yaklaşımla yolumu aydınlatan Sayın Prof. Dr. Emin Kansu'ya, varlıkları ve tecrübeleri ile desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Dicle Güç ve Sayın Doç. Dr. Hande Canpınar'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Gerek derslerde gerekse ders dışında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Güneş Esendağlı ve Sayın Doç. Dr. Füsün Özmen'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullanmış olduğum hücre hatları paylaşımlarından ötürü Sayın Doç. Dr. Özgür Kütük ve Dr. Bahriye Karakaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesi üyelerinden Sayın Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu'na kıymetli katkılarından ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince yapmış olduğumuz kıymetli çalışmalar ve dostluklarından ötürü değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Elif Haznedaroğlu Benlioğlu, Dr. Burcu Şirin Kesikli, Dr. Seylan Ayan, Dr. Betül Gök Yavuz, Uzm. Dr. Abdulsamet Sandal, Dr. Mohammed Azim Ebrahimi, Mol. Biol. Göksu Sarıoğlu ve MD/PhD öğrencisi Elif Çakan'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim sürecim boyunca her türlü destek ve yardımları ile yanımda olan Temel Onkoloji Anabilim Dalı kıymetli personelleri Semra Solmaz, Burçin Taşbasan, Banu Avşar, Necla Çelik, Hüseyin Ünal, Kanser Enstitüsü kıymetli personelleri Gülay Çelik, Sevilay Kaya ve Temel Onkoloji Anabilim Dalı değerli öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Maddi manevi yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim, haklarını hiçbir zaman ödeyemeceğim sevgili aileme minnet ve şükranlarımı sunarım. İyi günde, kötü günde her daim yanımda olan, varlığı ve sohbetinden beni mahrum bırakmayan kız arkadaşım Elif Gözde Arslan'a teşekkürlerimi sunarım. Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (BAP Proje NO: TSA-2018-16740).

ÖZET

Gedik, M. E., HER2 Ekspresyonu Olan Meme Kanseri Hücrelerinde Ökaryotik Elongasyon Faktör-2 Kinaz (eEF2K) Aktivasyonunun Rolü, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Doktora Tezi, Ankara, 2021. HER2'nin sürekli aktivasyonu, hücre çoğalması, sağkalımı ve migrasyonu gibi çeşitli biyolojik cevapların regülasyonunun bozulmasına ve tümör gelişimine yol açmaktadır. eEF2K, protein sentezinin düzenlenmesinde rol oynayan bir protein kinazdır. Bazı kanser hücrelerinde, eEF2K aktivitesinin artmasıyla birlikte hücrelerin stres koşullarına adaptasyon ve ilaç direnci geliştirdiği bilinmektedir. HER2 ifadesi olan kanser hücrelerinde eEF2K'nın ekspresyon düzeyi ve aktivitesi henüz bilinmemektedir. Bu amaç doğrultusunda yapılan *in silico* analizler sonucunda, HER2 ilişkili sinyal yolağı proteinleri gen ekspresyonları ile eEF2K gen ekspresyonunun korelasyon gösterdiği ve üçlü negatif meme kanserine oranla HER2+ meme kanserinde eEF2K'nın daha kuvvetli düzenlendiği belirlendi. HER2 ifadesi olan 5 hücre dizisinde trastuzumabın PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı üzerinde inhibitör etkisi gösterildi ve eEF2K/eEF2 protein aktiviteleri ile ilişkisi incelendi. Trastuzumabın sinyal kaskadında en güçlü inhibitör etkisinin Akt aktivasyonu üzerinde olduğu belirlendi. İlaç uygulanan BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453 ve UACC-893 hücrelerinde eEF2K'nın aktivasyonunun 6 saatin sonunda azalmakla beraber, 48 saatin sonunda arttığı ve eEF2 fosforilasyonu artışı ile hücrelerde proliferasyonun azaldığı gösterildi. eEF2K aktivitesindeki değişiklikler trastuzumabın S6K protein aktivasyonu üzerindeki etkisi ile uyumlu bulundu. Buna göre, HER2 eksprese eden meme kanserinde AKT ve S6K aktivitelerinin baskılanmasının eEF2 aracılı hücre proliferasyonuna etkisi ilk kez gösterildi. Hücre proliferasyonu analizlerine göre, BT-474 ve SKBR-3 hücrelerindeki proliferasyonun daha güçlü olarak baskılanması dikkat çekti. Bu sonuçlara ilave olarak, trastuzumabın eEF2K'nın aktivatörü olan AMPK'nın ekspresyonunu da BT-474 ve SKBR-3 hücrelerinde istatistiksel anlamlı olarak azaldığı saptandı. Sonuç olarak, HER2 ifadesi olan meme kanseri hücre dizilerinde PI3K/Akt/mTor sinyal yolağının eEF2K aktivitesi üzerinde düzenleyici etkisi olduğuna ve HER2 meme kanserinde eEF2K'nın önemli bir terapötik hedef olabileceğini kanaat edildi.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, eEF2K, eEF2, HER2, Trastuzumab

Destekleyen kurumlar: H.Ü.B.A.P (BAP Proje No: TSA-2018-16740)

ABSTRACT

Gedik, M. E., The Role of Eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase (eEF2K) activation in HER2 expressing breast cancer cells, Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Tumor Biology and Immunology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2021. Continuous activation of HER2 leads to the deregulation of various biological responses such as cell proliferation, survival, and migration, and tumor growth. eEF2K is a protein kinase involved in the regulation of protein synthesis. It is known that, in some cancer cells, with the increase of eEF2K activity, the cells develop adaptation to stress conditions and drug resistance. The expression level and activity of eEF2K in HER2-expressing cancer cells is not yet known. As a result of the *in silico* analyzes performed in line with this purpose, it was determined that gene expressions of HER2-related signaling pathway were correlated with eEF2K gene expression and eEF2K was more regulated in HER2+ breast cancer compared to TNBC (triple negative breast cancer) breast cancer. the inhibitory effect of trastuzumab on the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway was demonstrated and its relationship with eEF2K/eEF2 protein activities in five HER2-expressing cell lines. It was determined that the strongest inhibitory effect of trastuzumab in the signal cascade was on Akt activation. In BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453 and UACC-893 cells treated with drugs, it was shown that the activation of eEF2K decreased after 6 hours, but increased at the end of 48 hours and decreased proliferation with the increase in eEF2 phosphorylation. Changes in eEF2K activity were found to be consistent with the effect of trastuzumab on S6K protein activation. Accordingly, the effect of suppression of AKT and S6K activities on eEF2-mediated cell proliferation in HER2-expressing breast cancer was demonstrated for the first time. According to cell proliferation analysis, a stronger suppression of proliferation in BT-474 and SKBR-3 cells was noted. In addition to these results, the expression of AMPK, which is the activator of eEF2K, was also found to be statistically significantly decreased in BT-474 and SKBR-3 cells. As a result, it was concluded that PI3K/Akt/mTor signaling pathway has a regulatory effect on eEF2K activity in HER2-expressing breast cancer cell lines with, and eEF2K may be an important therapeutic target in HER2-expressing breast cancer.

Keywords: Breast Cancer, eEF2K, eEF2, HER2, Trastuzumab

Supported by H.U.S.R.C (SRC Project No: TSA-2018-16740)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xxv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Meme Kanseri	4
2.2. Reseptör Tirozin Kinazlar ve HER2+ Meme Kanseri	6
2.3. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı	9
2.3.1. PI3K (Fosfatidil İnozitol 3 Kinaz)	9
2.3.2. Akt (Protein Kinaz B)	11
2.3.3. mTOR (<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>)	13
2.4. HER2+ Meme Kanseri Tedavi Stratejileri ve Gelişen Direnç Mekanizmaları	14
2.5. Ökaryotik Elongasyon Faktör 2 Kinaz (eEF2K) ve Ökaryotik Elongasyon Faktör 2 (eEF2)	18
2.5.1. Yapısal Özellikleri	18
2.5.2. Fonksiyonel Özellikleri	20
2.5.3. Kansere Hücrelerinde eEF2K'nın Rolü	23

2.6. Amaç	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1 Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar	29
3.2 Aletler ve Cihazlar	34
3.3 Hücre Kültürü	36
3.4. Mikoplazma Testi	36
3.5. İlaç Uygulaması	37
3.6. MTT Sitotoksosite Testi	37
3.7. Protein Lizatlarının Hazırlanması	38
3.8. Protein Kantitasyonu	38
3.9. Western Blot	39
3.10. xCelligence Aracılı Gerçek-Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi	40
3.11. CFSE Hücre Proliferasyonu Testi	40
3.12. Biyoenformatik Analiz	41
3.13. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR	43
4.1. HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Belirlenen Gen Setinin Biyoenformatik Analizi	43
4.1.1. HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Belirlenen Gen Setinin <i>CCL</i> E Mikrodizin Veri Tabanında Değerlendirilmesi	43
4.1.2. HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Belirlenen Gen Setinin <i>GEO</i> Veri Tabanında Değerlendirilmesi	44
4.1.3. HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Belirlenen Gen Setinin <i>CCL</i> E RNA Sekans Veri Tabanında Değerlendirilmesi ve HER2 Eksprese eden Meme ve Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücre Dizilerinde <i>KEGG</i> ve <i>GSEA</i> Analizi	46

4.2. CCLE RNA Sekans Veri Tabanından Elde Edilen Tüm RNA Sekans Verileri ile HER2 Eksprese eden ve Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücre Dizilerinde <i>KEGG</i> ve <i>GSEA</i> Analizi	47
4.3. Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Trastuzumab İçin Subtoksik Dozun MTT Testi İle Belirlenmesi	53
4.4. Trastuzumab ile İnkübe Edilmiş HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Yolak Protein İfadelerinin İncelenmesi	57
4.4.1. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu EGFR/HER2/HER3/Akt Protein Fosforilasyonlarının Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi	58
4.4.2. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu p70S6K Protein Fosforilasyonunun Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi	68
4.4.3. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu eEF2K/eEF2 Protein Fosforilasyonlarının Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi	72
4.4.4. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu AMPK Protein Fosforilasyonunun Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi	76
4.4.5. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu SiklinD1 Protein Fosforilasyonunun Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi	81
4.4.6. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu p27 ve p21 Protein İfadelerinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi	85
4.4.7. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu ADAM10 Protein İfadesinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi	89
4.4.8. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu PARP ve Kaspaz 3 Protein İfadelerinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi	94
4.5. Trastuzumab ile İnkübe Edilmiş HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde iCELLigence Aracılı Gerçek Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizleri	99
4.6. Trastuzumab ile İnkübe Edilmiş HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Hücre Proliferasyon Deneyi (<i>CFSE</i>) ile Hücre Sağkalım Analizi	103

5. TARTIŞMA	109
--------------------	-----

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	116
-----------------------------	-----

7. KAYNAKLAR	118
---------------------	-----

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

EK-2: Turnitin Ekran Görüntüsü

EK-3: Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ



SİMGELER VE KISALTMALAR

4E-BP1	Ökaryotik başlatma faktörü 4E bağlayıcı protein 1
AMP	5'-adenozin monofosfat
AMPK	AMP ile aktive edilmiş protein kinaz
APC	Adenomatosis poliposis koli
Arc	<i>Activity-regulated cytoskeletal-associated protein</i>
ATP	Adenozin trifosfat
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
BRCA 1/2	Meme kanseri geni 1/2
c-FLIP	<i>Cellular FLICE-inhibitory protein</i>
CaMKII	Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II
CaMKIII	Kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz III
CDK4	Siklin bağımlı kinaz 4
DCIS	Duktal karsinoma in-situ
DEPTOR	mTOR etkileşimli protein içeren DEP domaini
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
eEF2	Ökaryotik elongasyon faktör 2
eEF2K	Ökaryotik elongasyon faktör 2 kinaz
EMT	Epitelyal-mezenkimal dönüşüm
ErbB	<i>Avian erythroblastosis oncogene B</i>
ErbB1	<i>Avian erythroblastosis oncogene B1</i>
ErbB2	<i>Avian erythroblastosis oncogene B2</i>

ErbB3	<i>Avian erythroblastosis oncogene B3</i>
ErbB4	<i>Avian erythroblastosis oncogene B4</i>
ER	Östrojen reseptörü
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR	Fibroblast büyüme faktör reseptörü
FOXM1	<i>Forkhead Box M1</i>
FOXO	<i>Forkhead Box Protein O</i>
GFR	Büyüme faktörü reseptörü
GLUT4	<i>Membrane translocation of the glucose transporter</i>
GSK-3	Glikojen sentez kinaz-3
HCC	Hepatosellüler karsinom
HER1	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 1
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HER3	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 3
HER4	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 4
IGF-1R	İnsulin-benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü
IDC	İnvazif duktal karsinoma
Ig	İmmunoglobulin
ILC	İnvazif lobular karsinoma
IR	İnsülin reseptörü
IRS	İnsülin reseptör substratı
JAK	Janus kinaz
LCIS	Lobuler karsinoma in-situ
LFS	Li-Fraumeni sendromu
LKB1	<i>Serine–threonine kinase liver kinase B1</i>

MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
mLST8	<i>Mammalian lethal with Sec13 protein 8</i>
mTOR	Memeli/rapamisinin moleküler hedefi
mTORC1	Memeli/rapamisinin moleküler hedefi kompleksi 1
mTORC2	Memeli/rapamisinin moleküler hedefi kompleksi 2
NHI125	<i>1-benzyl-3-cetyl-2-methylimidazolium iodide</i>
p70S6K	p70 ribozomal protein S6 kinaz
PDK1	Fosfotinositid-bağlı kinaz-1
PH	Pleckstrin homolog
PI-103	<i>pyrido[3',2':4,5]furo[3,2-d]pyrimidine</i>
PI3K	Fosfatidil inositol-3-kinaz
PIK3CA	Fosfatidil inositol 3 kinaz, katalitik altbirimi alfa
PIKK	PI3K ile ilişkili kinaz
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat
PIP3	Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfat
PKB	Protein kinaz B (Akt)
PKC	Protein kinaz C
PLCy	Fosfolipaz Cy
PR	Progesteron reseptörü
PRAS40	40 kDa'lık prolin bakımından zengin Akt substratı
PTB	Fosfotirozin-bağlayıcı Domain
PtdIns	Fosfatidil inositol
PTEN	Onuncu kromozom üzerinde silinmiş fosfataz ve tensin
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Raptor	mTOR ile ilişkili düzenleyici protein

Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RICTOR	mTOR'un Rapamisin-insensitif eşlikçisi
ROS	Reaktif oksijen türleri
RTK	Reseptör tirozin kinaz
S6K	Ribozomal protein S6 kinaz
Ser(S)/Thr(T)	Serin/Treonin
SH2	Src homoloğu 2 domaini
Shc	Src homoloğu 2 domaini içeren protein
Src	Sarkoma
STAT	Transkripsiyonun sinyal dönüştürücü ve aktivatörleri
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
TSC2	Tübero skleroz kompleksi 2
ULK1	<i>Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1</i>
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
YxxM	tirozin-x-x-metionin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Reseptör tirozin kinaz ailesi ve dimer yapıları	8
2.2. RTK aracılı PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı aktivasyonu	11
2.3. Direnç mekanizması: Ligand bağımsız sinyal aktivasyonu	15
2.4. Direnç mekanizması: p95 HER2 aracılı sinyal aktivasyonu	16
2.5. Direnç mekanizması: RTK <i>bypass</i> mekanizması	17
2.6. eEF2K yapısı ve fosforilasyon bölgeleri	20
2.7. eEF2K aktivasyonunu regüle eden sinyaller ve uyarılar	21
2.8. Kanseri hücrelerinde eEF2K aracılı adaptif sağkalım mekanizması	24
4.1. BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin gen ekspresyon profiline göre kümelenmesi (CCLE, mikrodizin)	44
4.2. BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin gen ekspresyon profiline göre kümelenmesi (GEO: GSE48216)	45
4.3. BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin gen ekspresyon profiline göre kümelenmesi (CCLE, RNA sekans)	46
4.4. HER2 eksprese eden meme kanseri grubunun üçlü negatif meme kanseri grubuna göre değişen HER2 sinyal yolağı molekülleri (CCLE, RNA sekans)	48
4.5. HER2 eksprese eden meme kanseri grubunun üçlü negatif meme kanseri grubuna göre değişen AMPK sinyal yolağı molekülleri (CCLE, RNA sekans)	49

4.6.	HER2 eksprese eden meme kanseri ve üçlü negatif meme kanseri grupları arasında değişen translasyonel elongasyon molekülünün GSEA analizi grafikleri	50
4.7.	HER2 eksprese eden meme kanseri ve üçlü negatif meme kanseri grupları arasında değişen p38/MAPK molekülünün GSEA analizi grafikleri	52
4.8.	BT-474 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği	53
4.9.	MDA-MB-361 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği	54
4.10.	MDA-MB-453 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği	55
4.11.	SKBR-3 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği	56
4.12.	UACC-893 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği	57
4.13.	BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri	59
4.14.	MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri	61
4.15.	MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri	63

- 4.16.** SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 65
- 4.17.** UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 67
- 4.18.** BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 68
- 4.19.** MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 69
- 4.20.** MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 70
- 4.21.** SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 71
- 4.22.** UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 71
- 4.23.** BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein

lizatlarında fosfo ve total eEF2 ve eEF2K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği	72
4.24. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total eEF2 ve eEF2K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri	73
4.25. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total eEF2 ve eEF2K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği	74
4.26. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total eEF2 ve eEF2K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği	75
4.27. UACC-893 dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total eEF2 ve eEF2K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği	76
4.28. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein ekspresyon görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği	77
4.29. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği	78
4.30. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği	79

- 4.31.** SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği 80
- 4.32.** UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği 81
- 4.33.** BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein ekspresyon görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği 82
- 4.34.** MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein ekspresyon görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği 82
- 4.35.** MDA-MB-453 dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği 83
- 4.36.** SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği 84
- 4.37.** UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği 84
- 4.38.** BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein

lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri	85
4.39. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri	86
4.40. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri	87
4.41. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri	88
4.42. UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri	89
4.43. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein bant görüntüsü ve relatif bant yoğunluğu grafiği	90
4.44. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein bant görüntüsü ve relatif bant yoğunluğu grafiği	91
4.45. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein bant görüntüsü ve relatif bant yoğunluğu grafiği	92

- 4.46.** SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein bant görüntüsü ve relatif bant yoğunluğu grafiği 93
- 4.47.** UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein ekspresyon bant ve relatif bant yoğunluğu grafiği 94
- 4.48.** BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 95
- 4.49.** MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 96
- 4.50.** MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 97
- 4.51.** SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 98
- 4.52.** UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri 99
- 4.53.** BT-474 hücre dizisinin gerçek zamanlı hücre proliferasyon analiz grafiği 100

4.54. MDA-MB-361 hücre dizisinin gerçek zamanlı hücre proliferasyon analiz grafiği	101
4.55. MDA-MB-453 hücre dizisinin gerçek zamanlı hücre proliferasyon analiz grafiği	102
4.56. SKBR-3 hücre dizisinin gerçek zamanlı hücre proliferasyon analiz grafiği	103
4.57. 120 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği	104
4.58. 120 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği	105
4.59. 120 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-453 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği	106
4.60. 120 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği	107
4.61. 120 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği	108

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Kimyasal maddeler, kitler ve tamponlar	29
3.2. Aletler ve cihazlar	34



1. GİRİŞ

Meme kanseri insidansı kadınlar arasında birinci sırada, ölümlle ilişkili kanserler arasında ikinci sırada yer almaktadır (1). Tüm kanser türlerinde olduğu gibi meme kanserinde de normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesi çok basamaklı bir süreç sonucu gerçekleşir. Hücre içi sinyal iletim yollarının regülasyonunun bozulması ile gerçekleşen bu dönüşüm, malign hücrelere sağkalım ve büyüme avantajı sağlamaktadır (2).

Meme kanserinin moleküler sınıflandırılmasında, gen ekspresyon profili açısından meme kanseri alt tipleri Luminal A, Luminal B, HER2+ ve Basal Benzeri/Üçlü negatif (*Basal-like = Triple Negative Breast Cancer (TNBC)*) olmak üzere dört kategoriye ayrılmaktadır. HER2+ meme kanseri alt tipi agresif fenotipte olup, kötü prognoz göstermekte ve sistemik kemoterapiye karşı direnç oluşturmaktadır. Ayrıca, ortalama sağkalım süresi diğer alt tiplere oranla daha kısadır (3, 4). HER2 reseptörü insan epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin bir üyesidir. HER reseptörlerinden HER2'nin ligand bağlanma bölgesi bulunmamaktadır. Diğer bir HER reseptörü olan HER3 ise kinaz aktivitesine sahip bölge içermemektedir. Buna göre, HER2 ile HER3 heterodimer oluşturarak sinyal iletiminde rol oynamaktadır. HER2 reseptörü, HER3 reseptörü ile oluşturduğu heterodimer güçlü mitojenik sinyaller oluşturması bakımından meme kanseri patolojisinde önemlidir. Özellikle HER2'nin aşırı eksprese olduğu hücrelerde HER3, tümör gelişimi ve hücre proliferasyonu için gerekli bir reseptördür (5).

Büyüme faktörlerinin reseptör tirozin kinazları uyarması ile başlatılan sinyal aktivasyonu PI3K/Akt sinyal yolağı ile hücre içine iletilerek, hücrede metabolizma, çoğalma, büyüme, sağkalım ve motiliteyi kontrol etmektedir. HER2+ meme kanseri hücrelerindeki artmış reseptör ifadesi sebebiyle sinyal yolağının kontrolsüz aktivasyonu oluşmaktadır (6). HER2 reseptörüne özgül hedeflenmiş tedavi ajanlarından biri olan trastuzumab, klinikte HER2+ meme kanserinde kullanılan terapötik bir ajandır (7). Kullanılan bu terapötik ajan ile, PI3K/Akt yolağı moleküllerinin hücre proliferasyonu, sağkalım ve motilite artışına yol açan etkilerinin inhibisyonu hedeflenmektedir (8).

Ökaryotik elongasyon faktör 2 kinaz (eEF2K), protein sentezinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan α -kinaz grubuna ait bir kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinazdır (9, 10). eEF2K hipoksi ve besin azlığı gibi hücrel stres koşullarında aktive olarak eEF2 proteinini fosforile eder. eEF2K için özgül bir substrat olan eEF2 proteini, treonin 56 bölgesinden fosforilasyonu sonucu inaktive olmakta ve protein translasyonu baskılanmaktadır (11, 12). eEF2 proteini ökaryotik hücrelerde bulunan, 90-110 kDa ağırlığında olan, protein sentezinin translokasyon aşamasını katalizleyen, düzenleyici bir proteindir (13, 14). eEF2 proteininin fosforillenmesi sonucunda, peptidil-tRNA'nın ribozomal A bölgesinden P bölgesine yer değiştirmesi durmaktadır. Sonuç olarak, ribozomal A bölgesi serbest hale geçememektedir. Böylece, peptid zincirinin uzaması engellenmiş olur (15).

Protein sentezi, hücrede enerji (ATP) tüketiminin yüksek olduğu temel süreçlerden biridir. ATP kullanımının yaklaşık %99'u protein uzama basamağında gerçekleşmektedir. Besin ve enerji azlığı durumunda hücrenin enerji kullanımını en aza indirmesi gerekmektedir (9). Bu yol ile stres koşullarında normal hücrenin sağkalımı sağlanmaktadır. Kanseri hücrelerinde ise, eEF2K aktivitesinin artmasıyla birlikte hücrelerin stres koşullarına adaptasyonu ve tedaviye karşı direnci gelişmektedir. eEF2K aktivitesi düşük olan ve stres koşullarına adapte olamayan kanser hücreleri apoptoza uğramaktadır (16, 17).

eEF2K aktivasyonunda rol oynayan yolak proteinlerinin mutasyonu veya inaktivasyonu sonucu, kanser hücrelerinin stres koşuluna yönelik adaptasyon mekanizmaları bozulmaktadır (17). Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde, eEF2K'nın susturulmasından sonra doksorubisine olan direncin azaldığı belirtilmektedir. Buna göre eEF2K inhibisyonu ve doksorubisin kombinasyonunun, tek başına doksorubisin uygulamasına oranla daha etkili terapötik sonuç sağladığı belirtilmektedir (18). Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde, miR-603 ekspresyonunun eEF2K aktivasyonunu durdurarak tümör gelişimini baskıladığı gösterilmektedir (19). Yapılan çalışmalar, eEF2K'nın kanser hücrelerinde hedeflenmesinin tedaviye yönelik önemli bir terapötik hedef olabileceğine işaret etmektedir (20, 21).

Normal hücrelerde PI3K/Akt sinyal yolağı, hücrenin biyolojik ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde kontrollü çalışmaktadır. Kanseri hücrelerinde ise, bu yolağın kontrolsüz aktivasyonu sonucunda hücre içerisinde metabolik işlevlerde adaptasyon mekanizmaları gerçekleşmektedir. Kontrolsüz çoğalan kanseri hücrelerinde, enerji kaynaklarının sınırlı veya yetersiz hale gelmesi sebebiyle, PI3K/Akt/mTOR aracılı protein sentezi azalmakta ve bu durum hücreye sağkalım avantajı sağlamaktadır. eEF2K protein aktivasyonu, bu adaptasyon sürecinde rol oynayan önemli bir onkojenik proteindir (10, 22). HER2 ekspresyonu olan meme kanseri hücrelerinde, PI3K/Akt onkojenik sinyal yolağının sürekli aktivasyonu hücrelerin proliferasyonunu ve sağkalımını arttırmaktadır. PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu, eEF2K aktivitesini inhibe etmektedir. Bu yol ile hücrelerin protein sentezi hızlanmaktadır. Diğer meme kanseri alt tiplerine oranla HER2 ifadesi ve proliferasyon kapasitesi yüksek olan meme kanseri hücrelerinin, hücre döngüsünü arttırmaya yönelik bir uyarımı olması gerektiği gibi, stres koşulundan kurtulması için aynı zamanda protein sentezini baskılaması gerekmektedir. HER2 ekspresyonu olan kanseri hücrelerinde eEF2K'nın ekspresyon düzeyi ve aktivitesi henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada, HER2 monoklonal antikor olan trastuzumab ile inkübe edilmiş, HER2 ifadesi olan BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 meme kanseri hücre dizilerinde, PI3K/AKT onkojenik sinyal yolağı ve eEF2K protein aktivasyonu arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

2018 yılı Küresel Kanseri İstatistik verilerine (GLOBOCAN) göre, 36 kanser türü arasında meme kanseri insidansı kadınlar arasında birinci, genel sıralamada ise yaklaşık 2,1 milyon yeni vaka sayısı ile ikinci sırada yer almaktadır. Tüm kanser ilişkili ölümlerin %6,6'sını meme kanserinden oluşturmaktadır. 2018 GLOBOCAN verilerine göre toplamda 185 ülkenin 154'ünde kadınlar arasında en sık görülen kanser türünün meme kanseri olduğu paylaşılmaktadır. Ülkelere göre belirtilen veriler Düşük/Orta ve Yüksek/Çok yüksek insani gelişmişlik indeksi olarak kategorize edildiğinde, Yüksek/Çok yüksek insani gelişmişlik indeksi kategorisine dahil olan ülkelerde meme kanseri insidansı daha yüksek olarak görülmektedir. Bu durumun, erken menarş, geç menapoz, nuliparite veya ileri yaş hamilelikleri, eksojen hormon alımı, alkol tüketimi ve obezite gibi bilinen risk faktörlerinden kaynaklı olabileceği belirtilmektedir (23). Tüm bu tetikleyici faktörlere ilaveten, aile öyküsü ve genetik aberasyonların meme kanseri riskini arttıran majör etkenler olduğu bilinmektedir (24). Ailesel meme kanseri öyküsü olan kişilerin, genel popülasyona oranla meme kanseri patogeneze yatkınlığı daha fazladır. Bu durum, meme kanseri gelişiminde rol oynayan duyarlı genetik varyasyonlar ile açıklanabilmektedir (25).

Genetik duyarlılık açısından meme kanseri, kalıtsal ve sporadik olmak üzere iki şekilde gelişmektedir (26). Kalıtsal olarak gelişen genetik aberasyonların başında, DNA onarım genleri olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinde oluşan mutasyonlar gelmektedir. BRCA1, 17. kromozomda (17q21), BRCA2 ise 13. Kromozomda (13q13) lokalize olan, DNA onarımından sorumlu ve mutasyonu sonucu meme kanseri gelişiminde majör rol oynayan kanser yatkınlık genleridir. Tek başına bu iki gen bölgesinde oluşan mutasyonlar sonucu meme kanseri oluşma riski %25 oranında artmaktadır (26-28). BRCA1/BRCA2 mutasyonu olan meme kanseri vakaları ile BRCA mutasyonu olmayan (BRCAx) meme kanseri vakaları patolojik açıdan

karşılaştırıldığında, BRCA mutasyonu taşıyan meme kanserleri pleomorfik, tübüler yapı ve agresif karakter göstermektedir (29).

Meme kanseri gelişiminde rol oynayan, TP53 tümör baskılayıcı gen mutasyonu bir diğer önemli risk faktörüdür. Aynı zamanda, TP53 mutasyonu *Li-Fraumeni Sendromunun* (LFS) primer sebebidir. LFS'lu kişilerin, meme kanseri gelişimine yatkın olmasının yanı sıra, diğer kanser türlerine gelişimine de yatkın oldukları bilinmektedir. TP53 mutasyonu sonucu özellikle HER2+ meme kanseri alt tipi insidansının arttığı ve bu durumun HER2 ve TP53 genlerinin aynı kromozomda (17. kromozom) lokalize olmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Aynı zamanda TP53 mutasyonu sonucu, p53 fonksiyonel özelliğini kaybetmekte ve HER aracılı sinyal iletim yolak aktivasyonu süreklilik kazanmaktadır. Bu sebepten ötürü, hücrelerin tedaviye yönelik direnç gösterdiği bilinmektedir (30-32).

Sporadik meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen ve moleküler düzeyde heterojenitesi yüksek olan hastalıkların başında gelmektedir (33). Histolojik olarak meme kanseri non-invasif ve invazif olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Non-invasif grup duktal karsinoma in-situ (DCIS) ve lobüler karsinoma in-situ (LCIS) olmak üzere iki sınıfa, invazif veya diğer adıyla infiltratif grup DCIS sınıfından gelişen invazif duktal karsinoma (IDC), LCIS sınıfından gelişen invazif lobular karsinoma (ILC), medullar karsinoma, müsinöz karsinoma ve tübüler karsinoma olmak üzere beş farklı sınıfa ayrılmaktadır (34, 35). Histolojik sınıflandırmaya göre meme kanserlerinin yaklaşık %75'i invazif grupta ve benzer oranda IDC sınıfında yer almaktadır (33, 36). Konvansiyonel moleküler meme kanseri sınıflandırması ER (Östrojen Reseptörü = Estrogen Receptor), PR (Progesteron Reseptörü) ve HER2 (İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2) moleküler belirteçleri baz alınarak, Luminal A (ER+, PR+, HER2-), Luminal B (ER+, PR+, HER2+), HER2+ (ER-, PR-, HER2+) ve Bazal Benzeri (= Üçlü negatif, ER-, PR-, HER2-) olmak üzere 4 temel alt tipe ayrılmaktadır (3, 37). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde, adipoz doku gen ekspresyon profiline sahip normal benzeri meme kanseri (38), epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT)

belirteçlerinin varlığına göre sınıflandırılan kanser kök hücresi fenotipine benzer özelliklere sahip *claudin-low* (39), androjen reseptör varlığına göre sınıflandırılan moleküler apokrin (40) ve interferon regülasyonunu sağlayan gen ifadelerinin varlığına göre sınıflandırılan interferon-ilişkili meme kanseri (41) olmak üzere 4 yeni alt tip eklendi. Meme kanserleri vakalarında %60-65 oranında hormon reseptör pozitifliğine rastlanmaktadır. Bu durum hormonal tabanlı terapötiklerin uygulanabilmesi için uygun olmaktadır. İkincil en yüksek oran olarak %15-20 oranında HER2+'lık ile karşılaşılmaktadır. Bu durum, HER2'ye yönelik bir terapi uygulanması imkanını sağlamaktadır. Ancak, geri kalan %15-20 oranında meme kanseri vakasında, hormon reseptörü ve HER2 açısından negatiflik (üçlü-negatif) görülmektedir. Bu durum, uygun terapi kullanabilme ihtimalini ortadan kaldırmaktadır (42).

2.2. Reseptör Tirozin Kinazlar ve HER2+ Meme Kanseri

Reseptör tirozin kinazlar (RTK) hücre membranında yer alan ve yaklaşık 60 farklı proteinin bulunduğu bir reseptör ailesidir (43, 44). Fonksiyonel olarak hücre proliferasyonu, büyümesi, sağkalımı ve döngüsü gibi çeşitli biyolojik cevapların regülasyonunda önemli rol oynamaktadır (45). Yapısal olarak hücre dışı domaini, transmembran domain ve hücre içi domain olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır. Hücre dışı domain, Ig-benzeri (immünoglobulin-benzeri) domain, sisteinden zengin domain veya lösinden zengin motiflerden oluşmakta ve aynı zamanda reseptörün ligand ile etkileştiği bölgeyi içermektedir. Transmembran domain, α heliks yapısında bir zincirden oluşmaktadır. Hücre içi domain ise tüm reseptörlerde ortak olan ve fosforilasyonu ile hücre içi protein aktivasyonunu gerçekleştiren tirozin kinaz katalitik bölgelerinden oluşmaktadır (44, 46).

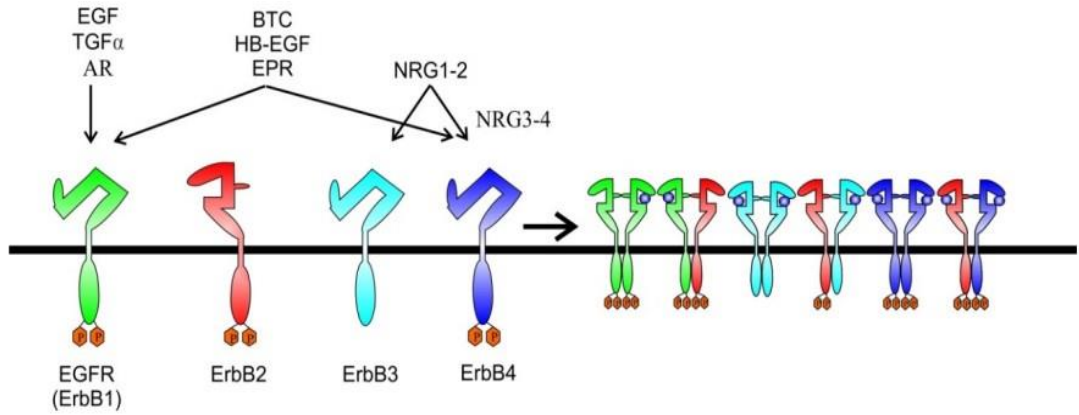
Büyüme faktörleri ve reseptör tirozin kinazlar, hücrenin proliferasyonu ve sağkalması için ihtiyaç duyduğu vital sinyal aktivasyon mekanizmasının majör komponentleridir. Reseptör tirozin kinaz ailesine ait reseptörün spesifik polipeptit ligandı ile bağlanması sonucu çoğu reseptörün dimerizasyonu tetiklenmektedir. Dimerize olan reseptörler tirozin kinaz katalitik domaininde kinazlara özgü olan *activation loop* üzerinden karşılıklı fosforilenmelerini

(transfosforilasyonu) sağlamaktadır. Reseptörlerin fosforilasyonu sonucu kinaz aktivasyonu gerçekleşmiş olur. Bazı durumlarda ise, dimerizasyon sonrası direkt olarak allosterik düzenleme sonucu kinaz aktivasyonu gerçekleşmektedir (44, 47). Hücre içerisinde SH2 (Src homology 2 = Src Homolog Domaini) ve/veya PTB (Phosphotyrosine-binding = Fosfotirozin-bağlayıcı Domain) domainine sahip proteinler, aktive olan reseptörlerin fosforile tirozin bölgelerine bağlanarak reseptöre özgül sinyal iletim yolağını aktive etmektedir. RAS/MAPK, PI-3K/AKT/mTOR ve JAK/STAT yolları RTK aracılı sinyal yolları aktivasyonlarına örnek olarak verilebilir. Fizyolojik koşullar altında sinyal yolağı aktivasyonları, çeşitli geri bildirim mekanizmaları sayesinde fosfatazlar aracılığıyla sonlandırılmaktadır. Bu sayede hücre içi serbest enerji ve biyokimyasal denge korunmuş olur. Ancak kanser gelişimi gibi çeşitli patofizyolojik koşullar altında sinyal yollarının deregülasyonu sonucu kontrolsüz ve sürekli aktivasyonlar gerçekleşebilmektedir (48, 49). Genel olarak karsinogenez sürecinde işlev kazanımı (gain-of-function) mutasyonları, genomik amplifikasyon, kromozomal yeniden düzenlemeler ve/veya otokrin aktivasyon olmak üzere dört farklı mekanizma sebebiyle hücrede kontrolsüz ve sürekli RTK aktivasyonu oluşabilmektedir (47, 50, 51). Meme kanserinde en sık karşılaşılan RTK irregülasyonları, EGFR tirozin kinaz ailesinde gözlemlenmektedir (52).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER=ErbB) ailesi dört üyeden oluşur. Bunlar; EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) ve HER4 (ErbB4)'tür. Meme kanserinde HER ailesi kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. HER ailesi reseptörleri meme ve akciğer kanserleri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinde yüksek ekspresyon ve aktivasyon göstermektedirler. Yaklaşık olarak her 5 meme kanseri vakasından biri HER2 yönünden pozitiflik göstermektedir (53).

HER2/neu geni 17. kromozomda lokalize olmakta ve ligand bağlanma alanı olmayan bir transmembran tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörünü kodlamaktadır. HER2/neu gen amplifikasyonu meme kanserlerinin %30'unda (Luminal B ve HER2+) görülmektedir. Normal bir hücre yüzeyinde yaklaşık yüz

bin HER2 reseptörü bulunurken bu sayı bir meme kanseri hücresinde tahmini olarak iki milyona kadar çıkmaktadır (54). HER2+ meme kanserinde yüksek düzeyde anöploidi, TP53 mutasyonu gibi somatik mutasyonlar, FGFR (Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü), EGFR, CDK4 (sikline bağımlı kinaz-4) ve siklin D1 amplifikasyonları sıklıkla birlikte bulunmaktadır (5). HER2 aşırı ekspresyonu, meme kanserinde kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. HER2 reseptörü kendisiyle homodimerizasyon veya HER1, HER3 veya HER4 ile heterodimerizasyon yapabilmektedir. Diğer iki reseptörün aksine HER2'nin bilinen bir ligandı bulunmamaktadır. HER3'ün ise kinaz domaini aktivasyon gösterememektedir (55-57). HER3 reseptörü C-terminalinde, adaptör proteinlerin bağlanması için mevcut altı fosfo-tirozin bölgesi bulunmaktadır. Ancak adaptör proteinlerin HER3'ün kinaz alanına bağlanmasına rağmen, kinaz domain defekti olması sebebiyle reaksiyonu katalitik olarak devam ettirememektedir. Yine aynı sebepten ötürü HER3 homodimerizasyonu hücre içi sinyal yollarını aktive edememektedir (58). Bu iki defektten ötürü, HER2/HER3 heterodimerizasyonunun hücre içi sinyal yolağı aktivasyonunu diğer dimer yapılarına oranla daha kuvvetli uyardığı belirtilmektedir (59, 60) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Reseptör tirozin kinaz ailesi ve dimer yapıları (Hervent A.S. ve De Keulenaer G.W., 2012'den (61) uyarlandı.)

HER2+ meme kanseri alt tipi kötü prognoz göstermekte ve sistemik sitotoksik tedavilere karşı farklı cevaplar verebilmektedir. İleri evreli tümörlerde, PI3K aşırı aktivasyonu ile karakterize edilebilmektedir. HER2+

tümörlerin erken evrede, tümörün lenfatik infiltrasyonu iyi prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Düşük lenfatik infiltrasyon ise tümörün daha agresif bir karaktere sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, düşük lenfatik infiltrasyon ile PI3K sinyal yolağı ve IGF1R ifadesinin artması ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (62).

HER2 aracılı sinyal aktivasyonu temel olarak, PI3K (fosfoinositid 3-kinaz)/AKT (protein kinaz B)/mTOR (*mechanistic target of rapamycin*=*mammalian target of rapamycin*) ve RAS (*rat sarcoma*)/RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*)/MAPK (mitojenle aktive edilmiş protein kinaz) sinyal yolağı üzerinden regüle etmektedir (33). Bu yollar HER aracılı temel onkogenik sinyal yolları olarak isimlendirilmektedir. Kanseri hücrelerinde büyüme faktörü reseptörlerinde, aşırı ligand üretimi, fonksiyon kazanımı mutasyonları, aşırı ifade ve/veya gen amplifikasyonu gibi yapısal değişiklikler oluşabilmektedir. Bu yapısal değişiklikler, onkogenik sinyalin sürekli olarak aktive olmasına yol açabilmektedir. Bunun sonucunda ortaya çıkan kontrolsüz proliferasyon, sağkalım, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi biyolojik yanıtların artmasıyla birlikte kanser progrese olmaktadır (63, 64).

2.3. PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı

2.3.1. PI3K (Fosfatidil İnozitol 3 Kinaz)

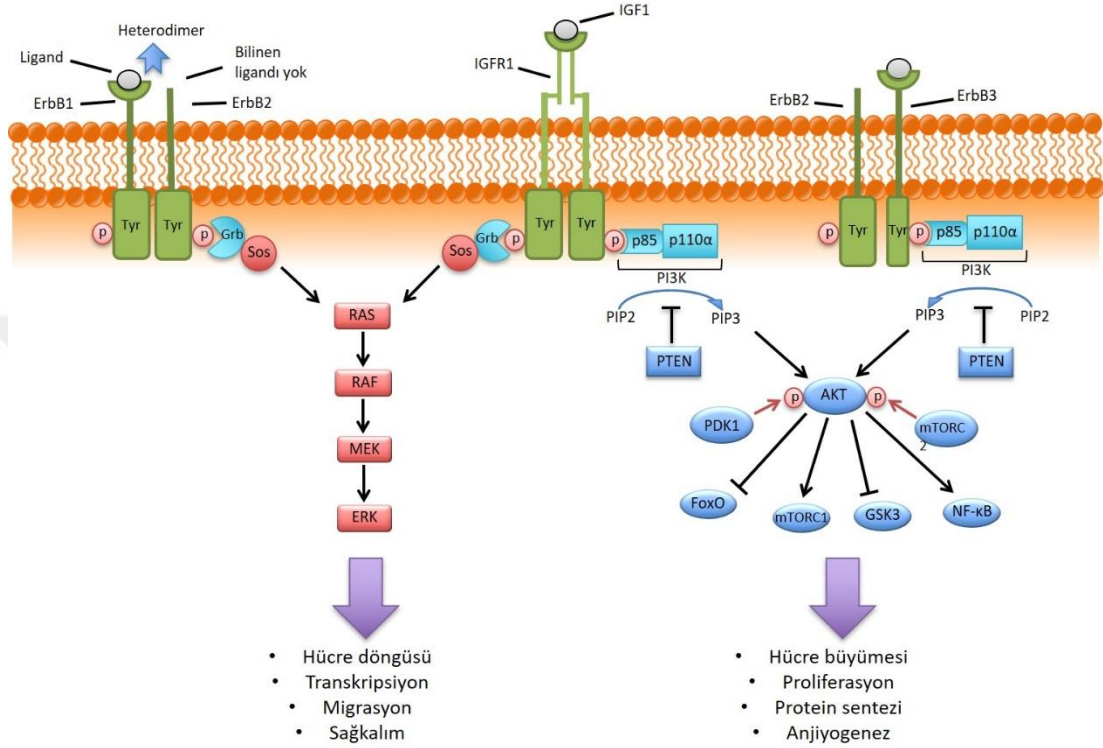
PI3K (Fosfatidil inositol-3-kinaz) p85 düzenleyici ve p110 katalitik olmak üzere iki farklı alt birimlerinden oluşan, heterodimerik yapıya sahip bir kinazdır. Fonksiyonel olarak PI3K, hücre zarında bulunan fosfatidil inozitollerin fosforilasyonundan sorumludur. Aktivasyonu genel olarak hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından indüklenmektedir. Biyolojik olarak regülasyonu, hücre iskelet yapısının düzenlenmesini, hücre proliferasyonunu ve büyümesini sağlamaktadır (65, 66).

PI3K, direkt veya indirekt olarak aktive olabilmektedir. Direkt aktivasyonda, PI3K'nın p85 düzenleyici alt biriminde bulunan SH2 domaini RTK aktivasyonu sonucu YxxM (tirozin-x-x-metionin) motifi üzerinde

fosforillenen tirozin rezidüsüne bağlanmakta ve PI3K katalitik alt birimi olan p110 alt biriminde bulunan p85 bağlanma domain ile p85 alt biriminde bulunan ISH2 domaini bağlanarak tam aktivasyonu sağlamaktadır. İndirekt aktivasyonda ise, RTK aktivasyonu sonrası Grb2 veya IRS 1/2 gibi adaptör proteinlerin SH2 domainlerinin RTK'daki fosfotirozin bölgelerine bağlanmasıyla birlikte aktivasyonu gerçekleşmektedir. Fosforile olan adaptör proteinlerine PI3K'nın önce p85 düzenleyici alt birimi, devamında p110 katalitik alt birimi, p85 alt birimi ile etkileşmektedir. Her iki etkileşim sonucunda PI3K'ın tam aktivasyonu gerçekleşmiş olur. PI3K aktivasyonu hücre zarında bulunan PIP2'nin (Fosfatidilinositol 4,5-difosfat) fosforillenerek PIP3 (Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat)'e dönüşümünü sağlamaktadır. PIP3 fonksiyonel olarak, Akt (Protein kinaz B) proteini gibi PH (Plekstrin homoloğu) domainine sahip proteinlerin membrana çağrılmasını uyarmakta ve PH domaininin PIP3 ile etkileşerek proteinlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. Fizyolojik koşullar altında, PTEN (Fosfataz ve tensin homoloğu) PIP3'ün 3' pozisyonunda bulunan fosfatın kesilmesini ve PIP3-PIP2 dönüşümünü sağlamaktadır. Bu sayede, PI3K aracılı sinyal aktivasyonu inhibe olmakta ve PH domainine sahip proteinlerin aktivasyonları baskılanmaktadır. PI3K inaktif olduğu durumda p110 alt biriminin helikal domaini ile p85 alt biriminin nSH2 domainine bağlı olarak bulunmaktadır. p85 alt biriminin SH2 domaini bu sayede kapalı (inaktif) konumda bulunmaktadır (67-71).

Çeşitli kanser türlerinde özellikle meme kanserinde %20-25 oranında, PIK3CA geninin katalitik alt birimi olan p110a ve/veya PTEN mutasyonuna rastlanılmaktadır. p110'un fonksiyon kazanımı mutasyonu (*gain-of-function*) PI3K'ın sürekli olarak aktivasyonuna, PTEN'in fonksiyon kaybı mutasyonu (*loss-of-function*) ise PI3K aracılı sinyal yolağının baskılanamamasına yol açabilmektedir (72, 73). E542K, E545K ve H1057R mutasyonları yaygındır ve PI3K, RTK aktivasyonuna gerek kalmadan sürekli onkojenik aktivite kazanır. PI3KCA mutasyonu, meme kanserinde östrojen ve progesteron reseptörü (ER/PR) durumu, lenf düğümü metastazı ve HER2 aşırı ekspresyonu ile birlikte PTEN kaybıyla ilişkilendirilebilir. Bu durum, kanser hücrelerinin sürekli olarak proliferasyonuna, büyümesine ve çeşitli ilaçlara karşı direnç

göstermesine sebep olmaktadır. Ek olarak, çeşitli meme kanseri vakalarında yabancıl tip PTEN'in ifadesinin düşük olduğu, PTEN ifadesi düşük olan vakaların kanser progresyonunun daha agresif olduğu belirtilmektedir (74-76) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. RTK aracılı PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı aktivasyonu (Gedik M.E ve Doğan A.L., 2019'dan (77) uyarlandı.)

2.3.2. Akt (Protein Kinaz B)

Akt (protein kinaz B=PKB) glikoz metabolizması, apoptoz, anjiyogenez, hücre proliferasyonu ve protein sentezi gibi birçok biyolojik süreçlerde anahtar rol oynayan bir serin/treonin protein kinazdır. Yapısal olarak, N-terminalde membran ile etkileşimi sağlayan PH domaini, sırası ile orta ve C-terminal bölgelerinde fosforilasyon ve aktivasyonu sağlayan katalitik kinaz domaini ve düzenleyici domaini bulunmaktadır. Hücrenin uyarılmadığı veya sinyal yolağının inaktif olduğu koşulda Akt proteini sitozolde bulunmaktadır. Yolağın stimülasyonu ile birlikte Akt proteininin yaklaşık 100 amino asitten oluşan PH domaini aracılığıyla hücre membranı ile etkileşimi gerçekleşir. Devamında,

PDK1 (Fosfo bağımlı kinaz 1) tarafından Akt katalitik domaininde bulunan treonin308 (T308) rezidüsünün fosforilasyonu gerçekleşmektedir. Katalitik bölgenin fosforilasyonu, düzenleyici bölgede bulunan serin473 (S473) rezidüsünün otofosforilasyonunu tetikleyebilmektedir. Ek olarak, düzenleyici bölgedeki S473 rezidüsü mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) aracılığıyla da fosforile edilebilmektedir. Akt proteininin tam aktivasyonu için her iki bölgeden fosforile olması gerekmektedir. PHLPP (PH domaini ve zengin lösin tekrarı protein fosfataz) fosfatazlar aracılığıyla Akt proteininin inaktivasyonu gerçekleşmektedir (78, 79). Akt proteininin Akt1, Akt2 ve Akt3 olmak üzere 3 farklı izoformu bulunmaktadır. Bu izoformları kodlayan genler ise sırasıyla AKT1, AKT2 ve AKT3'tür.

Akt aktivasyonu sonucu hücre proliferasyonunu regüle eden proteinler olan GSK-3 (Glikojen sentez kinaz-3), GLUT4 (*membrane translocation of the glucose transporter*), siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (p21, p27), mTOR ve TSC2 (tüberoz skleroz kompleksi) aktivasyonları gerçekleşmektedir. Akt'ın siklin bağımlı kinazları fosforilasyonu ile birlikte, siklin bağımlı kinazların sitozolde kalması ve nükleusa translokasyonu baskılanmış olur. Bu sayede, siklinler aracılı hücre proliferasyonu indüklenmiş olur. Akt aracılı mTOR aktivasyonu translasyonel düzenleyici proteinleri olan p70S6K (p70 ribozomal protein S6 kinaz) ve 4EBP1 (ökaryotik başlatma faktörü 4E bağlayıcı protein 1) sayesinde protein sentezi indüklenir. Ayrıca hücre büyümesini regüle eden ve tümör baskılayıcı fonksiyona sahip TSC2 proteininin fosforilasyonu sonucu fonksiyonel inhibisyonu hücrenin büyümesini destekleyici bir diğer mekanizmadır (65, 80, 81).

Sekiz farklı tümör tipinden 450 tümör örneğinde PI3K/Akt yolağı ve bu örneklerin %55'inde Akt aktivasyonlarının yüksek olduğu rapor edilmektedir. Meme, pankreas, over, baş ve boyun kanserlerinde Akt kinazları kodlayan genlerin aktive edici mutasyonları rapor edilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde AKT1 PH domainindeki E17K mutasyonu, hücre içi sinyal yolağının sürekli ve kontrolsüz olarak stimule olmasına neden olmaktadır. Bu sonuçlar, Akt

aktivitesinin ilaç direncinden, tümör gelişimi ve büyümesinin sorumlu olduğunu göstermektedir (82-84).

2.3.3. mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*)

mTOR, mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) olarak bilinen iki farklı protein kompleksinin katalitik alt birimini oluşturan PI3K ile ilişkili kinaz (PIKK) ailesine ait serin/treonin protein kinazdır. mTORC1, yapısal olarak 3 kor proteinden oluşmaktadır. Bunlar, mTOR, Raptor (mTOR ile ilişkili düzenleyici protein) ve mLST8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*)'dir. Raptor, mTORC1 aktivasyonundan sorumlu diğer bir önemli adaptör proteindir. mLST8, mTORC1'in katalitik domaini ile etkileşmekte ve kinaz aktivasyonunu stabilize etmektedir. mTORC1 aktivasyonunu inhibe eden iki farklı düzenleyici protein bulunmaktadır. Bunlar; PRAS40 (40 kDa'lık prolin bakımından zengin Akt substratı) ve DEPTOR (mTOR etkileşimli protein içeren DEP domaini)'dur. PI3K/Akt yolağının aktivasyonu ile birlikte, yolağın *downstream*inde bulunan mTORC1 stimüle olmakta ve böylece protein sentezi ve hücre büyümesi yanıtı oluşmaktadır. mTORC1'den farklı olarak mTORC2, aktivasyonundan sorumlu Rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*) adaptör proteinine sahiptir. Ek olarak, mSin1 ve Protor1/2 düzenleyici proteinleri ile etkileşmektedir. mTORC2, Akt proteininin düzenleyici bölgesinin S473 rezidüsünü fosforilleyerek ve tam aktivasyonunu sağlayarak PI3K/Akt yolağını regüle etmektedir (85-88).

Hereditör kanserlerin, mTOR'un negatif düzenleyici proteinleri olan TSC1-TSC2 ve LKB1 (*serine-threonine kinase liver kinase B1*)'in mutasyonları sonucu mTOR aktivitesinin baskılanamamasıyla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Sporadik kanserlerde ise, mTORC1'in *downstream*inde bulunan ve hücre proliferasyonundan sorumlu olan 4E-BP1 proteinin deregülasyonu ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir. Ek olarak, mTOR sinyalini regüle eden *upstream* proteinlerinin mutasyonları indirekt olarak mTOR aracılı sinyallerin sürekli aktivasyonlarını indükleyebilmektedir. Örnek olarak, mTORC1'in yağ asidi sentaz enzimlerini indirekt olarak regüle ettiği ve bunun

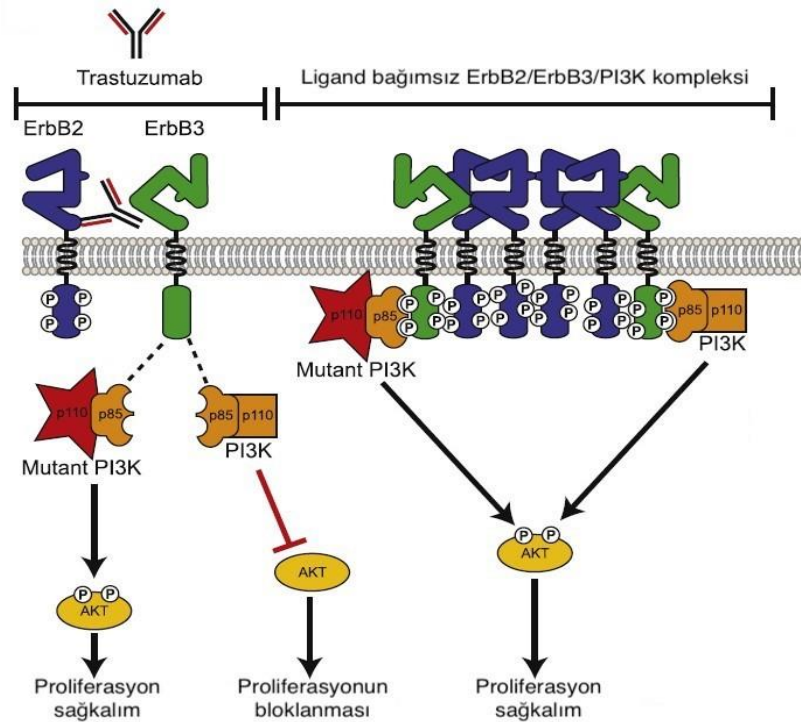
lipit biyogenezindeki deregölasyon sonucu kanser hücrelerinin proliferasyonu ile ilgili olduğu belirtilmektedir (89, 90).

Kanser hücrelerinde PI3K/Akt/mTOR yolağı sıklıkla deregölasyona uğramaktadır. Meme kanserinde PI3K/Akt/mTOR yolağının terapötik olarak hedeflenmesi umut vaat eden sonuçlar vermesine karşın, yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinin geliştirilen yeni tedavi stratejilerine karşı direnç geliştirebildiklerini göstermektedir.

2.4. HER2+ Meme Kanseri Tedavi Stratejileri ve Gelişen Direnç Mekanizmaları

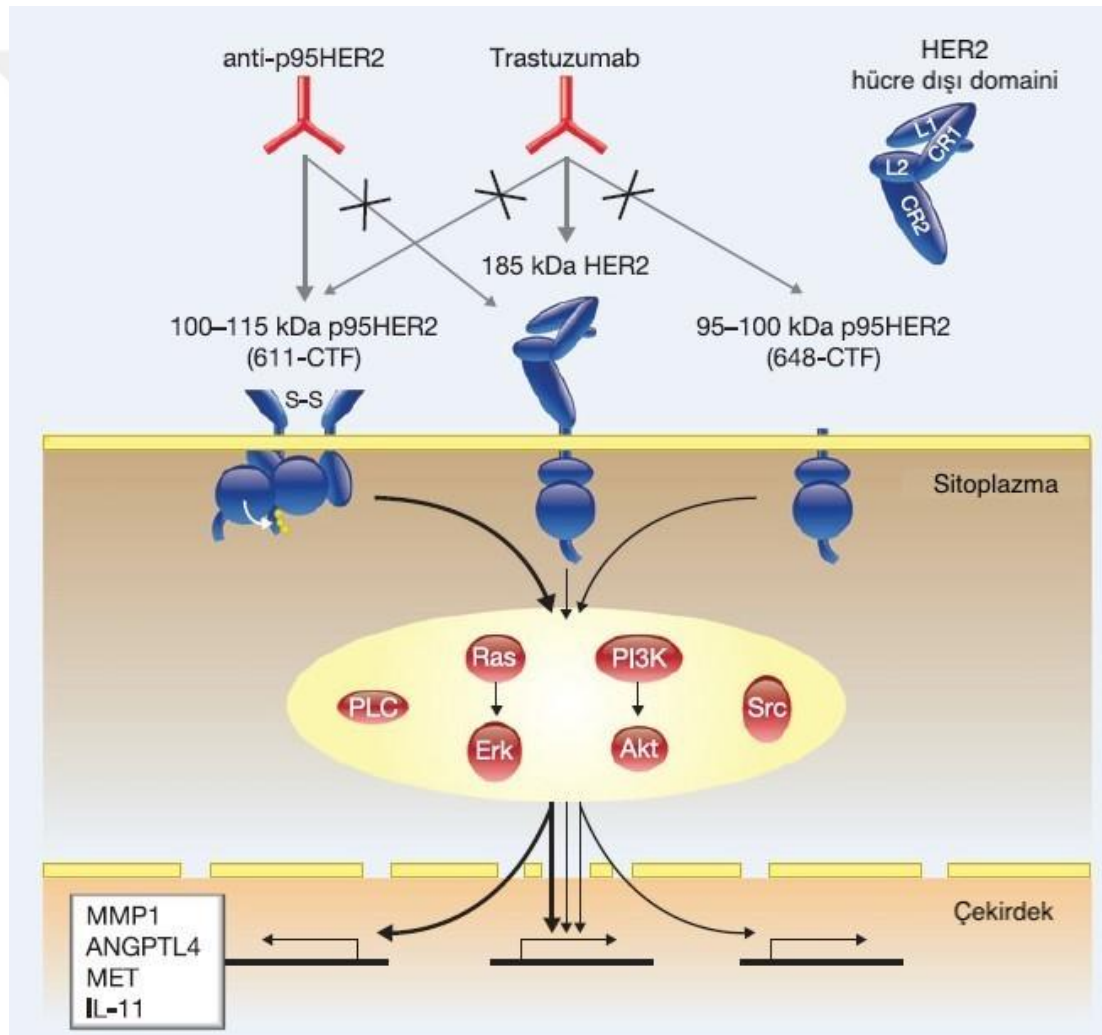
Meme kanseri standart tedavi yöntemi olarak cerrahi, hormon tedavisi, sistemik kemoterapi ve/veya radyoterapi seçenekleri kullanılmaktadır (91). Yeni nesil tedavi yöntemleri arasında hedefe yönelik monoklonal antikolar, küçük molekül inhibitörleri ve immünoterapiler bulunmaktadır (92). HER2+ meme kanserine yönelik, anti-HER2 antikoları (trastuzumab ve pertuzumab gibi) ve küçük molekül tirozin kinaz inhibitörleri (lapatinib ve neratinib gibi) dahil olmak üzere HER2 hedefli tedavi stratejileri geliştirilmektedir. HER2'nin hücre dışı ligand bağlanma bölgesini hedefleyen bir monoklonal antikor olan trastuzumab, ilk olarak 1998 yılında klinik olarak metastatik meme kanseri tedavisinde kullanımı FDA tarafından onaylandı. Yapılan randomize çalışmalar, HER2+ meme kanseri adjuvant kemoterapiye ek olarak 1 yıllık trastuzumab kullanımının hastalıksız ve genel sağkalımı arttırdığını göstermektedir. Günümüzde, yüksek riskli HER2+ meme kanseri olan hastalarda, standart tedaviye HER2 dimerizasyon bölgesini hedefleyen pertuzumab gibi monoklonal antikolarla birlikte veya lapatinib, neratinib ve tucatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleriyle kombine kullanımına yönelik çeşitli faz çalışmaları yapılmaktadır (93-95). Ek olarak, mevcut anti-HER2 ajanları ile PI3K, CDK4 ve CDK6 inhibitörleri, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve mTOR'u hedefleyen terapötik ajanlar veya immünoterapötikler (örn., Anti-PD-L1 antikoları) ile kombinasyonlarının prelinik çalışmaları yapılmaktadır (96-100).

Uygulanan tedavi stratejilerinin başarılı olmalarına rağmen bazı kanser türlerinde tedaviye karşı direnç gelişmekte ve prognoz kötüye evrilmektedir (101). HER2+ meme tümörlerinde kullanılan HER2 monoklonal antikoru olan trastuzumabın bazı HER2+ tümörlerde belli bir zaman sonra direnç oluşturduğu belirtilmektedir. HER2 ve HER3'ün hücre dışı domainindeki mutasyonlar sonucu tümör hücrelerinin onkojenik potansiyeli artabilmektedir (102). Oluşan bu mutasyonlar ve HER2 ifadesinin aşırı ekspresyonu tümör hücrelerinde liganddan bağımsız HER2/HER3 heterodimerizasyonunun oluşumuna ve hücre içi PI3K yolağının sürekli aktivasyonuna yol açabilmektedir (103, 104). Ek olarak, PI3K'nın katalitik alt birimini kodlayan gen olan PIK3CA'nın aktive edici mutasyonları, büyüme faktörü reseptörüne ligand bağımsız bağlanarak sinyal yolağının aktive olmasına yol açabilir. Öte yandan, PTEN tümör baskılayıcı genin mutasyon ve/veya delesyonu yoluyla inaktivasyonu, meme kanseri dahil çeşitli tümör türlerinde yaygın olarak tespit edilmektedir. PTEN kaybı, membranda PIP3 birikimine neden olur, böylece PI3K/Akt yolağı sürekli olarak aktive olabilmektedir (31, 105, 106) (Şekil 2.3).



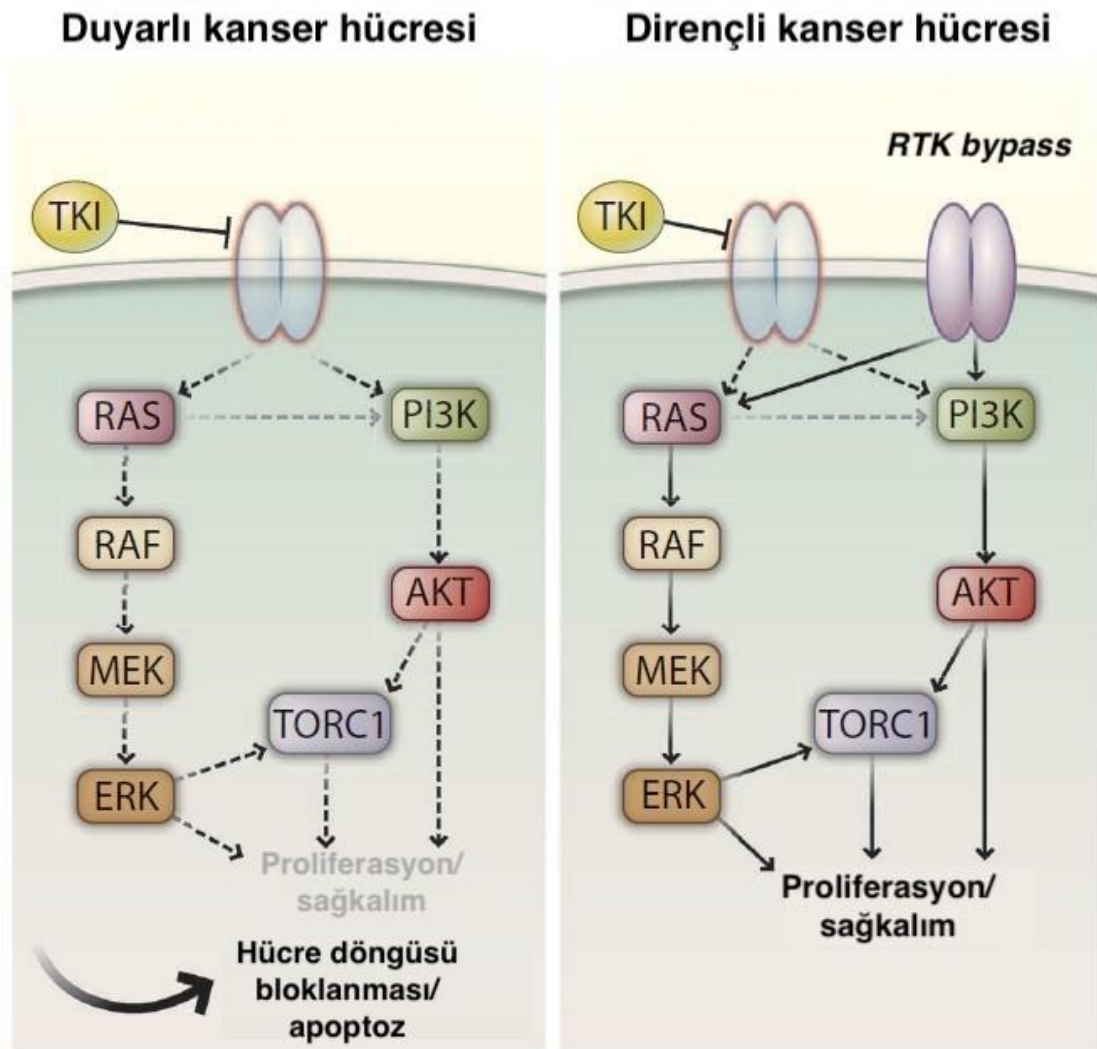
Şekil 2.3. Direnç mekanizması: Ligand bağımsız sinyal aktivasyonu (Hynes N.E. ve Dey J.H., 2009'dan (31) uyarlandı.)

Bir diğer direnç mekanizmasının, HER2 reseptörünün ekstraselüler bölgesinin trunkasyona uğraması sonucu p95HER2 varyantına dönüşmesi olduğu belirtilmektedir. Hücre dizileri üzerinde yapılan prelinik çalışmalarda bu mekanizmanın HER2 aracılı sinyal yolağı molekülleri olan PTEN, PI3K, mTOR, MAPK ve VEGF genleri kaynaklı olduğu belirtilmektedir. Ancak doku örnekleri ile yapılan çalışmalar sonucunda, AKT, IGFR1, p27 Kip1 ve MUC4 genlerinin disregüle oldukları, özellikle PTPN11 geninin trastuzumab inkübasyonu sonucu en fazla genetik değişikliğe uğrayan molekül olduğu belirtilmektedir (5, 107, 108) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Direnç mekanizması: p95 HER2 aracılı sinyal aktivasyonu (Arribas J. ve ark., 2011'den (108) uyarlandı.)

Kanser hücrelerinin tedaviye karşı direnç gelişimine yol açan direnç mekanizmalarından biri ise, *bypass* mekanizmasıdır. Yabancı tip reseptör tirozin kinaz moleküllerine sahip kanser hücrelerinin hedefli tedavilere karşı duyarlı olduğu ve etkin tedavi yanıtı alındığı bilinmektedir. Ancak mutant moleküllerde, uygulanan tedavi sonucu hücre içi sinyal yolağı, farklı bir tirozin kinaz uyarımı arayıcılığıyla hücre içi sinyal aktivasyonunu stimüle ederek, hücrenin sağkalımı ve büyümesini sağlayabilmektedir (109) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Direnç mekanizması: RTK *bypass* mekanizması (Niederst M. ve Engelman J.A., 2013'ten (109) uyarlandı.)

HER2 hedefli tedaviye direnç mekanizmalarına ilişkin edinilen bilgi her geçen gün artmasına rağmen direnç mekanizmaları henüz tam olarak çözümlenememiştir (110). HER2+ meme kanserinin patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, yeni tedavi strajelerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (111). Hücre içi stres koşullarına karşın aktivasyonu ile hücreye sağkalım avantajı sağlayan eEF2K'nın (Ökaryotik elongasyon faktör 2 kinaz) kanser hücrelerinde gelişen direnç mekanizmalarından biri olabileceği ve potansiyel bir hedef olabileceği belirtilmektedir. Örnek olarak, üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde, eEF2K'nın susturulmasından sonra doksorubisine olan direncin azaldığı gözlemlendi. Buna göre eEF2K inhibisyonu ve doksorubisin kombinasyonunun, tek başına doksorubisin inkübasyonuna oranla daha etkili terapötik sonuç sağladığı belirtilmektedir (18). Yapılan çalışmalar, eEF2K'nın kanser hücrelerinde hedeflenmesinin tedaviye yönelik önemli bir terapötik olacağı yönündedir (20, 21). HER2+ kanser hücrelerinde eEF2K'nın ekspresyon düzeyi ve aktivitesi henüz bilinmemektedir.

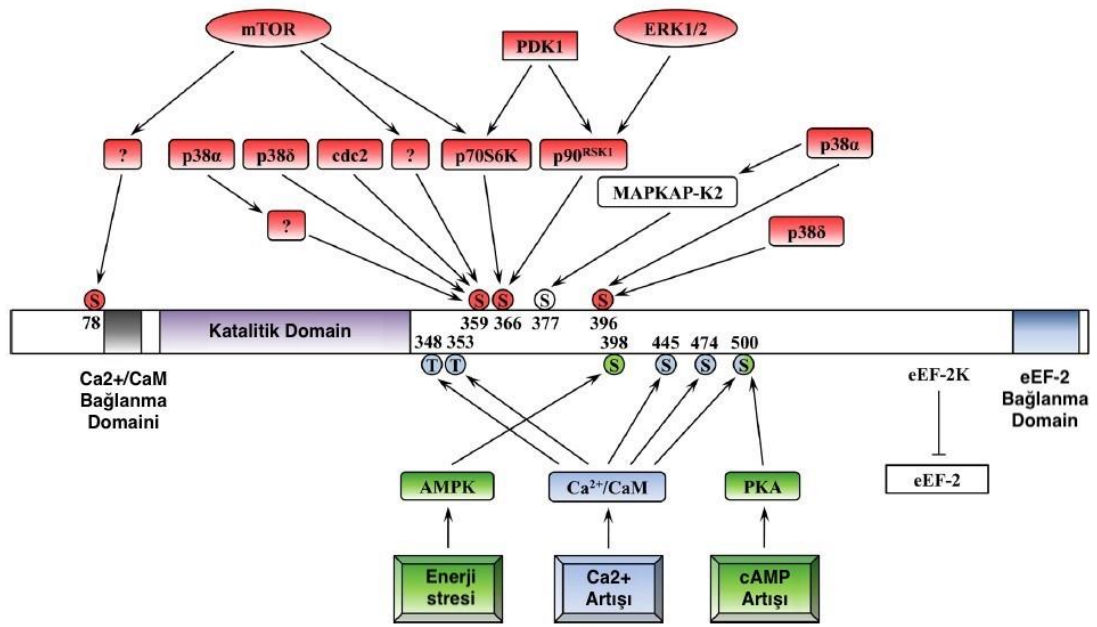
2.5. Ökaryotik Elongasyon Faktör 2 Kinaz (eEF2K) ve Ökaryotik Elongasyon Faktör 2 (eEF2)

2.5.1. Yapısal Özellikleri

Tüm hücrelerde önemli bir ikinci haberci olan kalsiyum, birçok hücre içi sinyal yolağının majör komponentidir. Hücre içi Ca^{2+} deki değişiklikler, nörotransmitter salınımı, immün hücre aktivasyonu, gen ifadesi ve hücre döngüsü dahil olmak üzere birçok biyolojik süreci düzenler (112, 113). Serbest Ca^{2+} miyozin, fosfolipaz A2 ve protein kinaz C gibi bazı proteinleri doğrudan aktive edebilmesine rağmen, birçok enzimin aktivitesini kalmodülin (CaM) gibi düşük molekül ağırlıklı Ca^{2+} bağlayıcı proteinler aracılığıyla düzenler. CaM, her C- ve N- terminal olmak üzere iki adet globüler loba sahiptir ve her lobun iki Ca^{2+} bağlama bölgesi olması sebebiyle toplamda 4 adet Ca^{2+} bağlayabilmektedir. Ca^{2+} un bağlanması, CaM'in konformasyonunu önemli ölçüde değiştirir ve Ca^{2+} /CaM'in çeşitli protein kinazlar dahil olmak üzere farklı proteinlerle interaksiyonunu sağlayabilir (114, 115). Ca^{2+} /CaM ile uyarılan

protein kinazlar, özgünlüklerine göre yalnızca bir veya az sayıda substratı fosforile eden sınırlı kinazlar ve geniş substrat spesifitesine sahip çok fonksiyonlu kinazlar olmak üzere 2 sınıfa ayrılmaktadır (112).

Ökaryotik elongasyon faktör 2 kinaz (eEF2K), diğer adı ile kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz III (CaM kinaz-III), tek bir proteini hedeflemesi (eEF2= Ökaryotik elongasyon faktör 2) sebebiyle sınırlı kinazlar kategorisinde yer almaktadır. eEF2K, 725 amino asit rezidüsüne sahip, 95-103 kDa ağırlığına sahip monomerik bir kinaz proteinidir. İnsan 16p12.2 kromozomunda yer almaktadır. eEF2 geni insan 19. kromozomunda bulunan ve 9407 bazdan oluşan bir gendir. eEF2 proteini sitoplazmada lokalize olan 857 aminoasit rezidüsüne sahip ve 95,2 kDa ağırlığa sahip bir proteindir. eEF2 molekülü domain I-II, domain III ve domain IV-V olmak üzere 3 farklı yapısal domaine sahiptir. eEF2 protein aminoasit dizisi memeliler arasında yüksek oranda (>%99) korunmuştur. eEF2K, eEF2 proteinini Thr56 rezidüsünden fosforilleyerek ribozomal elongasyonu sürecini baskılamaktadır. eEF2K, tümör hücrelerinde endoplazmik retikulum stresi aracılı otofaji ve apoptozisi kontrol eden kritik öneme sahip bir moleküldür (116, 117). eEF2K, CaM-bağlanma bölgesi bulunan N-terminal α -kinaz katalitik domaini, çeşitli fosforilasyon rezidülerinin bulunduğu *linker* domaini ve eEF2 bağlanma bölgesinin bulunduğu, α -helikal tekrarların bulunduğu C-terminal domaini (TPR-benzeri=SEL1) olmak üzere 3 farklı domainden oluşmaktadır (9, 118). eEF2K, bazı dokuya özgü izoformlar olmasına karşın tüm ökaryotik hücrelerde eksprese edilir. Fizyolojik koşullar altında eEF2K, bilinen tek substratı olan eEF2'yi fosforile etmekte, hücrenin protein sentezi aşamasında enerjinin büyük çoğunluğunu (>%99) tüketen mRNA translasyonu elongasyon aşamasını baskılamakta, hücrenin enerji azlığı ve/veya hücresel stres gibi çeşitli olumsuz koşullar altında sağkalmasını sağlamaktadır (112, 119). eEF2K aktivasyonu, Ca^{2+} /CaM aracılı, enerji azlığı durumunda AMPK aracılı, hücre içi cAMP artışıyla birlikte PKA aracılı olarak, hipoksik koşullarda veya düşük pH'da direkt olarak aktive olabilmektedir. İndirekt olarak, PI3K/mTORC1/S6K veya cdc2 aracılı ve/veya Ras/Raf/ERK7p90^{RSK} aracılı inaktive olabilmektedir (120-122) (Şekil 2.6).

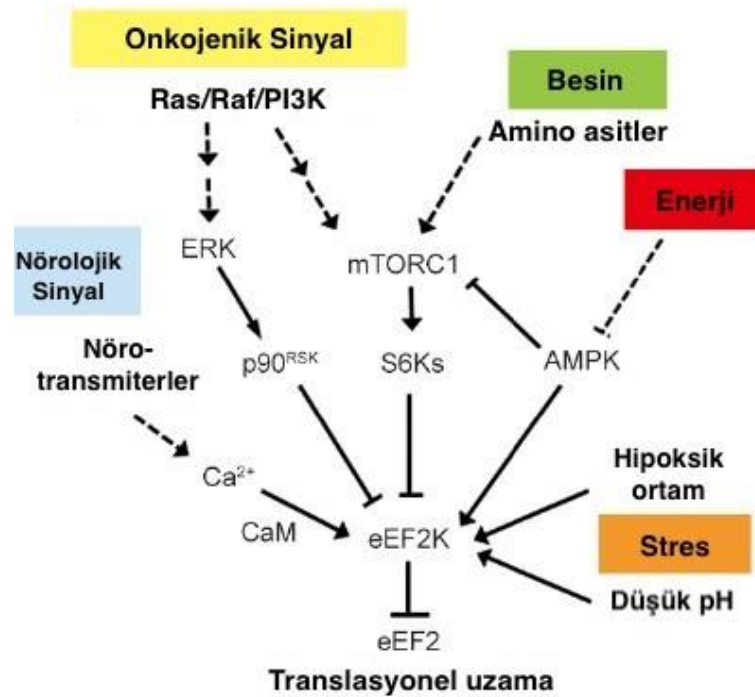


Şekil 2.6. eEF2K yapısı ve fosforilasyon bölgeleri (Tavares C.D.J. ve ark., 2012'den (120) uyarlandı.)

2.5.2. Fonksiyonel Özellikleri

eEF2K, eEF2 proteinini fosforile ederek protein sentezini regüle etmekte ve protein translasyonunda ribozomun GTP bağımlı tRNA-mRNA dupeks translokasyonunu indüklemektedir. Bu sebepten, eEF2K'nın inhibisyonu protein sentezi üzerine negatif yönde etki etmektedir. eEF2K ekspresyonu ubiquitin-proteozom sistemi aracılığıyla da inhibe edilebilmektedir. eEF2K yolağı, besin veya enerji azlığı durumlarında hücresel homeostazı dengelemek adına protein sentezinin elongasyon fazında translasyonu azaltmaktadır (10). Protein translasyonu kontrolüne ek olarak eEF2K'nın fizyolojik hücre döngüsü aresti yaparak hücreyi apoptozdan koruduğu, sübvans edilemeyen yüksek fizyolojik stres koşulları altında pro-apoptotik yolağı indükleyebildiği ifade edilmektedir (123). Model organizmalarda yapılan çalışmalarda, oksidatif stres ilişkili sağlıklı oositlerin gelişimi aşamasında eEF2K'nın apoptozu indüklediği, sağlıklı koşullar altında eEF2K'nın XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) ve c-FLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*) anti-apoptotik proteinler aracılı apoptozu baskıladığı gösterilmektedir (124).

Hücredeki besin azlığı veya hücresel enerjinin az olduğu durumlarda, yapısal olarak yüksek oranda korunmuş çeşitli sinyal molekülleri etkilenmektedir. Oluşan bu stresi baskılamak amacıyla, besin ve enerji tüketen anabolik süreçlerin aniden durmasını içeren entegre ve uyarlanabilir bir yanıtla sonuçlanır. Bu yanıtı eEF2K aracılı regüle eden mTORC1 ve AMPK (5'-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz) iki majör sensör proteindir (16, 17, 125). Hücresel stres durumunda normal hücre, hücresel enerjinin büyük bir kısmını tüketen süreç olan protein sentezini baskılamak amacıyla AMPK ve/veya mTORC1 aracılı eEF2K aktivasyonunu artırarak eEF2 protein aktivasyonunu baskılar ve bunun sonucunda protein translasyonu uzama basamağında durdurulur. AMPK'nın hücredeki protein sentezini baskılaması direkt olarak eEF2K aktivasyonu ile ve/veya indirekt olarak mTORC1 sinyal inaktivasyonu ile gerçekleşebilmektedir (126). Aynı adaptif mekanizma DNA hasarları sonucu gelişen genotoksik stres durumunda (127, 128), yoğun hipoksik koşul (129) ve/veya düşük pH (130) durumlarında da oluşabilmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.7. eEF2K aktivasyonunu regüle eden sinyaller ve uyarılar (Liu R. ve Proud G., 2016'dan (11).uyarlandı)

Hipotermik koşullar altında sitozolik Ca^{2+} ve AMP miktarı artmakta ve bu durumda eEF2K ve AMPK fosforilasyonu artmaktadır. Bu durum hücreyi olumsuz koşullar altında hücresel enerji tüketimini regüle ederek korumaktadır (131). Bu mekanizmanın Alaska'da yaşayan *Rana sylvatica* türü kurbağaların iskelet kaslarında normalin on katı kadar fazla olduğu ve bu sayede kurbağaların uzun süre donuk bir halde yaşamlarını sürdürebildikleri ve soğuğa karşı dirençli oldukları belirtilmektedir (132).

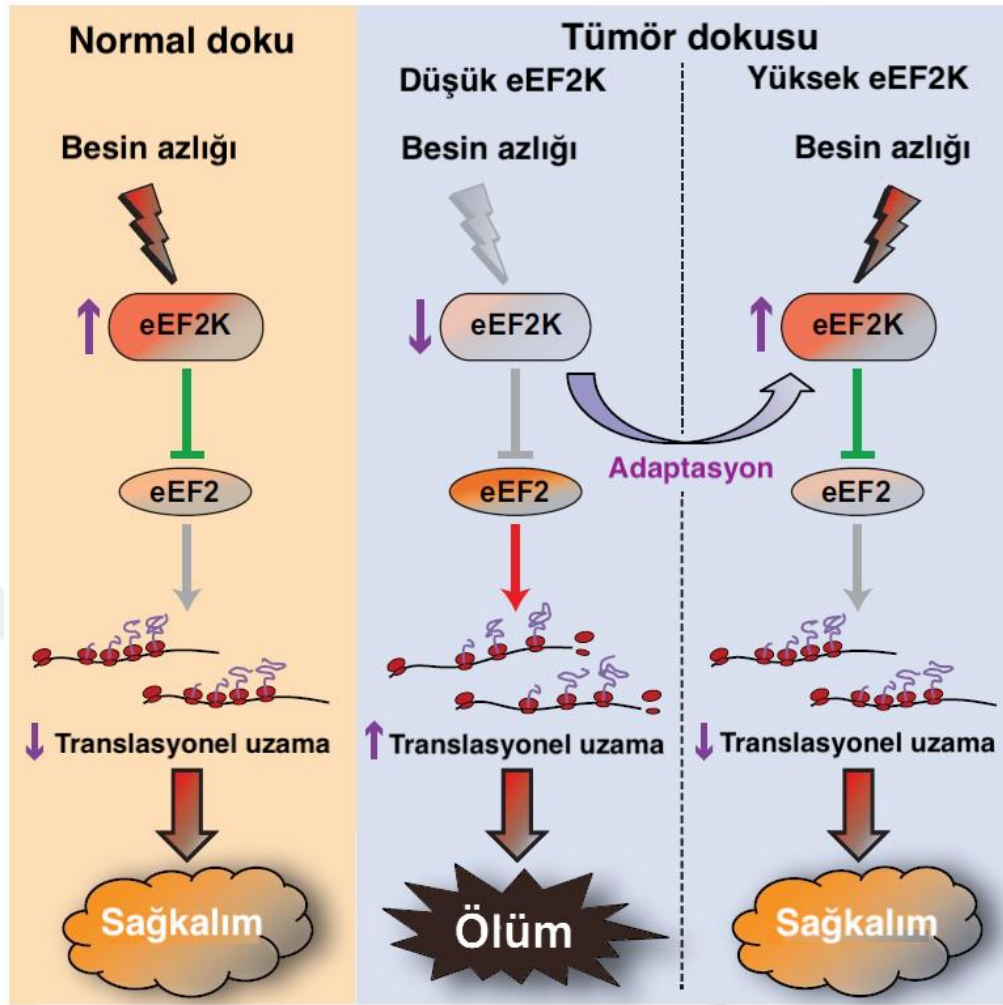
eEF2K aktivitesi ve eEF2'nin fosforilasyonu, nöronlarda ve beyinde çeşitli uyarılar tarafından stimüle olmaktadır. Nöronal aktivitenin post-sinaptik bölgede eEF2K ile regüle olduğu belirtilmektedir (133). Depolarizasyon sonucu dendritlerdeki artan kalsiyum düzeyi ile birlikte aktive olan eEF2K'nın BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), Arc (*activity-regulated cytoskeletal-associated protein*), CaMKII (kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II), ve MAP1B (mikrotübül-assosiyasyon protein 1B) proteinlerini hedefleyerek sinaptik plastisiteyi regüle ettiği belirtilmektedir. Bu duruma ek olarak, eEF2K'nın kalsiyum bağımsız aktivasyon mekanizmasına sahip olduğu bilinmekte ve düşük kalsiyum düzeyinde de aktive olduğu belirtilmektedir (134). Ketamin gibi NMDA reseptör inhibitörlerinin sinaptik geçişi kuvvetlendirerek anti-depresant etkinliği oluşturabileceği düşünülmektedir. Nöronal aktivitedeki rolü gereği eEF2K inhibitörlerinin de benzer şekilde sinaptik geçişi arttırdığı ve depresyon gibi çeşitli mental veya epilepsi, Alzheimer gibi nörolojik rahatsızlıklarda etkin bir tedavi seçeneği oluşturabileceği belirtilmektedir (135-137).

Kalp yetmezliği veya kardiyak hipertrofi sonucu gelişen glukoz deprivasyonunda, kardiyomiyoblast hücrelerinde eEF2K ekspresyonunun arttığı gösterilmektedir. eEF2K'nın ifadesindeki artış ile birlikte AMPK aktivasyonu gerçekleşmektedir. AMPK'nın alt yolak proteini olan ULK1 (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*) fosforilasyonu sonucu hücrelerde otofajinin indüklendiği ve bu sayede hücrelerin apoptozdan korunduğu gösterilmektedir (138).

Fizyolojik koşullarda eEF2K inhibitörünün düz kas hücrelerinde potasyum kanallarını açarak hücrede vazodilatasyona yol açtığı gösterilmektedir. Spontan hipersensitif rat modelinde yapılan çalışmada, TNF- α (Tümör nekroz faktörü alfa) aracılı eEF2K ifadesinin reaktif oksijen türleri (ROS) bağımlı vasküler inflamasyonu tetiklediği, bunun sonucunda ise endotelyal disfonksiyonun artmasıyla birlikte hipertrofi ve hipertansiyon geliştiği gösterilmektedir (139). Bu durum hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıklarda eEF2K inhibitörlerinin tedaviye yönelik etki oluşturabileceğini düşündürmektedir (140).

2.5.3. Kanser Hücrelerinde eEF2K'nın Rolü

eEF2K, tümör mikroçevresinin ayırt edici özellikleri olan hipoksik ortam, düşük pH, besin azlığı, glikolitik, endoplazmik retikulum ve proteotoksik stres gibi çeşitli hücre stresleri altında ve amino asitler gibi enerji veya besin tasarrufu oluşturarak tümör hücrelerinin hayatta kalmasına adaptif olarak katkı sağlamaktadır (141-143). eEF2K aynı zamanda kanser hücrelerinde, hücre döngüsü progresyonunu, otofajiyi ve apoptozu regüle etmektedir. Farklı kanserlerde olduğu gibi hepatosellüler karsinom (HCC) hücrelerinde eEF2K ifadesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmada, cisplatin (CDDP) ile kombine edilen *calyxin Y* inkübasyonu sonucu, ubiquitin-proteozom sistemi indüklenerek eEF2K'nın baskılanması ve bu sayede hücrenin sağlamış olduğu adaptif sağkalım mekanizmalarının inhibisyonu sağlanmıştır. Duyarlı ve dirençli HCC hücrelerine yönelik uygulanan tedavi stratejisinin tekli tedaviye oranla daha etkili olduğu belirtilmektedir (144, 145) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Kanser hücrelerinde eEF2K aracılı adaptif sağkalım mekanizması (Leprivier G. ve Sorensen P.H., 2014'ten (21) uyarlandı.)

eEF2K aktivasyonunun kanser hücrelerinin metastaz ve migrasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (146). HCC hücrelerinde yapılan çalışmada, eEF2K'nın siRNA ile susturulması sonucu PI3K, Akt ve STAT aktivasyonlarının azaldığı gösterilmiştir. eEF2K'nın susturulmadığı kontrol örneklerinde VEGF inkübasyonu ile birlikte PI3K, Akt ve STAT ifadelerinin arttığı ancak siRNA ile eEF2K'nın susturulduğu örneklerde bu proteinlerinin ifadesinin artmadığı sonucuna ulaşılmıştır (147). Paralel biçimde, over kanseri üzerinde yapılan çalışmada siRNA ile eEF2'nin hedeflenmesi sonucu PI3K/Akt yolağının deregüle olduğu ve hücre proliferasyonunun arttığı belirtilmektedir (148). Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada kanser hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu aşamasında önemli rol

oyunayan FOXM1 (Forkhead Box M1) transkripsiyon faktörünün eEF2K'yı regüle ettiği belirtilmektedir. FOXM1'in siRNA ile susturulması sonucu eEF2K protein ifadesi ile birlikte, siklin D1, Src, MAPK-ERK yolağı proteinlerinin ifadesi baskılanmıştır. Kanser hücrelerinde FOXM1/eEF2K yolağının hedeflenmesi ile hücrelerin sağkalım avantajı sağlayamadıkları ve bu sebepten ötürü potansiyel bir hedef olabileceği belirtilmektedir (149). Ek olarak, tümör baskılayıcı bir miRNA olan miR-34a'nın FOXM1/eEF2K yolağını hedeflediği ve üçlü negatif meme kanseri tedavisine yönelik potansiyel bir terapötik olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir (150). Renal hücreli karsinomda eEF2K ifadesinin arttığı, miR-877'nin tümör baskılayıcı bir miRNA fonksiyonuna sahip olduğu ve eEF2K'ı hedefleyerek hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu baskıladığı belirtilmektedir (151).

eEF2K'nın kanser hücrelerinde otofajik aktiviteyi arttırdığı ve bu sayede kanser hücrelerine sağkalım avantajı oluşturduğu belirtilmektedir. Kolon kanseri hücrelerinde eEF2K-AMPK-ULK1 aracılı otofajinin indüklenmesiyle birlikte kanser hücrelerinin sağkalım avantajı sağladığı ve hücre proliferasyonunu arttırdığı ifade edilmektedir (152). Fare embriyonik fibroblast hücrelerinde yapılan çalışmada, otofajinin eEF2K'den bağımsız bir biçimde, stres sonucu AMPK'ın aktivasyonu ve mTORC1'in inhibisyonuna bağımlı olduğu ifade edilmektedir (153). miR-4487 ve miR-595'in eEF2K-ULK1 aracılı otofajik aktivasyonu regüle ettiği belirtilmektedir (154). Özafageal skuamoz hücreli karsinomlarda eEF2K aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonu, invazyon ve migrasyonu ile korelasyon gösterdiği belirtilmekte, eEF2K'nın susturulması ile hücrelerde otofajinin azaldığı, apoptozun ve radyoterapiye duyarlılığın arttığı ifade edilmektedir. Bu bağlamda, özafageal skuamoz hücreli karsinomda eEF2K'nın potansiyel bir hedef olabileceği belirtilmektedir (155). Ek olarak, ER stresi altında DNA hasarı ile indüklenebilir transkript 4 proteini (DDIT4) aracılı eEF2K proteininin Ser398 residüsü fosforillenerek otofaji indüklendiği belirtilmektedir. Bu sayede, metabolik stres altında kanser hücreleri korunmuş olur. Bu bağlamda, eEF2K inhibitörü olarak NHI125 (*1-benzyl-3-cetyl-2-methylimidazolium iodide*), kanser hücrelerine karşı etkili anti-profliferatif etki gösteren bir ajan olarak kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmalar NH125'in mekanistik olarak eEF2K inhibisyonunun aksine, eEF2 defosforilasyonu ile etki sağladığını göstermektedir. Özellikle meme kanserinde, glioma ve pankreas kanserinde anti-proliferatif etki göstermesi sebebiyle, eEF2K önemli terapötik bir hedef olarak dikkat çekmektedir (116).

Bazı tümörlerde eEF2K geninde mutasyon meydana geldiği ifade edilmektedir. Örnek olarak eEF2K *linker* domainindeki Thr348 mutasyonu eEF2K'nın otofosforilasyonunu etkilemektedir. Bu mutasyon sonucu, eEF2K'nın eEF2'ye karşı aktivitesi artmaktadır. eEF2K'nın kanser hücrelerini besin açlığına karşı korumaya yardımcı olduğu göz önüne alındığında, bu mutasyon, kanser hücrelerinin sağkalması için önemli bir avantaj oluşturmaktadır (156, 157).

Tümör dokusunda yoğun olarak aktive olan sinyallerinden biri mTORC1 aracılı gerçekleşmektedir. Tümör hücresi, besin ve/veya enerji azlığı durumunda hızlı bir biçimde AMPK ifadesini artırır, mTORC1 ifadesini azaltır ve bu sayede eEF2K aktivasyonunu artırarak adaptif bir mekanizma oluşturabilir. Olumsuz koşullar altında yoğun onkogenik sinyalin baskılanması tümör hücresine sağkalım avantajı sağlamaktadır. Bu adaptif mekanizmayı gerçekleştiremeyen tümör hücresi apoptoza gitmektedir (21, 158). mTOR inhibitörü olan rapamisin, mTORC1–S6K–eEF2K–eEF2 yolağını hedefleyerek, APC (Adenomatosis poliposis coli) mutasyonu olan bağırsak kript adenom hücrelerinin farklılaşmasına ve hücre büyümesinin baskılanmasına neden olmaktadır. APC mutasyonundan kaynaklı kolorektal kanser riski olan kişilerde terapötik olarak rapamisin kullanımının faydalı olabileceği ifade edilmektedir (159). Hormon reseptör pozitif 190 meme kanseri hastasında protein translasyonu mekanizmasında rol oynayan proteinler üzerinde yapılan çalışmada, yüksek pS6, p4E-BP1, eEF2K ve düşük pdc4 ifadesinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmektedir. Bu kapsamda, belirlenen protein ifadelerine sahip olan hastalarda PI3K/mTOR yolağı inhibitör kullanımının tedaviyi destekleyici önemli bir ajan olabileceği belirtilmektedir (160). p53/PTEN dual mutant üçlü negatif meme kanseri fare modelinde yapılan çalışmada, Akt protein ifadesi yüksek olanlarda eEF2K inhibitörlerinin

tümör progresyonunu baskıladığı ancak Akt protein ifadesi düşük olanlarda eEF2K inhibitörüne karşı direnç oluştuğu belirtilmektedir (161).

eEF2K'a yönelik çeşitli küçük molekül inhibitörleri tasarlanmaktadır. eEF2K'a yönelik terapötiklerin meme kanserinde apoptozu indüklediği ve tümör progresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (162). Ancak bu duruma zıt olarak, eEF2K'ya hedefleyen küçük molekül inhibitörleri farklı sonuçlara yol açmaktadır. Örnek olarak, NH125 isimli ajanın hücreler ve *in vivo* çalışmalarda başta inhibisyon gösterdiği ancak zaman içerisinde etkinliğini kaybettiğini göstermektedir. Bu durumun aksine, A-484954 isimli ilk jenerasyon eEF2K inhibitör ajanının, çeşitli hücre dizilerinde daha etkin inhibisyon sağladığı belirtilmektedir. Benzer durum anti-viral ilaçlar için de geçerlidir. Lopinavir gibi anti-viral ilaçların AMPK-eEF2K aracılı protein sentezini baskıladığı gösterilmiştir (163). Çeşitli anti-viral ilaçların, özellikle FDA onaylı ve HIV tedavisinde kullanılan proteaz inhibitörü olan nelfinavirinin, kanser hücrelerinde eEF2K fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. eEF2K fosforilasyonu ile birlikte kanser hücrelerinin apoptoza gittiği ve kanser progresyonunu azalttığı belirtilmektedir (164, 165).

eEF2K'ya yönelik kullanılan küçük molekül inhibitör aktivitelerinin analizleri için kullanılan biyokimyasal ve hücresel deney sistemleri yetersiz kalmaktadır. Bu amaçla, floresan ve luminesan deney sistemleri ile çeşitli eEF2K inhibitörlerinin etkileri yüksek çıktılı görüntüleme yöntemi (HTS, *High Throughput Screen*) ile analiz edilmiştir. Sox (*soxtide*) temelli işaretleme yönteminin, daha önceki deneylerde kullanılan GST işaretleme yöntemine oranla daha etkin çalıştığı belirtilmektedir. Sox kromofor-modifiye peptid substratlarının şelasyon kuvvetlendirilmiş (*chelation-enhanced*) floresan fosforilasyonu analizlerinde hassasiyetinin daha fazla olduğu belirtilmektedir. Sox-temelli peptid aktive olduğu zaman Mg⁺ ile bağlanma afinitesi artmaktadır. Bu prensip ile, kinaz aktivitesi analiz edilmektedir (166).

2.6. Amaç

HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde eEF2K'nın ekspresyon düzeyi ve HER2 aktivasyonu ile ilişkili hücre içi sinyal yolağı ilişkisi henüz bilinmemektedir. Bu çalışmada, HER2 reseptörüne özgül monoklonal antikor olan trastuzumab ile inkübe edilmiş HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizilerinde, HER2 aracılı onkojenik sinyal yolağı ile eEF2K arasındaki fonksiyonel ilişkinin incelenmesi amaçlanmaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

3.1 Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddelerin, kitlerin ve tamponların adları ve üretildikleri firmaların adları aşağıda sıralanmaktadır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Kimyasal maddeler, kitler ve tamponlar

ÜRÜN ADI	ÜRETİCİ ADI ve ÜRETİLDİĞİ ÜLKE
Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) (D7A5) XP® Rabbit mAb primer antikor #3777S	Cell Signaling Technology- ABD
EGF Receptor (C74B9) mAb primer antikor #2646S	Cell Signaling Technology- ABD
Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr1221/1222) (6B12) Rabbit mAb primer antikor #2243S	Cell Signaling Technology- ABD
HER2/ErbB2 (D8F12) XP® Rabbit mAb primer antikor #4290S	Cell Signaling Technology- ABD
Phospho-HER3/ErbB3 (Tyr1289) (21D3) Rabbit mAb primer antikor #4791S	Cell Signaling Technology- ABD
HER3/ErbB3 (D22C5) XP® Rabbit mAb primer antikor #12708S	Cell Signaling Technology- ABD

Tablo 3.1. Kimyasal maddeler, kitler ve tamponlar (Devam)

Phospho-eEF2k (Ser366) Antibody primer antikor #3691S	Cell Signaling Technology- ABD
eEF2k Antibody primer antikor #3692S	Cell Signaling Technology- ABD
Phospho-eEF2 (Thr56) Antibody primer antikor #2331S	Cell Signaling Technology- ABD
eEF2k Antibody primer antikor #2332S	Cell Signaling Technology- ABD
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) Rabbit mAb primer antikor #9234S	Cell Signaling Technology- ABD
p70 S6 Kinase (49D7) Rabbit mAb primer antikor #2708S	Cell Signaling Technology- ABD
Phospho-Akt (Thr308) (D25E6) XP® Rabbit mAb primer antikor #13038S	Cell Signaling Technology- ABD
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb primer antikor #4060S	Cell Signaling Technology- ABD
Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb primer antikor #4691S	Cell Signaling Technology- ABD
Phospho-Cyclin D1 (Thr286) (D29B3) XP® Rabbit mAb primer antikor #3300S	Cell Signaling Technology- ABD

Tablo 3.1. Kimyasal maddeler, kitler ve tamponlar (Devam)

Cyclin D1 (92G2) Rabbit mAb primer antikor #2978S	Cell Signaling Technology- ABD
p21 Waf1/Cip1 (12D1) Rabbit mAb primer antikor #2947S	Cell Signaling Technology- ABD
p27 Kip1 (D69C12) XP® Rabbit mAb primer antikor #3686S	Cell Signaling Technology- ABD
Caspase-3 (8G10) Rabbit mAb primer antikor #9665S	Cell Signaling Technology- ABD
PARP (46D11) Rabbit mAb primer antikor #9532S	Cell Signaling Technology- ABD
ADAM10 Antibody primer antikor #14194S	Cell Signaling Technology- ABD
PhosphoPlus® AMPKα (Thr172) Antibody Duet primer antikor #8208S	Cell Signaling Technology- ABD
GAPDH (14C10) Rabbit mAb primer antikor #2118S	Cell Signaling Technology- ABD
β-Actin (13E5) Rabbit mAb primer antikor #4970S	Cell Signaling Technology- ABD
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody sekonder antikor #7074S	Cell Signaling Technology- ABD
Herceptin® (Trastuzumab)	Roche - İsviçre
Leibovitz L-15 Medium	Biological Industries - İsrail

Tablo 3.1. Kimyasal maddeler, kitler ve tamponlar (Devam)

DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) Medium	Biological Industries - İsrail
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)-1640 Medium	Biological Industries - İsrail
DMEM:F12 Medium	Biological Industries - İsrail
FBS (Fötal Dana Serumu)	Biological Industries - İsrail
L-glutamin	Biological Industries - İsrail
Penisilin/Streptomisin	Biological Industries - İsrail
Trypsin EDTA Solüsyonu A (0.25%), EDTA (0.02%)	Biological Industries - İsrail
EZ-PCR Mikoplazma Kiti	Biological Industries- İsrail
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Biological Industries- İsrail
TBS (Tris Buffered Saline)	Bio-Rad - ABD
Tween-20 (%10)	Bio-Rad - ABD
10x Tris/Glycine/SDS	Bio-Rad - ABD
Bovine Serum Albumin Standart Seti	Bio-Rad - ABD
4X Laemmli Örnek Tamponu	Bio-Rad - ABD
Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, Mini, PVDF, for 40 Blots	Bio-Rad - ABD

Tablo 3.1. Kimyasal maddeler, kitler ve tamponlar (Devam)

Mini-PROTEAN TGX Gels, 10 gels/box, 4-20% resolving gels	Bio-Rad - ABD
Super Signal West-femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific - ABD
Halt™ Protease and Phosphatase inhibitor cocktail	Thermo Scientific - ABD
RIPA Tampon Solüsyonu	Thermo Scientific - ABD
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific - ABD
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific - ABD
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Thermo Scientific - ABD
β-merkaptotanol	Sigma Aldrich - ABD
Etil alkol (Etanol)	Sigma Aldrich - ABD
Tripan Mavisi	Sigma Aldrich - ABD
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma Aldrich - ABD
SDS (Sodyum dodesil sülfat)	Sigma Aldrich - ABD
DMF (N,N-Dimethylformamide)	Isolab - Almanya
BlueBlock PF (10x)	Serva - Almanya
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Serva - Almanya

3.2 Aletler ve Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan aletlerin ve cihazların adları ve üretildikleri firmaların adları aşağıda sıralanmaktadır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Aletler ve cihazlar

ÜRÜN ADI	ÜRETİCİ ADI ve ÜRETİLDİĞİ ÜLKE
Kodak Gel Logic 1500 Görüntüleme Sistemi	Carestream Healty Inc.-ABD
Faz/Kontrast Mikroskop	Olympus-İngiltere
Etüv	Heraeus-Almanya
Otomatik Çalkalayıcı	Heidolph-Almanya
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Eppendorf-Almanya
Spektrofotometre	Spectramax-ABD
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo Electron-ABD
Santrifüj	Heraeus-Almanya
-196 Sıvı Azot Tankı	Taylor Wharton- ABD
Buz makinası	Scotsman AF200-İngiltere
Trans-Blot Membran Transfer Sistemi	Bio-Rad - ABD
Elektroforez Güç Kaynağı	Bio-Rad - ABD
Elektroforez Güç Kaynağı	Amersham
Jel Yürütme Tankı	Bio-Rad - ABD

Tablo 3.2. Aletler ve cihazlar (Devam)

Jel Yürütme Tankı	Amersham
Hassas Terazı	Denver Instrument-ABD
Vorteks	Clofton Cycline-İngiltere
Distile Su Cihazı	GFL-Almanya
Çalkalayıcı	GFL-Almanya
Isıtma Bloğu	Techne Dri Bloc-İngiltere
Manyetik Karıştırıcı	Ika RH Basic-Almanya
Çeker Ocak	Ünitest-Türkiye
Dikey Akımlı Hava Kabini	Thermo-Electron-ABD
Su Banyosu	GFL-Almanya
+4 °C Soğuk Oda	Alarko Carrier-Türkiye
+4 °C Buzdolabı	Bosch-Almanya
-20 °C Derin Dondurucu	Bosch-Almanya
Thoma Lamı	Neubauer-ABD
RTCA iCELLigence Sistemi	Acea - ABD
BD FACSAria II Cell Sorter Akım Sitometri	Becton Dickinson - ABD

3.3 Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında HER2 ekspresyonu olan meme kanseri hücre dizileri olan BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 kullanıldı. Hücreler 25 cm² ve/veya 75 cm² flask içerisinde, %10'luk fetal dana serumu (FBS), %1 antibiyotik (Penisilin/Streptomisin) (100 IU penisilin ve 100 µg/ml streptomisin) ve %1 L-glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (SKBR-3 hücre dizisi için), RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (MDA-MB-361 ve BT-474 hücre dizileri için), DMEM:F12 (MDA-MB-453 hücre dizisi için) veya Leibovitz L-15 (UACC-893 hücre dizisi için) tam besiyeri ortamında 37 °C %5 CO₂'lik etüvde çoğaltıldı. Her 3 günde bir besi yeri değiştirildi, tek tabaka halinde büyüyen hücrelerin doluluk oranları ≥%70'e ulaştığında tripsinizasyon yapılarak pasajlandı. Hücrelerin yoğunluk tayini faz/kontrast mikroskobu ile yapıldı. Hücrelerin ilk pasajı aşamasında, krayovial tüp başına 1 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde konuldu ve daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere sıvı azot tankında muhafaza edildi. 3. ile 11. pasajlar arasındaki hücreler kullanılarak deneyler yürütüldü. Uygun pasaj sayısına ve deneylerde kullanılacak miktara ulaşan hücreler kaldırıldıktan sonra tripan mavisi ile boyandı ve Thoma Lamı kullanılarak ışık mikroskobu vasıtasıyla sayıldı.

3.4. Mikoplazma Testi

Çalışma kapsamında kullanılan hücre dizilerinin, hücre içi bakteri (mikoplazma) kontaminasyonu tayini amacıyla mikoplazma testi uygulandı. Hücrelerin doluluk oranları ≥%70'e ulaştığında besiyerinden 1 ml örnek alınarak, 1,5 ml'lik deney tüpü içerisine konuldu. Aldığımız örnek +4 °C'de 2000 rpm'de 90 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant ayrı bir tüpe alındı ve pellet atıldı. Alınan süpernatant 14000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Bu işlemten sonra süpernatant pipet ile çekilerek atıldı. Tüpün alt kısmında oluşan pelet 25 µl mikoplazma tampon solüsyonu içerisinde süspanse hale getirildi. Süspansiyon 95 °C'ye getirilmiş kuru blok üzerinde 3 dakika inkübe edildi. Bu aşamadan sonra *EZ-PCR* Mikoplazma kitinde önerilen miktarlarda örnek tüp, pozitif kontrol tüpü ve negatif kontrol tüpü olarak

hazırlandı. Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda tüplerin içerisindeki ürünler %2'lik agaroz jele yüklendi ve mikoplazma varlığı kontrol edildi. Çalışma kapsamında kullanılan hücre dizisi örneklerinde mikoplazma kontaminasyonu olmadığı gözlemlendi.

3.5. İlaç Uygulaması

HER2 ekspresyonu olan meme kanseri hücre dizileri MTT ve western blot deneyleri için trastuzumab (Herceptin®) ile inkübe edildi. MTT deneyinde kullanılacak deney doz aralıkları literatürdeki çalışmalar sonucu belirlendi (167-170). Trastuzumab, hücre dizileri için kullanılan tam besiyeri ile 5-10-20-40-80 µg/ml test konsantrasyonları taze olarak hazırlanarak sitotoksosite deneyleri yapıldı. Hücreler ilaç ile 48 saat ve 72 saat olmak üzere iki farklı saat koşulunda test edildi. MTT sitotoksosite deneyi sonucu tüm hücre dizileri için belirlenen 10 µg/ml trastuzumab dozu, western blot deneyi için kullanıldı.

3.6. MTT Sitotoksosite Testi

MTT yöntemi, canlı hücrelerin mitokondriyal süksinat dehidrogenazları aracılığıyla çözünür metil-tiyazol-tetrazolyum tuzunu, çözünmeyen formazana dönüştürmesi ve çözünmeyen bu kristallerin SDS ile suda çözünür hale getirilmesi ile oluşan renk şiddetinin kolorimetrik olarak ölçümü esasına dayanan bir sitotoksosite testidir. Belirlenen ilaç dozlarının 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonrasında MTT, PBS içinde 5 mg/ml olacak şekilde çözülerek hazırlandı. MTT'nin 4 saatlik inkübasyonundan sonra ekstraksiyon tamponu olarak, %45 DMF (Dimetilformamid) içinde çözülmüş %23 SDS (Sodyum dödesil sülfat) çözeltisi (pH= 4.7) kullanıldı. DMF/SDS ile 24 saatlik süre sonunda çözünen formazan kristalleri kuyularda formazanın yoğunluğuna göre renk değişimleri oluştu. Renk dansiteleri, plaka temelli spektrofotometre aracılığıyla 570 nm dalga boyunda okundu. Tek başına DMF/SDS optik dansitesi *blank* olarak kullanıldı. İlaçsız kontrol kuyuları üzerinden ilaçsız kuyuların normalizasyonu yapılarak dozların hücre canlılığına olan etkileri analiz edildi.

3.7. Protein Lizatlarının Hazırlanması

BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 hücreleri, kültür ortamında çoğaltılması aşamasından T25 flaskların her birine 200.000 – 1.000.000 hücre ekildi. Hücrelerin kuyu zeminlerine yapışması için 37 °C’de %5 CO₂’lik etüvde 24 saat inkübasyon gerçekleştirildi. 24 saat sonra flask içerisinde bulunan tam besiyerleri çekildi. Bu aşamadan sonra, serum açlığı koşulu uygulanması amacıyla serumsuz besiyeri eklendi. 24 saat beklendikten sonra örnek flasklara, besiyeri içinde hazırlanan 10 µg/ml trastuzumab eklenerek 6 ve 48 saat olmak üzere iki farklı deney süresi boyunca inkübe edildi. İlaçsız kontrol örneklerine sadece besiyeri eklendi. İnkübasyondan sonra flasklardaki besiyeri çekildi ve flasklar soğuk PBS ile yıkandı. Devamında PBS çekildi, 400 µl lizis tamponu (RIPA, Proteaz&Fosfataz inhibitör kokteyli, EDTA) ile flask içerisinde bulunan hücreler lizis edildi ve hücre lizatları elde edildi.

3.8. Protein Kantitasyonu

Western blot deneyinde kullanılacak olan protein lizatlarının, protein miktarlarının tayini amacıyla BCA Protein Assay Kit ile protein kantitasyonu yapıldı. Düz tabanlı 96 kuyulu plakta bulunan kuyulara 10’ar µl protein lizat örneklerinden eklendi. Protein standartı olarak, 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml ve 0,125 mg/ml olmak üzere toplamda 7 farklı konsantrasyonda BSA (*Bovine Serum Albumin*) proteini kullanıldı. *Blank* olarak lizis tamponu kullanıldı. Her bir protein standardı, örnek protein lizatları ve blank olarak kullanılan lizis tamponu üzerine 200 µl kit içerisinde bulunan BCA Protein Assay Kit A:B (50:1 oranında) solüsyon karışımı eklendi. Devamında, 96 kuyulu plak karanlık ortamda ve 37 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra renk dansiteleri, plaka temelli spektrofotometre aracılığıyla 562 nm dalga boyunda okundu. Western blot deneylerinde her bir örnekten 20 µg protein kullanılacağından dolayı, elde edilen değerler 20 µg total protein miktarı için ihtiyaç duyulan hacim olarak hesaplandı. Western blot deneyine başlamadan önce tüm protein lizatlarına 4x laemmli yükleme tamponu 3:1 oranında eklendi.

3.9. Western Blot

Protein kantitasyonları işleminden sonra yüklenecek protein konsantrasyonları belirlenmiş protein lizatlarının, 95 °C'ye getirilmiş olan kuru ısıtma bloğu içerisinde 5 dakika inkübe edilerek denatürasyonları sağlandı. Protein denatürasyonu aşamasından sonra, lizat içerisinde bulunan farklı ağırlığa (kDa) sahip proteinlerin %4-20 *precast* poliakrilamid jel içerisinde elektroforez ile yürütülerek ayrışması sağlandı. Yürütme işlemi 5 dk. 50 V. ardından 85 dk. 100 V. olarak gerçekleştirildi. Bu aşama tamamlandıktan sonra, jel içerisinde ağırlıklarına göre ayrıışan proteinlerin, jelden PVDF membrana transferi sağlandı. Transfer işlemi 3 dk. 25 V. olarak gerçekleştirildi. Transfer aşamasından sonra membranın, 1X *BlueBlock PF* blokasyonu solüsyonu içerisinde 1 saat süresince, oda sıcaklığında ve 100 rpm hıza ayarlanmış çalkalayıcı üzerinde blokasyonu gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra, membran primer antikor ile muamele edildi. Denatüre olmuş proteinlerin tek bir determinantını yüksek afinite ve özgülükte tanıyan monoklonal antikorlar hedeflediğimiz proteinlerin (p-EGFR/EGFR, p-HER2/HER2, p-HER3/HER3, p-AKT/AKT, p-S6K/S6K, p-eEF2K/eEF2K, p-eEF2/eEF2, p-siklin D1/siklin D1, p-AMPK/AMPK, p27, p21, ADAM10, PARP ve Kaspaz 3) tayini için kullanıldı. Kontrol proteini olarak β -aktin veya GAPDH kullanıldı. Primer antikor inkübasyonu 50 rpm hızdaki çalkalayıcıda, 4 °C'da 18 saat süresince yapıldı. Primer antikor inkübasyonundan sonra, 1X TBS-T ile membran 3 defa 10'ar dakika 100 rpm hızdaki çalkalayıcıda yıkandı. Devamında, membran yüzeyindeki antikorlara spesifik olarak bağlanan primer antikorların görüntülenebilmesi için HRP (*Horseradish* peroksidaz) konjuge primer antikorun üretildiği organizmaya karşı (*anti-rabbit*) üretilmiş sekonder antikor ile inkübasyon aşamasına geçildi. Sekonder antikor inkübasyonu oda sıcaklığında 100 rpm hızdaki çalkalayıcıda 1 saat süresince yapıldı. Sekonder antikor inkübasyonundan sonra 1X TBS-T ile membran 3 defa 10'ar dakika 100 rpm hızdaki çalkalayıcıda yıkandı. Son olarak, sekonder antikorun bağlanmış olduğu proteinlerin kemoluminesans ışımaya yapabilmesi için, sekonder antikora konjuge HRP'de bulunan peroksidaz enziminin substratı olan luminol içeren ECL (*Enhanced chemiluminescence*) solüsyonu kullanıldı.

ECL inkübasyonu protein ifadesi ve antikor yoğunluğuna bağlı olarak 10 sn. – 5 dk. aralığında gerçekleştirildi. Son olarak, kemoluminesans görüntüleme ile elde edilen bantların dansitometrik yoğunlukları görüntüleme sistemi ile tespit edildi. Relatif bant dansiteleri *Fiji* (ImageJ) uygulaması ile belirlendi.

3.10. xCelligence Aracılı Gerçek-Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi

Gerçek-zamanlı hücre analiz sistemi, altın biyosensör mikroelettrotlar kullanarak elektriksel empedans ölçmektedir. Bu sistemin hücre sağlığı ve davranışı üzerine zararı olmadığı gösterildi (171). Hücre sayısının artışı, empedansı değiştirmektedir. Bu sayede de gerçek-zamanlı kantitatif hücre analizi yapılabilir. Bu uygulamalar için hücrenin işaretlenmesi de gerekmemektedir (172). Bu çalışmada, RTCA SP xCelligence Sistemi (ACEA, San Diego, CA, ABD) kullanılarak dinamik ve gerçek-zamanlı hücre proliferasyonu incelendi. Gerçek-zamanlı hücre analiz sistemi içindeki altın mikroelettrotların empedansı, içinde hücre bulunmayan tam hücre besiyeri kullanılarak ölçüldü. Devamında BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453 ve SKBR-3 hücre dizileri E-plakaya ekildi. UACC-893 hücre dizisi büyüme ortamının CO₂ gaz değişiminden etkilenmesi ve bu sebepten deneysel prosedüre uygun olmamasından ötürü analizi gerçekleştirilemedi. Hücrelerin plakaya tutunmaları için 24 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda değişen konsantrasyonlarda kontrol kuyularına sadece besiyeri, test kuyularına ise 10 µg/ml trastuzumab eklendi. Eklenen ilaç varlığında hücrelerin proliferasyonu takip edilerek toplam 240 saatlik proliferasyon kinetiği incelendi. Prolifere olan hücreler, “E-plate”e tutunan toplam hücre sayısını arttırdığı için empedans değişmektedir. Bu yöntemle dinamik hücre proliferasyonu kinetiği tespit edilmiş ve farklı zaman noktalarındaki “hücre indeksleri (CI)” hesaplandı.

3.11. CFSE Hücre Proliferasyonu Testi

CFSE hücre bölünmesi takip kiti kullanılarak yapılacak akım sitometri yöntemi ile, hücrelerin ilaç inkübasyonu sonucu proliferasyon paternlerindeki değişiklikler incelendi. Deneysel basamaklar kitin önerdiği adaran hücre

protokolüne göre yapıldı. Bu doğrultuda hücreler ≥ 75 yoğunluğa geldiklerinde kaldırıldı. 5 μM CFSE çalışma solüsyonu ile, içerisinde 1-10 milyon hücre bulunan 1 ml hücre süspansiyonu karıştırıldı. Devamında, 20 dakika 37 °C'de inkübe edilecek. Devamında, sıvı miktarının 5 katı kadar %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler flasklara ekildi ve hücrelerin flask tabanına tutunması için yaklaşık bir gün beklendi. Ertesi gün 10 $\mu\text{g/ml}$ trastuzumab eklendi. CFSE öncesi hücre *doubling* süreleri BT-474 için ~65 saat, MDA-MB-361 için ~62 saat, MDA-MB-453 için ~57 saat, SKBR-3 için ~69 saat ve UACC-893 için ~56 saat olarak belirlendi. Hücrelerinde en az bir *double* geçirmelerine dikkat edildi. Bu amaçla, tüm hücreler ilaç ile 120 saat inkübe edildi. İlaç ile inkübasyon süresi sonunda, hücreler kaldırıldı ve PBS içerisinde resüspanse edildi. Son olarak ilaç uygulaması ve CFSE inkübasyonu yapılmış HER2 ekspresyonu olan meme kanseri hücre dizilerinin protokolde belirtilen dalga boyunda (Eksitasyon/Emisyon: 492/517 nm) akım sitometri cihazında ölçümleri yapıldı.

3.12. Biyoenformatik Analiz

Çalışma kapsamında üç farklı veri seti üzerinden meta-analiz gerçekleştirildi. İlki, *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE) (173) veri setinde HER2+ meme kanseri olan BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453 SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin belirlenen 20 gen setindeki bazal ekspresyonlar incelendi. Belirlenen genler: ADAM10, AKT1, AKT2, AKT3, CASP3, CCND1A (siklin D1), CDKN1A (p21), CDKN1B (p27), EEF2, EEF2K, EGFR, ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3), MTOR, PARP1, PIK3CA, PRKAA1 (AMPK α 1), PRKAA2 (AMPK α 2), PTEN ve RPS6KA1 (p70S6K)'dir. Gen seti analizi *Broad Institute Morpheus* (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) yazılımı aracılığıyla oluşturuldu.

İkinci olarak, *CCLE* RNA sekans veri seti kullanıldı. Veri setinde HER2+ meme kanseri olan BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453 SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin belirlenen 20 gen setindeki bazal ekspresyonlar incelendi. Ek olarak, 4 farklı HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizisi (BT-474, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893) ve 4 farklı üçlü negatif meme kanseri

hücre dizisi (BT-20, HCC38, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468) bazal gen ekspresyonları *KEGG* (174) ve *GSEA* (175, 176) analiz sistemleri kullanılarak karşılaştırıldı. *KEGG* analizinde hsa_04012 ve hsa_04152 yolları kullanıldı. *GSEA* analizinde ise, 135 gen profiline sahip *go_translational_elongation* ve 37 gen profiline *st_p38_mapk_pathway* moleküler imza veri setleri kullanıldı.

Üçüncü veri setinde ise, aynı hücre dizileri ve gen setleri, *Gene Expression Omnibus* (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) veri tabanında bulunan GSE48216 (177, 178) RNA sekans veri seti üzerinde bazal gen ekspresyonları incelendi. RNA sekans veri setinin nümerik hesaplamalar TÜBİTAK ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA kaynaklarında) ve *Galaxy* (179) sunucularında gerçekleştirildi. FASTQ dosyaları NCBI SRA-toolkit (<http://ncbi.github.io/sra-tools/>) aracılığıyla yüklenme işlemi gerçekleştirildi. Veri dosyaları GRCh38 (hg38) insan referans genomu ile STAR (180) dizilime yazılımı aracılığıyla *align* edildi. Oluşan BAM dosyaları *featureCounts* (181) yazılımı aracılığıyla sayıldı. Son olarak elde edilen sonuçlar *heatmap2* (*Visualization of RNA-Seq results with heatmap2* (*Galaxy Training Materials*)) görüntüleme yazılımı kullanılarak karşılaştırıldı. Analiz *pipeline* ı, *Reference-based RNA-Seq data analysis* (*Galaxy Training Materials*) baz alınarak oluşturuldu (182).

3.13. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler için *Graphpad Prism 7* programı kullanıldı. İstatistiksel analiz amacıyla *student's t* testi uygulandı. Yapılan testin sonucunda $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

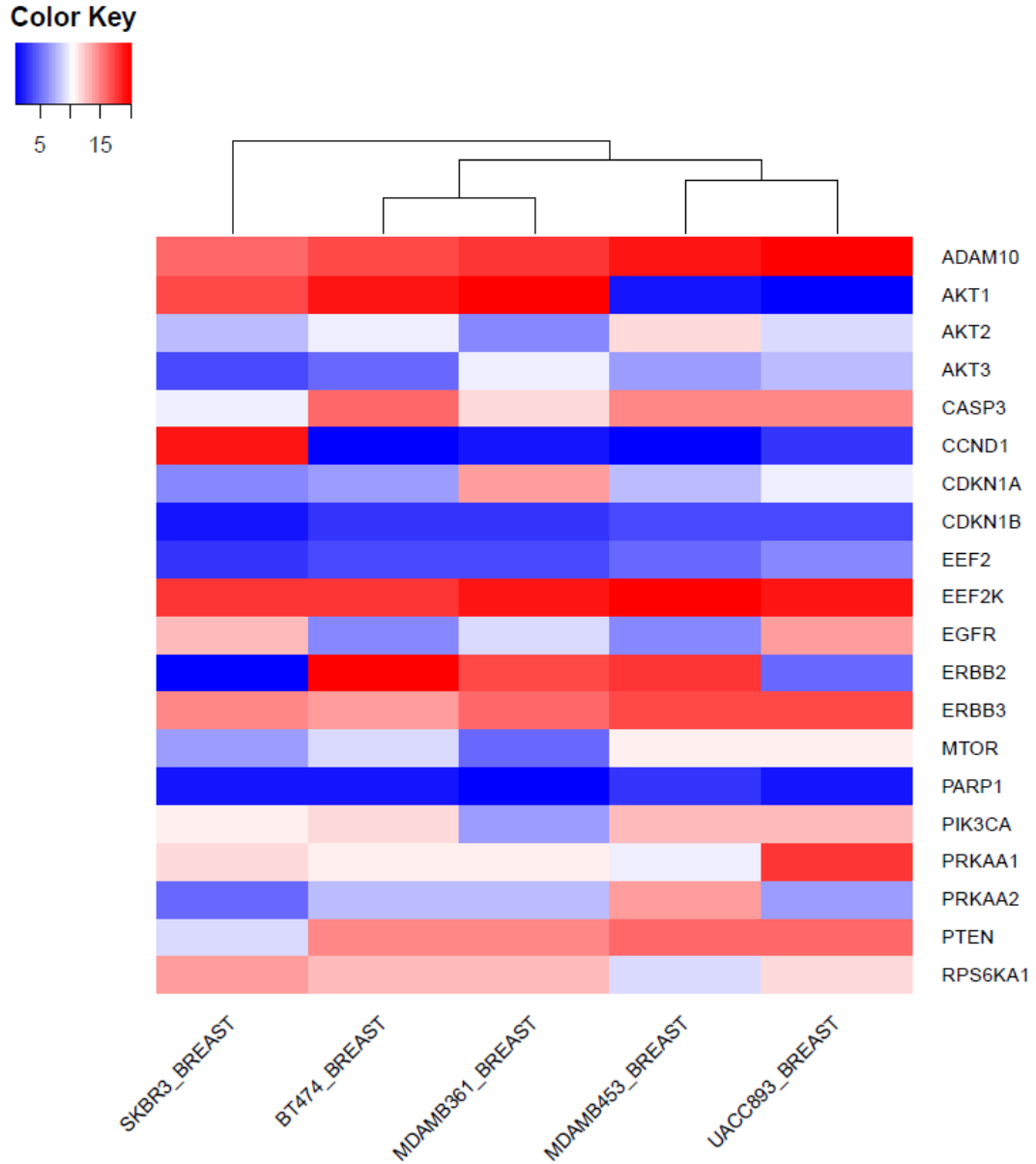
4.1. HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Belirlenen Gen Setinin Biyoenformatik Analizi

BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453 SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinde belirlenen 20 genin bazal ekspresyonlar incelendi. Belirlenen genler: ADAM10, AKT1, AKT2, AKT3, CASP3, CCND1A (siklin D1), CDKN1A (p21), CDKN1B (p27), EEF2, EEF2K, EGFR, ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3), MTOR, PARP1, PIK3CA, PRKAA1 (AMPK α 1), PRKAA2 (AMPK α 2), PTEN ve RPS6KA1 (p70S6K)'dir.

4.1.1. HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Belirlenen Gen Setinin CCLE Mikrodizin Veri Tabanında Değerlendirilmesi

Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (173) veri tabanında HER2 eksprese eden meme kanseri olan BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453 SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin belirlenen gen setinin bazal ekspresyonlar incelendi. Gen seti analizi *Broad Institute Morpheus* (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>) yazılımı aracılığıyla, ısı haritası *heatmap2* (*Visualization of RNA-Seq results with heatmap2 (Galaxy Training Materials)*) görüntüleme yazılımı kullanılarak oluşturuldu.

Elde edilen gen ekspresyonları, hiyerarşik kümelendirme algoritmasına göre gruplandırıldığında, BT-474 ile MDA-MB-361 bir grup, MDA-MB-453 ile UACC-893 ayrı bir grup olarak elde edildi. SKBR-3 hücre dizisi ise bu gruplardan bağımsız olarak sınıflandırıldı (Şekil 4.1).



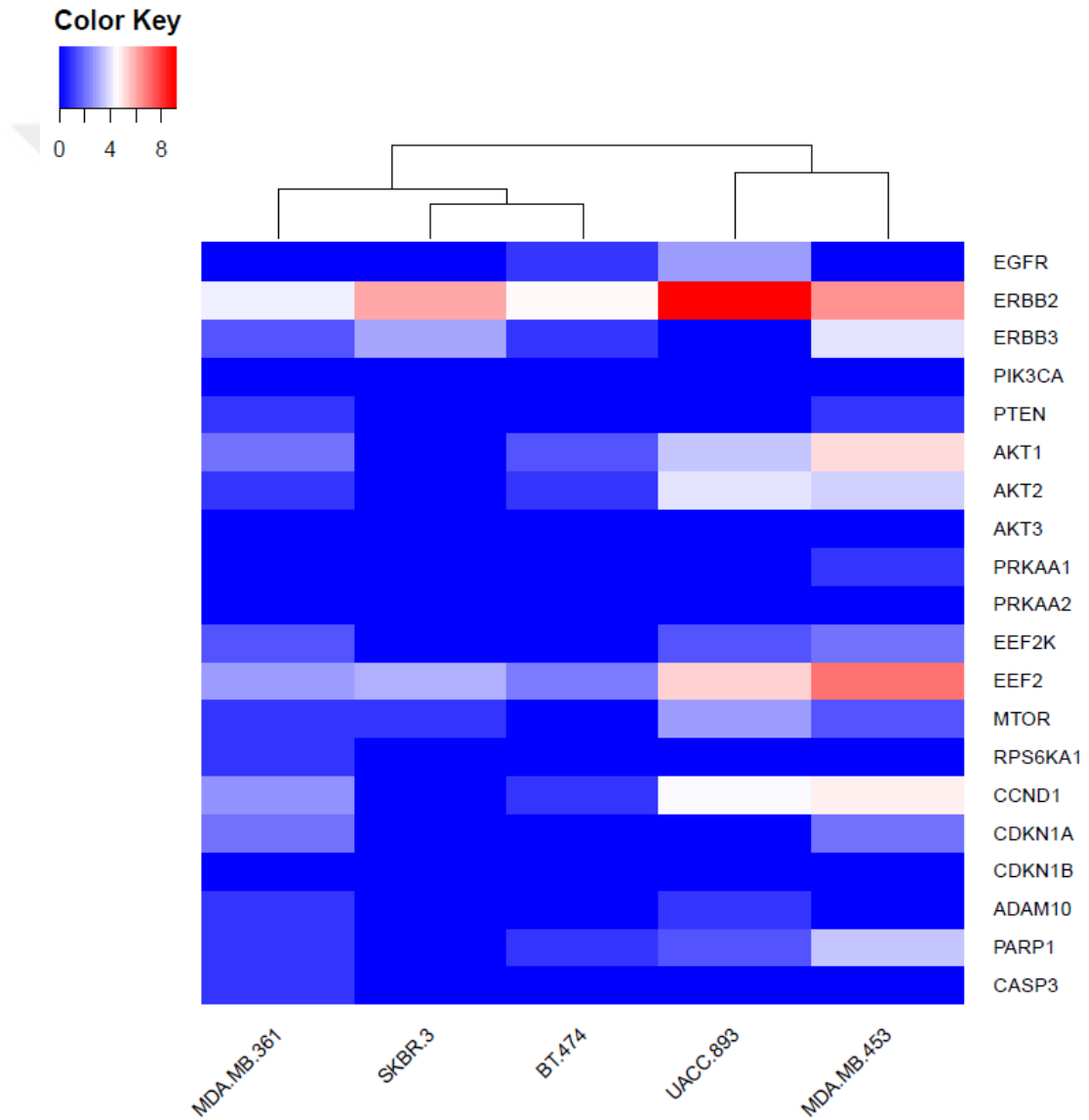
Şekil 4.1. BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin gen ekspresyon profiline göre kümelenmesi (CCLE, mikrodizin)

4.1.2. HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Belirlenen Gen Setinin GEO Veri Tabanında Değerlendirilmesi

Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) veri tabanında bulunan GSE48216 (177, 178) RNA sekans veri setinde BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinde belirlenen 20 genin bazal ekspresyonları incelendi. Gen seti analizi, TÜBİTAK

ULAKBİM, Yüksek Başarım ve Grid Hesaplama Merkezi'nde (TRUBA kaynaklarında) ve *Galaxy* (179) sunucularında gerçekleştirildi. Isı haritası *heatmap2* (*Visualization of RNA-Seq results with heatmap2 (Galaxy Training Materials)*) görüntüleme yazılımı kullanılarak oluşturuldu.

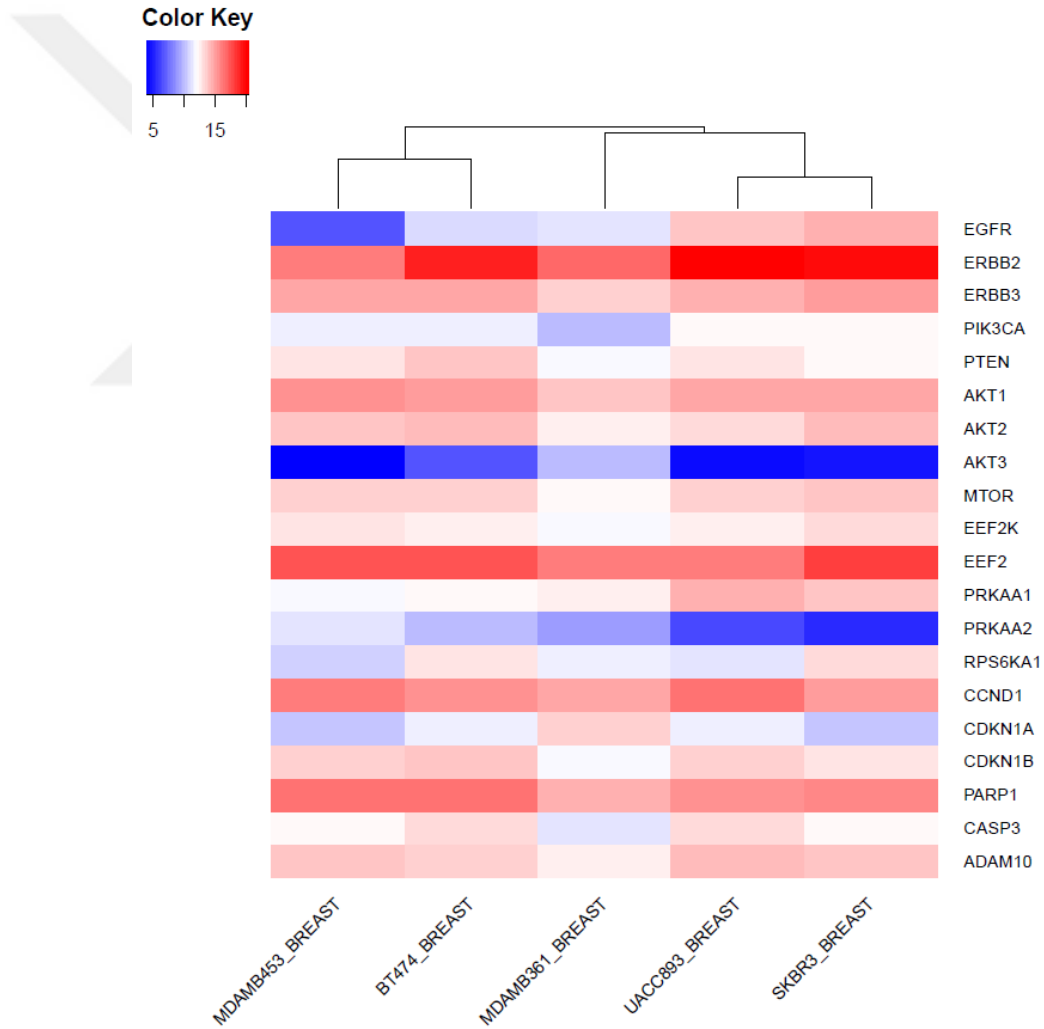
Gen ekspresyon profillerine göre hücre dizileri kümelendirildiğinde BT-474 ile SKBR-3 bir grup, MDA-MB-453 ile UACC-893 ayrı bir grup, MDA-MB-361 ise bu gruplardan bağımsız ayrı bir grup olarak kümelendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin gen ekspresyon profiline göre kümelmesi (GEO: GSE48216)

4.1.3. HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Belirlenen Gen Setinin *CCL*E RNA Sekans Veri Tabanında Değerlendirilmesi ve HER2 Eksprese eden Meme ve Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücre Dizilerinde *KEGG* ve *GSEA* Analizi

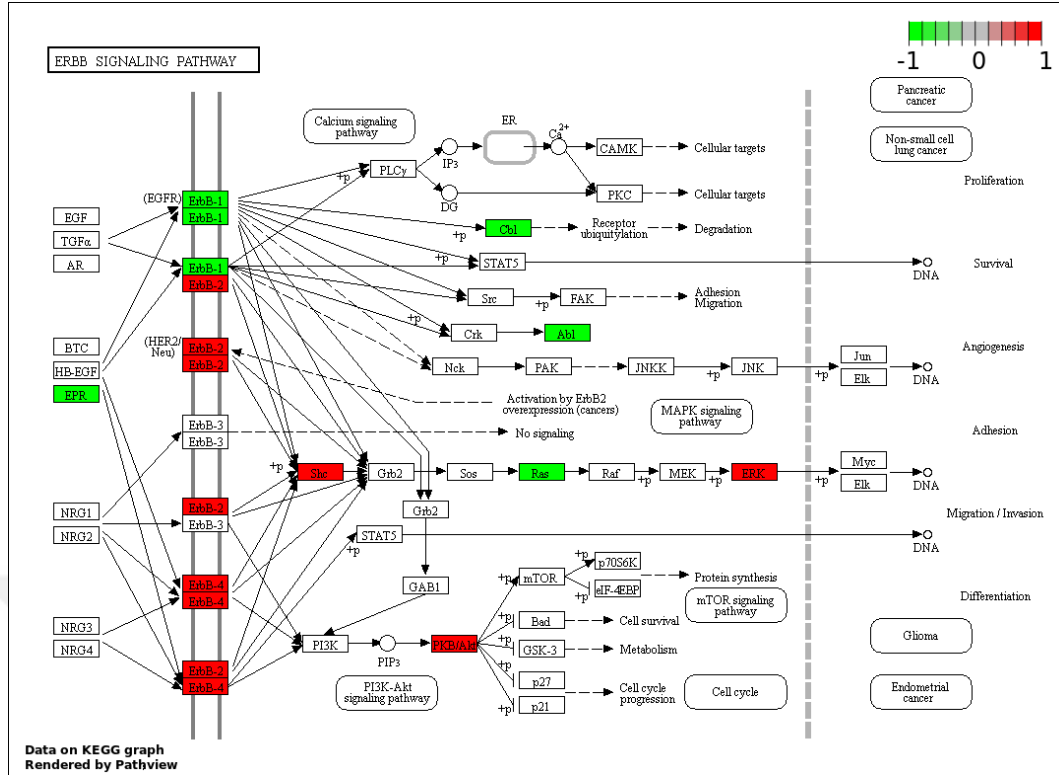
Veri setinde BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin belirlenen gen setindeki bazal ekspresyon düzeyleri incelendi. Gen ekspresyon profillerine göre hücre dizileri kümelendirildiğinde BT-474 ile MDA-MB-453 bir grup, SKBR-3 ile UACC-893 ayrı bir grup, MDA-MB-361 ise bu gruplardan bağımsız ayrı bir grup olarak kümelendi (Şekil 4.3).



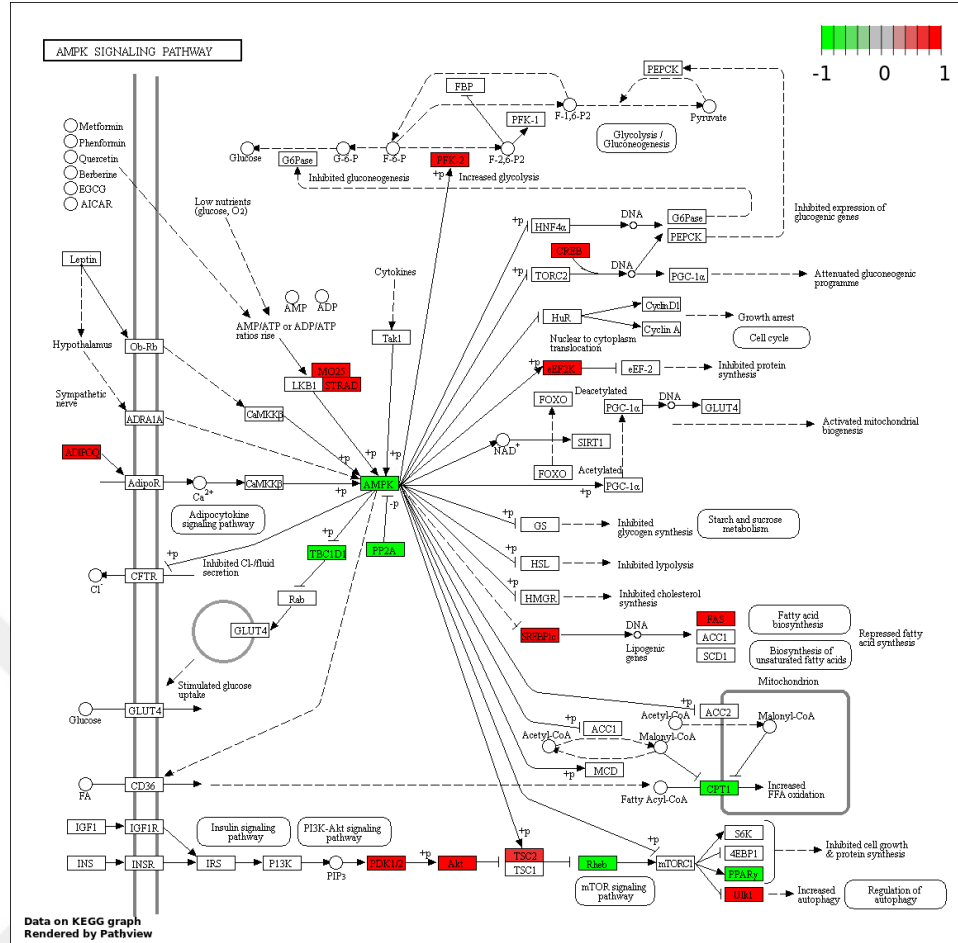
Şekil 4.3. BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 hücre dizilerinin gen ekspresyon profiline göre kümelmesi (*CCL*E, RNA sekans)

4.2. CCLE RNA Sekans Veri Tabanından Elde Edilen Tüm RNA Sekans Verileri ile HER2 Eksprese eden ve Üçlü Negatif Meme Kanseri Hücre Dizilerinde *KEGG* ve *GSEA* Analizi

4 farklı HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizisi (BT-474, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893) ve 4 farklı üçlü negatif meme kanseri hücre dizisi (BT-20, HCC38, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468) tüm RNA sekans verileri CCLE veri tabanından elde edildi. Elde edilen bazal gen ekspresyonları *KEGG* (174) ve *GSEA* (175, 176) analiz sistemleri kullanılarak karşılaştırıldı. *KEGG* analizinde hsa_04012 (ERBB yolağı) (Şekil 4.4) ve hsa_04152 (AMPK yolağı) (Şekil 4.5) yolakları kullanıldı. ERBB yolağında, HER2, HER4, AKT ve ERK bazal RNA ekspresyonlarının HER2 eksprese eden hücre dizilerinde üçlü negatif meme kanseri hücre dizilerine oranla yüksek olduğu tespit edildi. EGFR ve Ras ekspresyonlarının ise HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizilerinde üçlü negatif meme kanseri hücre dizilerine oranla düşük olduğu belirlendi. AMPK yolağında, AMPK ifadesi HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizilerinde düşük olmasına karşın, eEF2K RNA ifadesinin üçlü negatif meme kanseri hücre dizilerine oranla yüksek olduğu belirlendi. Bu durum, HER2 eksprese eden meme kanseri dizilerinde eEF2K aracılı yolak regülasyonunun üçlü negatif meme kanseri hücre dizilerine oranla daha kuvvetli olduğuna ve önemli bir hedef olabileceğine işaret etmektedir.



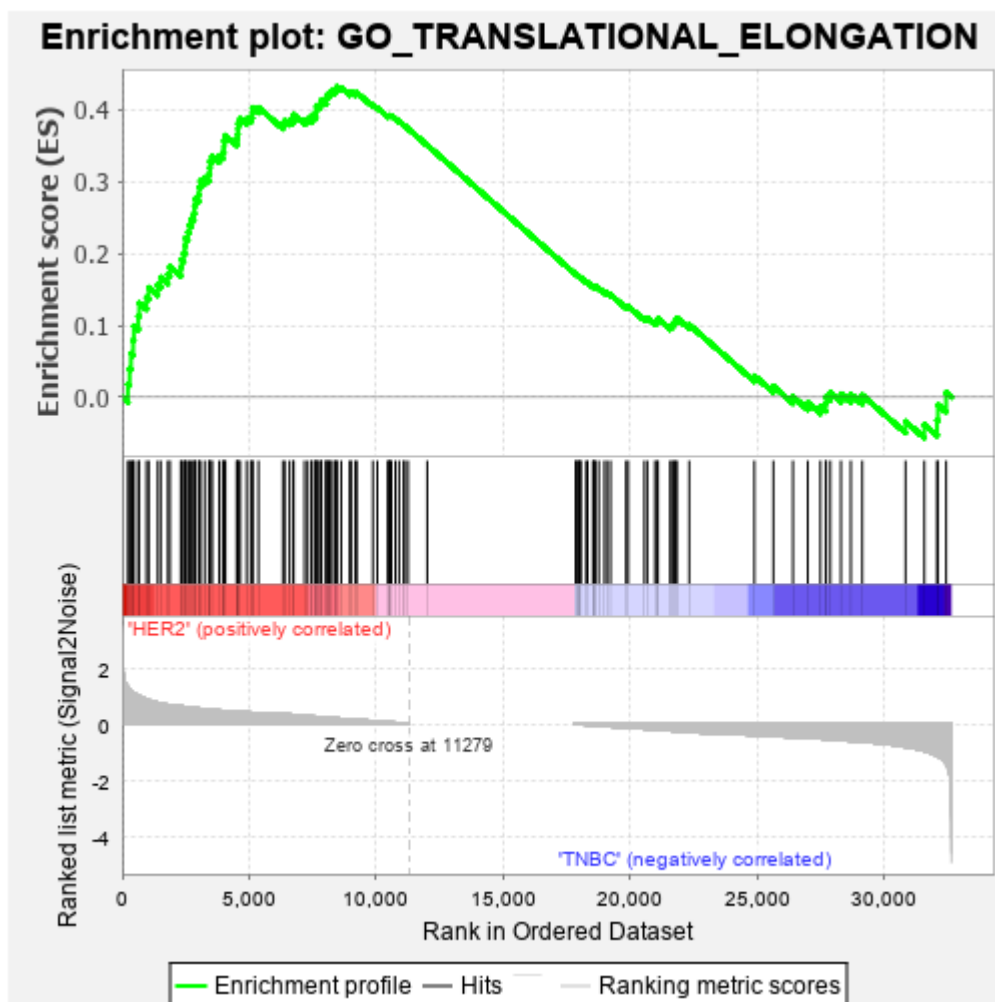
Şekil 4.4. HER2 eksprese eden meme kanseri grubunun üçlü negatif meme kanseri grubuna göre değişen HER2 sinyal yolağı molekülleri (CCLE, RNA sekans)



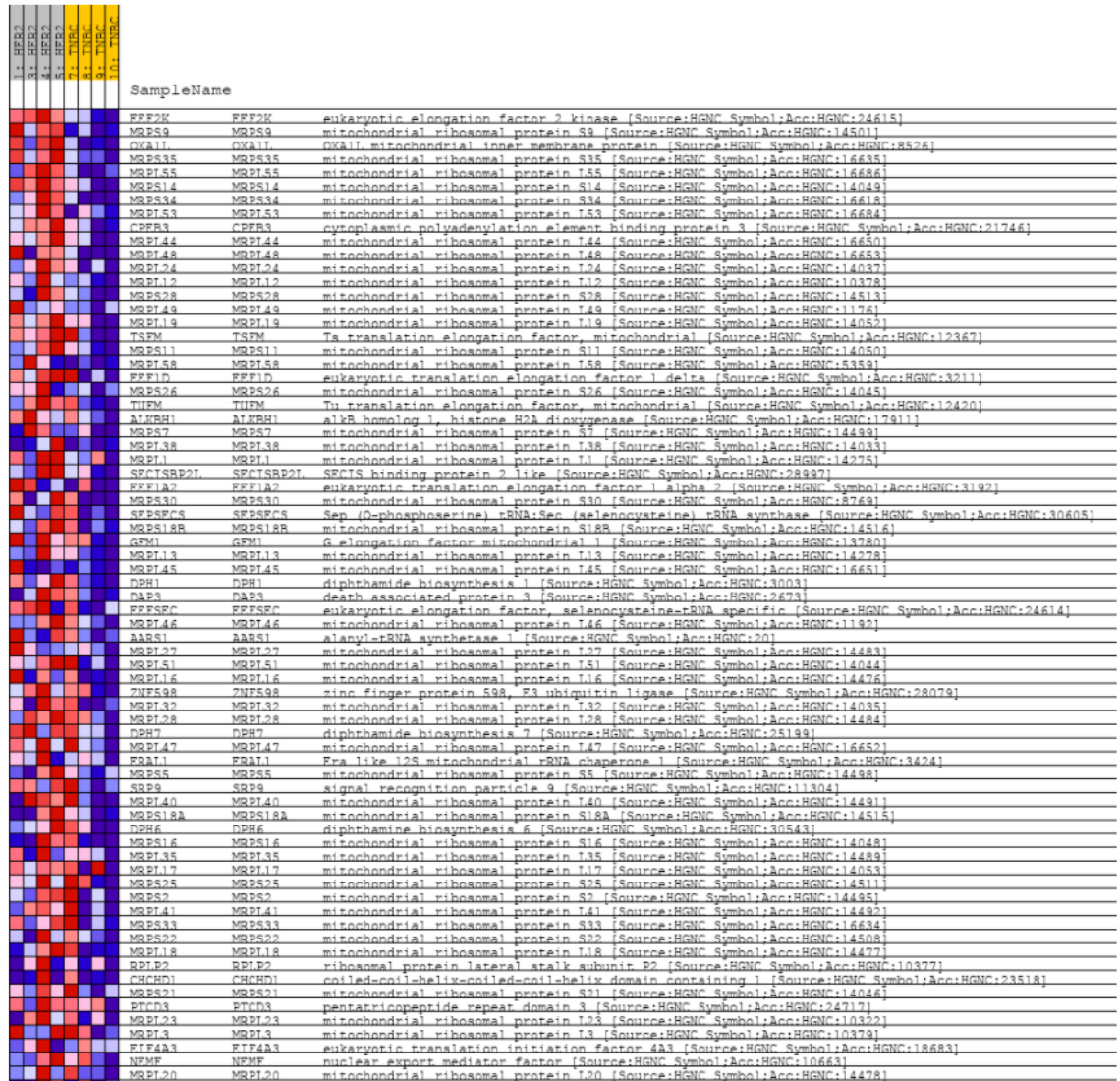
Şekil 4.5. HER2 eksprese eden meme kanseri grubunun üçlü negatif meme kanseri grubuna göre değişen AMPK sinyal yolağı molekülleri (CCLE, RNA sekans)

GSEA analizinde ise, *go_translational_elongation* (Şekil 4.6) ve *st_p38_mapk_pathway* (Şekil 4.7) moleküler imza veri setleri kullanıldı. Her iki analiz sonucunda, eEF2K ekspresyonunun HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizilerinde üçlü negatif meme kanseri hücre dizilerine oranla anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi.

A)

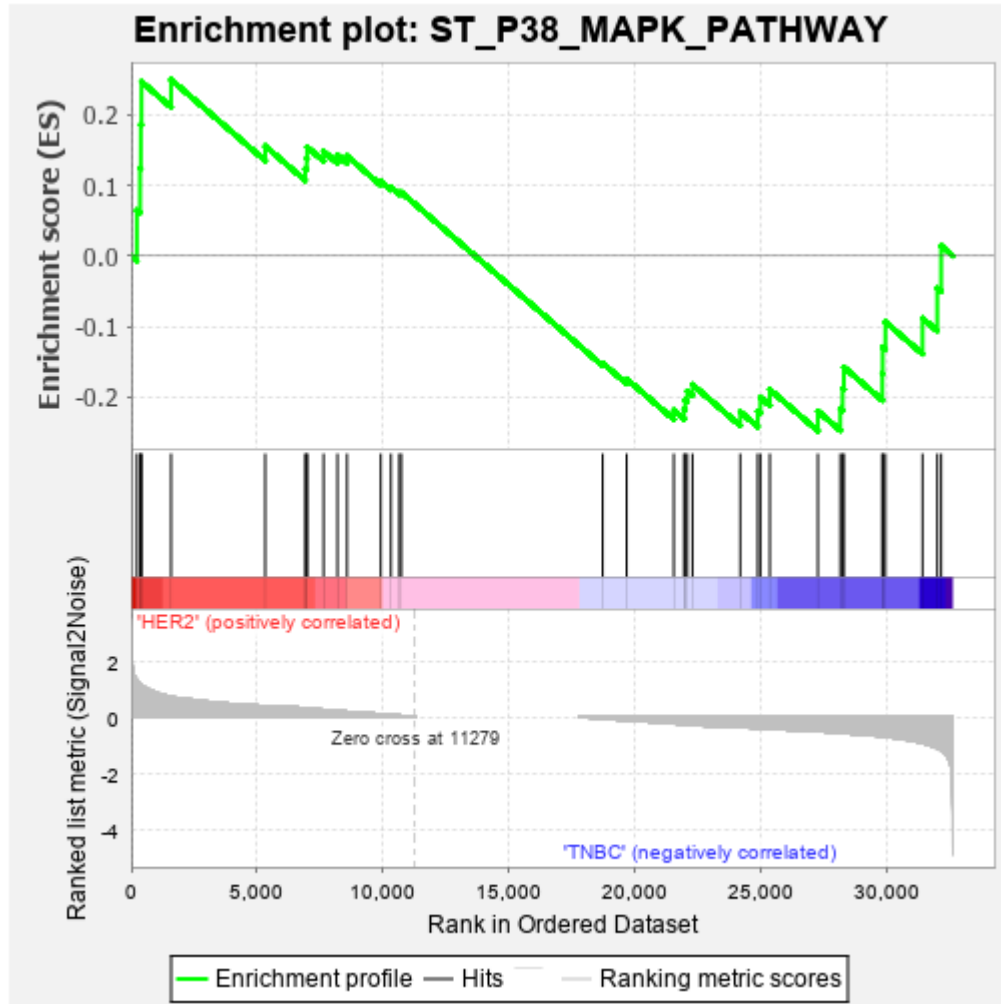


B)

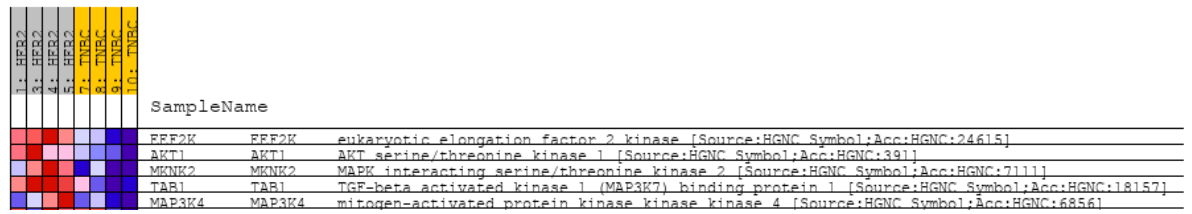


Şekil 4.6. HER2 eksprese eden meme kanseri ve üçlü negatif meme kanseri grupları arasında değişen translasyonel elongasyon moleküllerinin GSEA analiz grafikleri: **A)** Plot analiz grafiği. **B)** Değişen translasyonel elongasyon molekülleri (*core enrichment*) ısı haritası

A)



B)

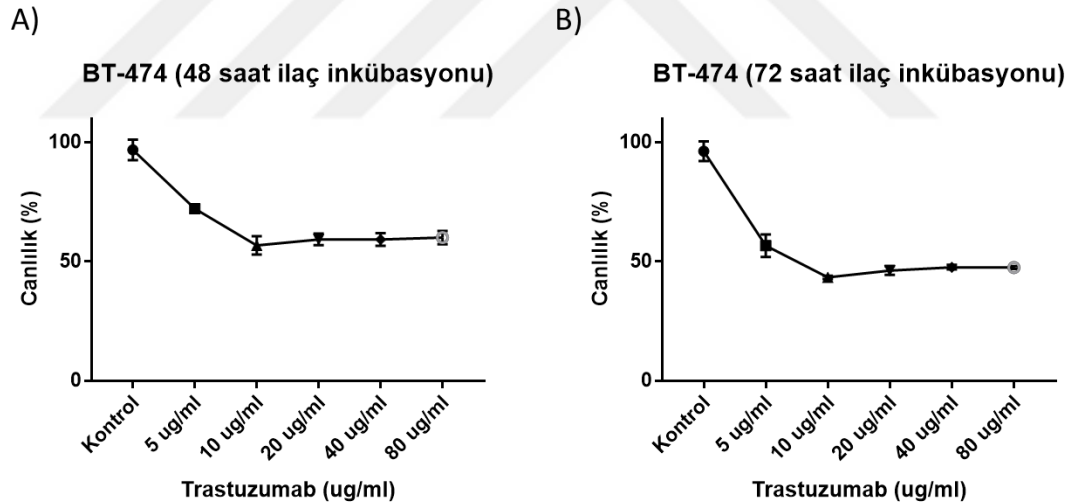


Şekil 4.7. HER2 eksprese eden meme kanseri ve üçlü negatif meme kanseri grupları arasında değişen p38/MAPK moleküllerinin GSEA analiz grafikleri: **A)** Plot analiz grafiği. **B)** Değişen p38/MAPK molekülleri (*core enrichment*) ısı haritası

4.3. Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Trastuzumab İçin Subtoksik Dozun MTT Testi İle Belirlenmesi

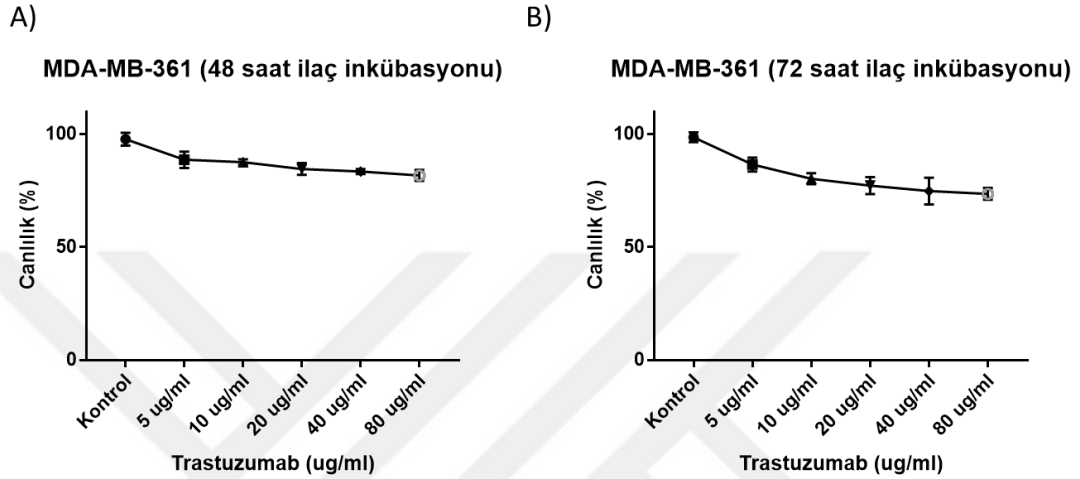
BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizileri 48 ve 72 saat süre ile 5-10-20-40-80 µg/ml trastuzumab ile inkübe edildi. Kontrol kuyularına sadece besiyeri eklendi. Kontrol ve ilaç ile inkübe edilmiş kuyulardaki OD değerleri oranlanarak %canlılık grafiğine dönüştürüldü.

BT-474 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen zamana bağlı hücre canlılığına oranları Şekil 4.8'de gösterilmektedir. 48 saatlik farklı trastuzumab dozlarının inkübasyonu sonucu BT-474 hücrelerinde toksisite gözlemlenmedi. 72 saatlik inkübasyonlarda, 5 µg/ml ilaç dozundan itibaren hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü tespit edildi. 48 saatlik 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu subtoksik olarak seçildi.



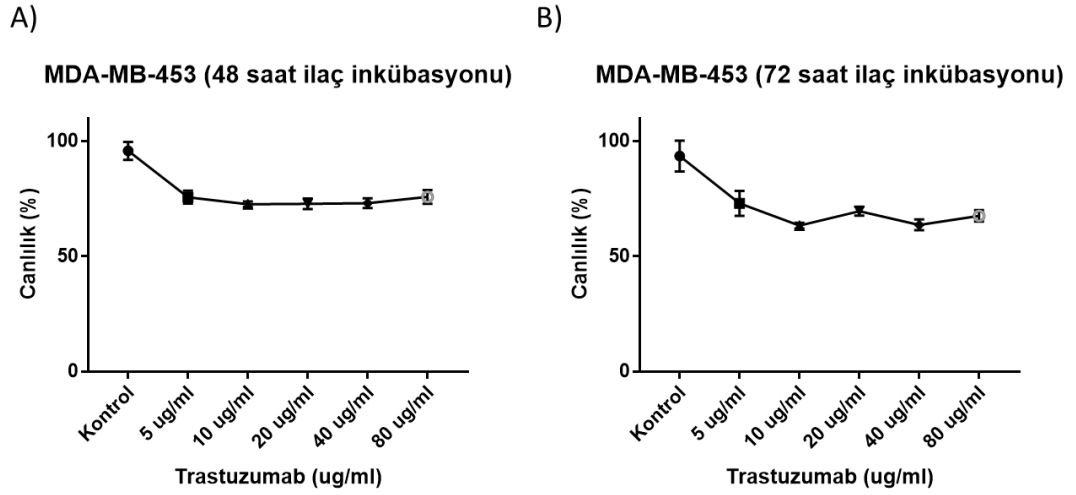
Şekil 4.8. BT-474 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği. **A)** 48 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği, **B)** 72 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği

MDA-MB-361 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen zamana bağlı hücre canlılık oranları Şekil 4.9'da gösterilmektedir. 48 ve 72 saatlik farklı trastuzumab dozlarının inkübasyonu sonucu MDA-MB-361 hücrelerinde toksisite gözlemlenmedi. 48 saatlik 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu subtoksik olarak seçildi.



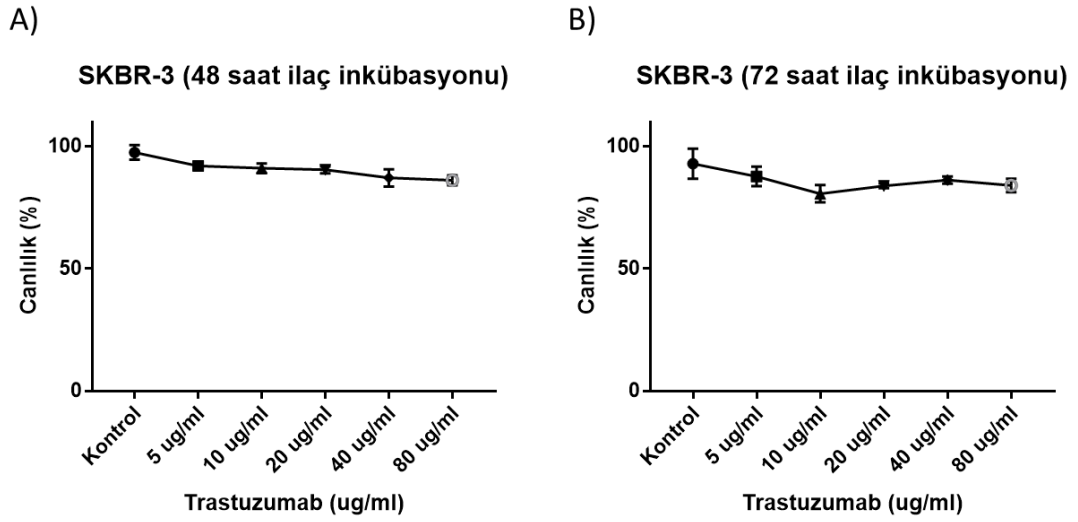
Şekil 4.9. MDA-MB-361 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği. **A)** 48 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği, **B)** 72 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği

MDA-MB-453 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen zamana bağlı hücre canlılık oranları Şekil 4.10'da gösterilmektedir. 48 ve 72 saatlik farklı trastuzumab dozlarının inkübasyonu sonucu MDA-MB-453 hücrelerinde toksisite gözlemlenmedi. 48 saatlik 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu subtoksik olarak seçildi.



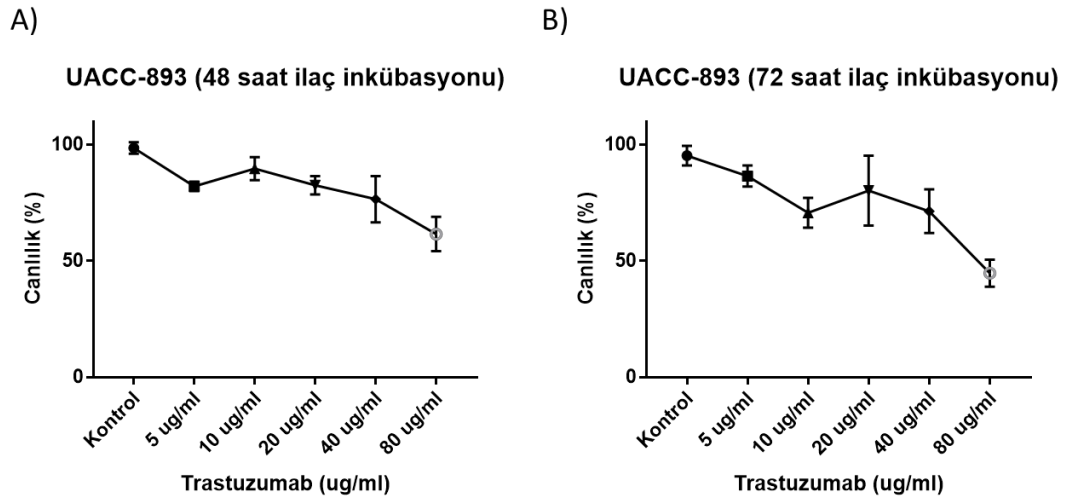
Şekil 4.10. MDA-MB-453 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği. **A)** 48 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği, **B)** 72 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği

SKBR-3 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen zamana bağlı hücre canlılık oranları Şekil 4.11’de gösterilmektedir. 48 ve 72 saatlik farklı trastuzumab dozlarının inkübasyonu sonucu SKBR-3 hücrelerinde toksisite gözlemlenmedi. 48 saatlik 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu subtoksik olarak seçildi.



Şekil 4.11. SKBR-3 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği. **A)** 48 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği, **B)** 72 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği

UACC-893 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen zamana bağlı hücre canlılık oranları Şekil 4.12'de gösterilmektedir. 48 saatlik farklı trastuzumab dozlarının inkübasyonu sonucu UACC-893 hücrelerinde toksisite gözlemlenmedi. 72 saatlik inkübasyonlarda, 80 µg/ml ilaç dozu ile inkübasyon sonucu hücre canlılığının %50'nin altına düştüğü tespit edildi. 48 saatlik 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu subtoksik olarak seçildi.



Şekil 4.12. UACC-893 hücrelerinin farklı trastuzumab dozları ile inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği. **A)** 48 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği, **B)** 72 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen % canlılık grafiği

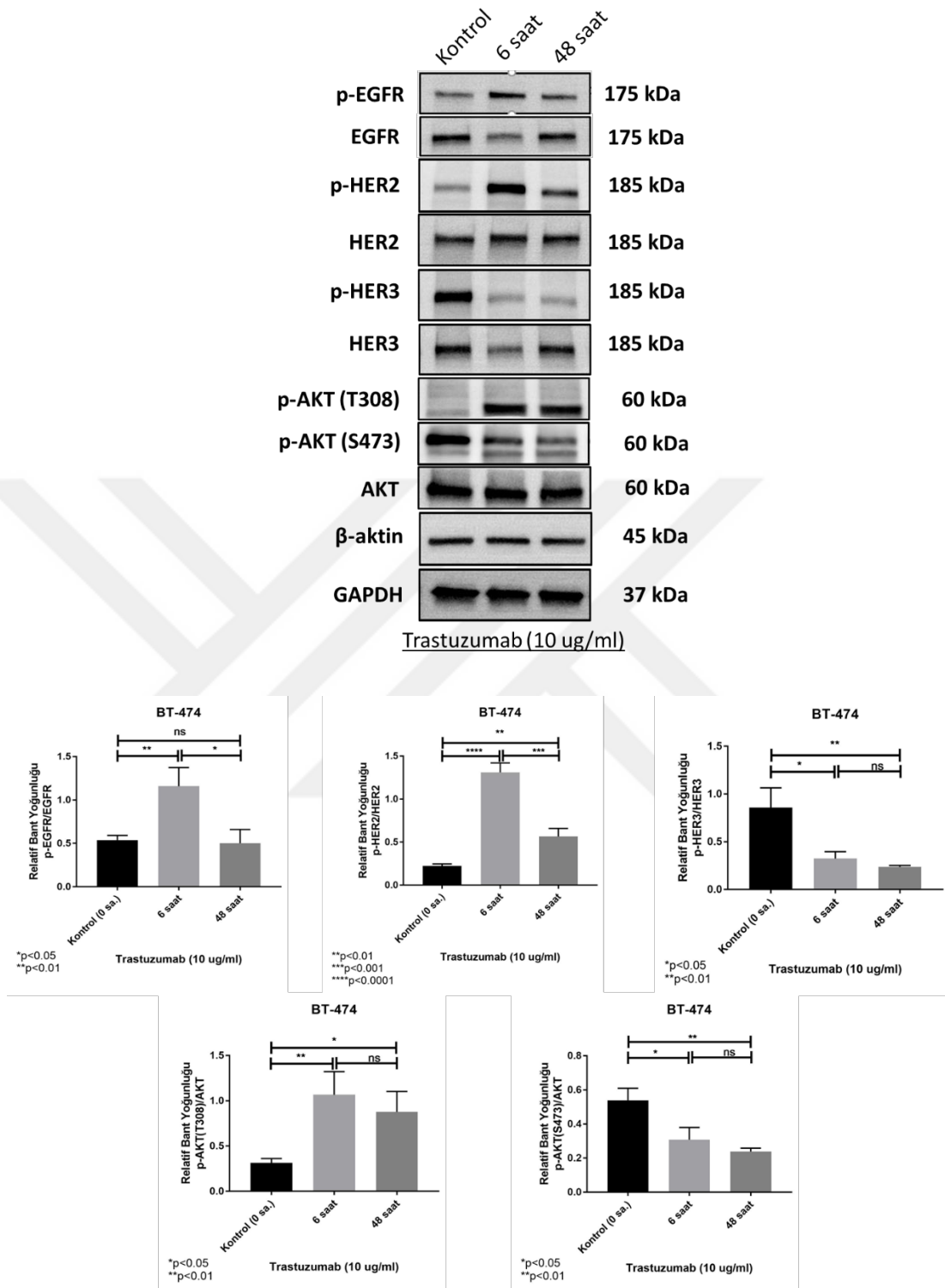
Elde edilen bulgular doğrultusunda, western blot deneyinde kullanılacak optimal trastuzumab inkübasyon süresi 48 saat ilaç dozu 10 µg/ml olarak belirlendi.

4.4. Trastuzumab ile İnkübe Edilmiş HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Yolak Protein İfadelerinin İncelenmesi

BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893 HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizileri 6 ve 48 saat süre ile 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edildi. Kontrol örneklerine (0 saat) sadece besiyeri eklendi. Belirlenen sürelerin sonunda protein lizatları elde edildi. Her koşul için 3 bağımsız deney yapıldı (n=3). Tüm proteinler GAPDH veya β-aktin ile normalize edildi. Devamında fosfo proteinler total proteinlerine oranlanarak protein ifadeleri analiz edildi. Elde edilen veriler bağımsız gruplar student's t testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

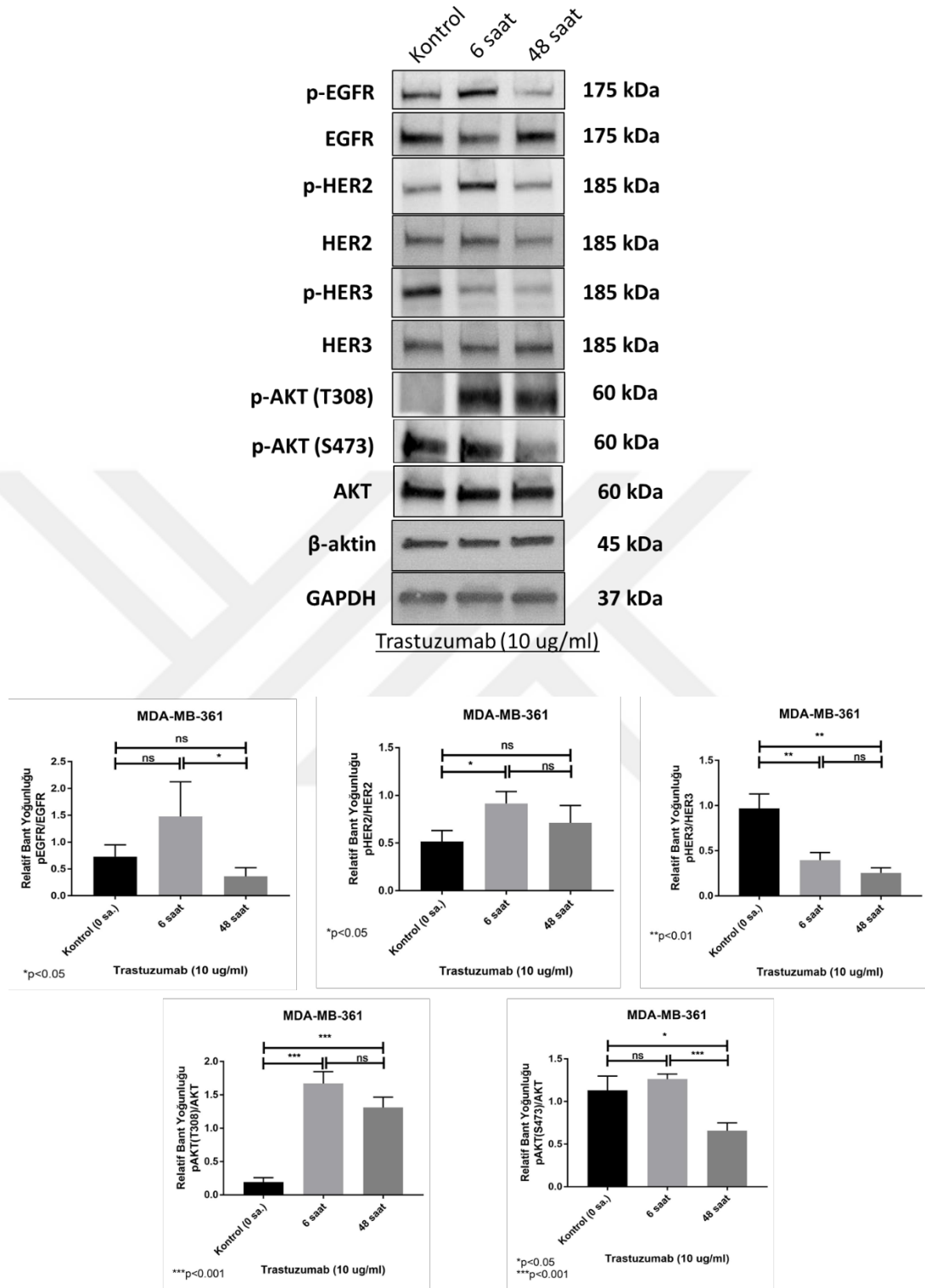
4.4.1. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu EGFR/HER2/HER3/Akt Protein Fosforilasyonlarının Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi

6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinde EGFR ve HER2 protein fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (**p<0.01, ****p<0.0001). 6 saatlik 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu sonucu HER3 protein fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon tespit edildi (*p<0.05). 48 saatlik trastuzumab inkübasyonu sonucu EGFR fosforilasyonu bazal düzeye geriledi ve 6 saatlik etkiye oranla istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon gözlemlendi (*p<0.05). 48 saatlik trastuzumab inkübasyonu sonucu HER2 fosforilasyonunda 6 saatlik etkiye oranla istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon olduğu belirlendi (***p<0.001). Ancak bu inhibisyon sonucu HER2 fosforilasyonunun istatistiksel anlamlı olarak bazal düzeyin üzerinde olduğu görüldü (**p<0.01). 48 saatlik trastuzumab inkübasyonu sonucu HER3 fosforilasyonu kontrol örneklerine oranla istatistiksel anlamlı olarak 6 saatlik inhibisyona göre daha fazla inhibe olduğu tespit edildi (**p<0.01). 6 ve 48 saatlik ilaç inkübasyonları sonucu kontrol hücrelerine oranla Akt proteini treonin 308 (T308) fosforilasyon bölgesi anlamlı olarak aktive olmakta, bu durumun aksine diğer bir Akt fosforilasyon bölgesi olan serin 473 (S473) bölgesi anlamlı olarak inhibe olmaktadır (*p<0.05, **p<0.01) (Şekil 4.13).



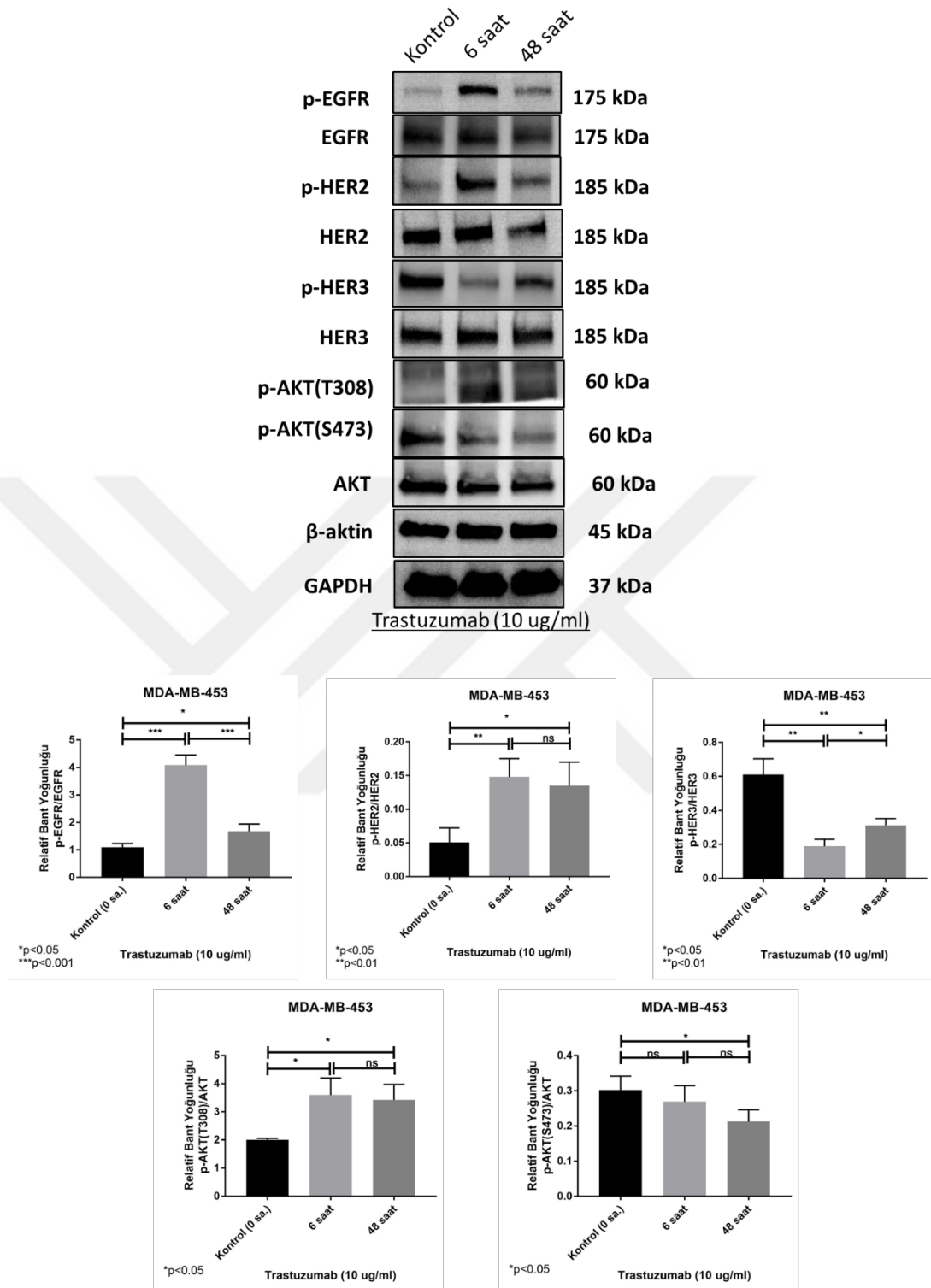
Şekil 4.13. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde EGFR protein fosforilasyonu istatistiksel anlamlı olarak baskılandığı tespit edildi (* $p<0.05$). 6 saatlik 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu sonucu HER2 protein fosforilasyonunda istatistiksel anlamlı olarak aktive olduğu belirlendi. (* $p<0.05$). Bu anlamlılık 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu kaybolduğu tespit edildi. 6 ve 48 saatlik trastuzumab inkübasyonu sonucu HER3 fosforilasyonu istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon gözlemlendi (** $p<0.01$). 6 ve 48 saatlik ilaç inkübasyonları sonucu kontrol hücrelerine oranla Akt proteini treonin 308 (T308) fosforilasyon bölgesi anlamlı olarak aktive olmaktadır (** $p<0.001$). 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu Akt proteini fosforilasyon bölgesi olan serin 473 (S473) bölgesinde anlamlı bir değişiklik olmamasına karşın, 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu Akt proteini S473 fosforilasyonu istatistiksel anlamlı olarak inhibe olmaktadır (* $p<0.05$) (Şekil 4.14).



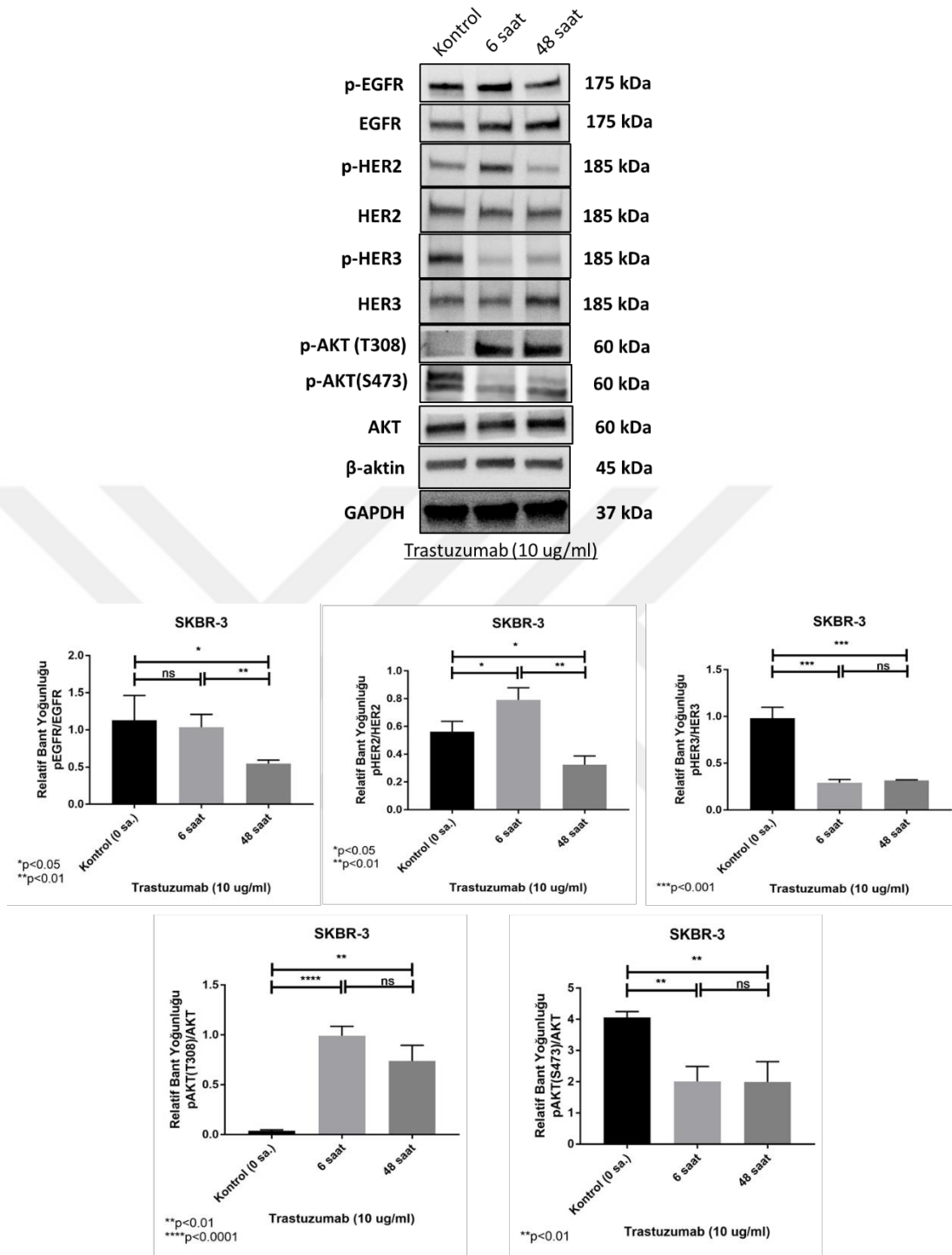
Şekil 4.14. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 μ g/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-453 hücrelerinde EGFR ve HER2 protein fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (**p<0.001, *p<0.01). 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu artan EGFR fosforilasyonu, 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu istatistiksel anlamlı olarak baskılanmıştır (**p<0.001). 48 saatlik ilaç inkübasyonu HER2 fosforilasyonu 6 saatlik etki ile benzer olduğu gözlemlendi. 6 ve 48 saatlik 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu sonucu HER3 protein fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon tespit edildi (*p<0.01). 6 ve 48 saatlik ilaç inkübasyonları sonucu kontrol hücrelerine oranla Akt proteini T308 fosforilasyon bölgesi anlamlı olarak aktive olmaktadır (*p<0.05). Bu duruma zıt olarak, Akt proteini S473 fosforilasyon bölgesi 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucunda istatistiksel anlamlı olarak inhibe olmaktadır (*p<0.05) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

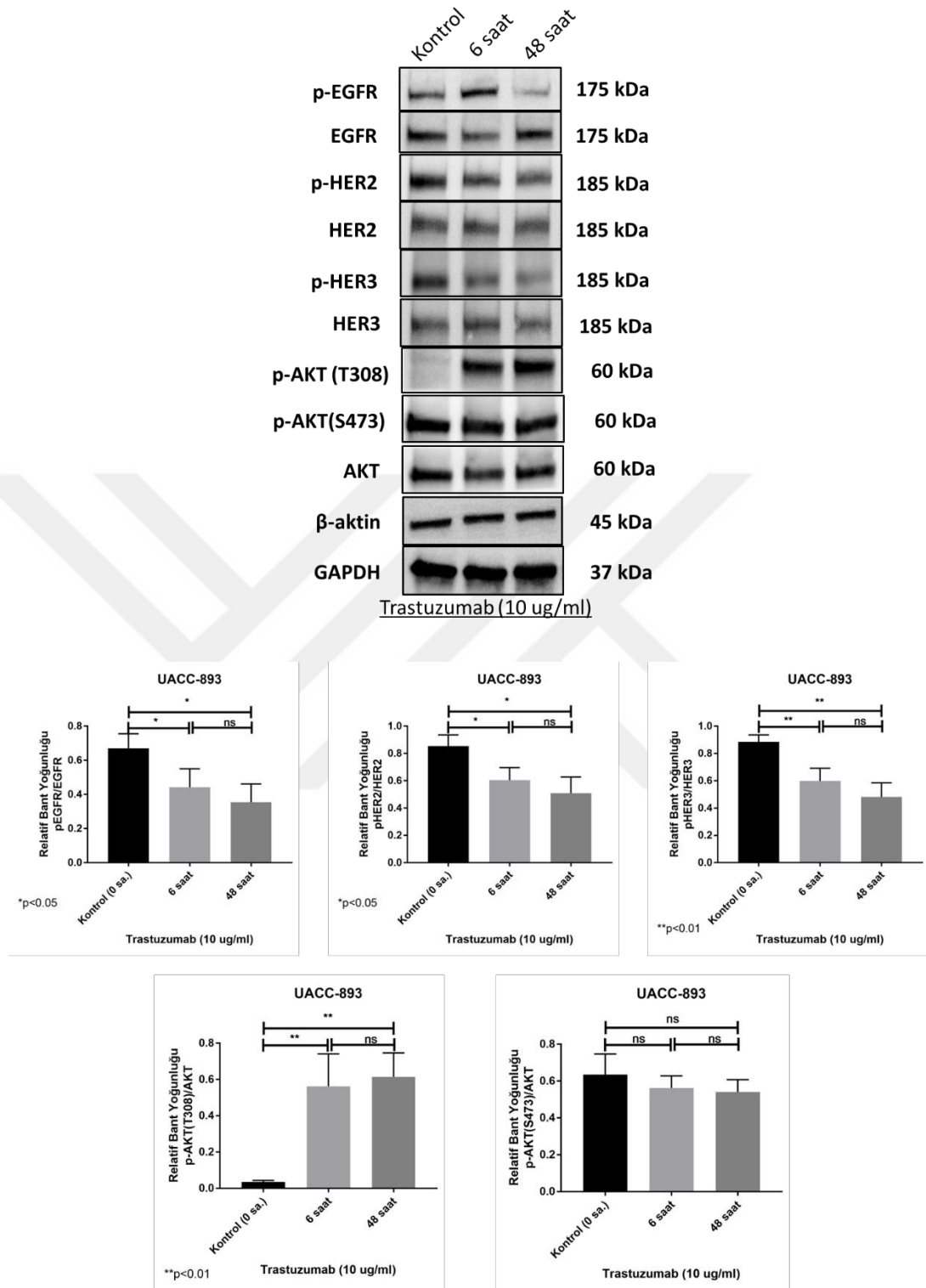
10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinde EGFR protein fosforilasyonunun zamana bağlı olarak azaldığı ve 48 saatlik inkübasyonun kontrol hücrelerine oranla istatistiksel olarak anlamlı baskılandığı tespit edildi (* $p<0.05$). 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu artan HER2 fosforilasyonu, 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu istatistiksel anlamlı olarak baskılanmıştır (* $p<0.05$). 6 ve 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu HER3 fosforilasyonu kontrol hücrelerine oranla istatistiksel anlamlı olarak baskılanmaktadır (** $p<0.001$). 6 ve 48 saatlik ilaç inkübasyonları sonucu kontrol hücrelerine oranla Akt proteini T308 fosforilasyon bölgesi anlamlı olarak aktive olmaktadır (**** $p<0.0001$, ** $p<0.01$). Bu duruma zıt olarak, Akt proteini S473 fosforilasyon bölgesi 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucunda istatistiksel anlamlı olarak inhibe olmaktadır (** $p<0.01$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde EGFR, HER2 ve HER3 protein fosforilasyonlarının zamana bağlı olarak istatistiksel anlamlı olarak baskılandığı tespit edildi (* $p<0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$). 6 ve 48 saatlik ilaç inkübasyonları sonucu kontrol hücrelerine oranla Akt proteini T308 fosforilasyon bölgesi anlamlı olarak aktive olmaktadır (** $p<0.01$). Akt proteini S473 fosforilasyon bölgesinde ilaç ile inkübe edilen hücrelerde kontrol hücrelerine oranla aktivasyonun azaldığı ancak bu baskılanmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.17).

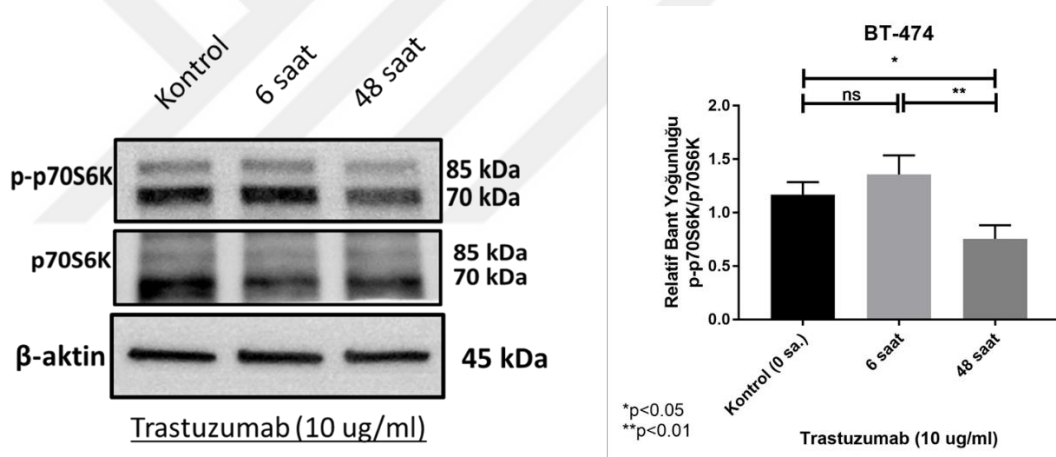




Şekil 4.17. UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 μ g/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total EGFR/HER2/HER3/Akt sinyal yolağı protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

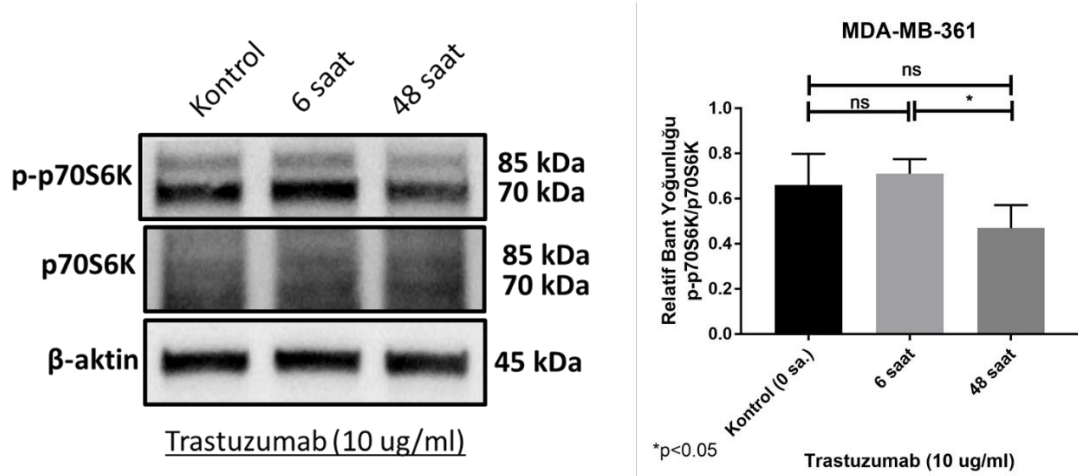
4.4.2. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu p70S6K Protein Fosforilasyonunun Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi

6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p70S6K protein aktivasyonunda artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu hem kontrol hücrelerine hem de 6 saatlik ilaç inkübasyon örneklerine oranla p70S6K protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir baskılanma olduğu tespit edildi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 6 saatlik ilaç ile inkübe BT-474 hücrelerine oranla p-p70S6K protein ekspresyonunda anlamlı azalış görülmektedir. p70S6K protein ekspresyonunda ise, 6 saatlik ilaç inkübe örneklerin kontrol örneklerine oranla azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



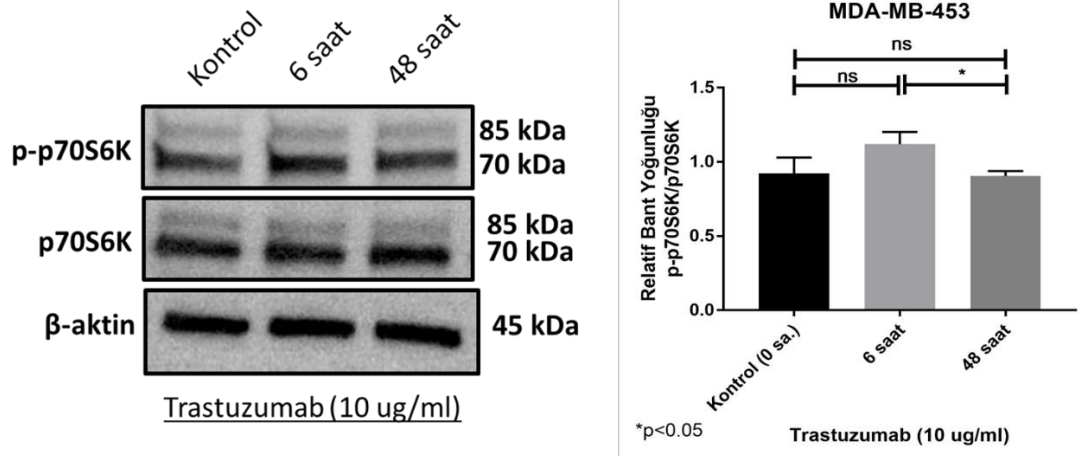
Şekil 4.18. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein ekspresyon görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p70S6K protein aktivasyonunda herhangi bir değişiklik olmadığı belirlendi. 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu p70S6K aktivasyonu 6 saatlik ilaç inkübasyonu örneklerine oranla istatistiksel anlamlı olarak baskılanma tespit edildi (* $p < 0.05$) (Şekil 4.19).



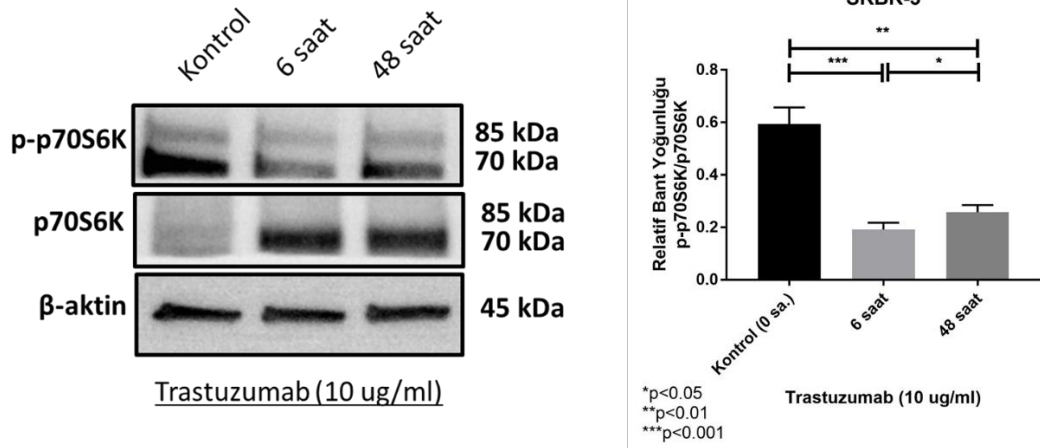
Şekil 4.19. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p70S6K protein aktivasyonunda artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu p70S6K aktivasyonu 6 saatlik ilaç inkübasyonu örneklerine oranla istatistiksel anlamlı olarak baskılanma tespit edildi (*p<0.05) (Şekil 4.20).



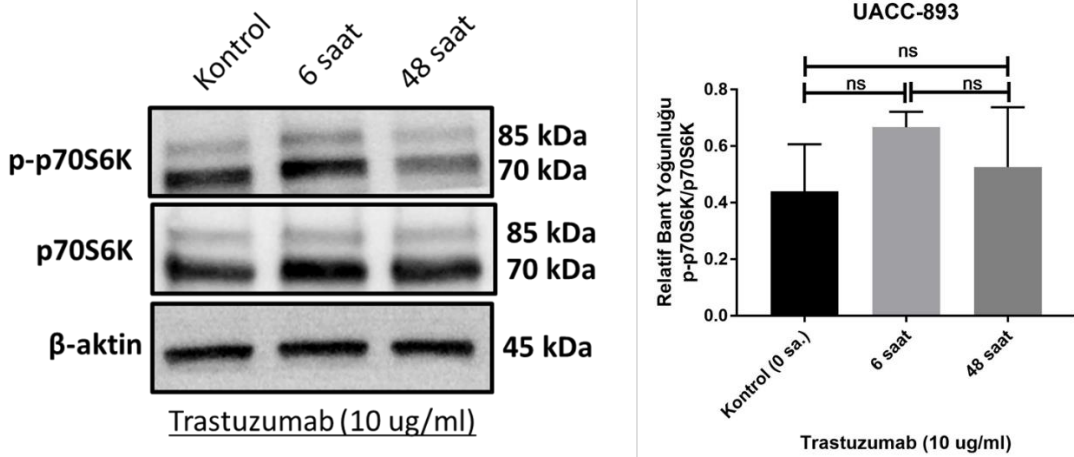
Şekil 4.20. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p70S6K protein aktivasyonunda istatistiksel anlamlı olarak baskılanma tespit edildi (**p<0.001). Bu durumun 48 saatlik ilaç inkübasyonunda da devam ettiği belirlendi (**p<0.01). Ek olarak, 6 ve 48 saatlik ilaç ile inkübe edilmiş örnekler karşılaştırıldığında, 6 saatlik etkiye oranla 48 saatlik ilaç inkübe edilen örneklerde p70S6K protein aktivasyonunda istatistiksel olarak artış olduğu belirlendi (*p<0.05) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 μ g/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

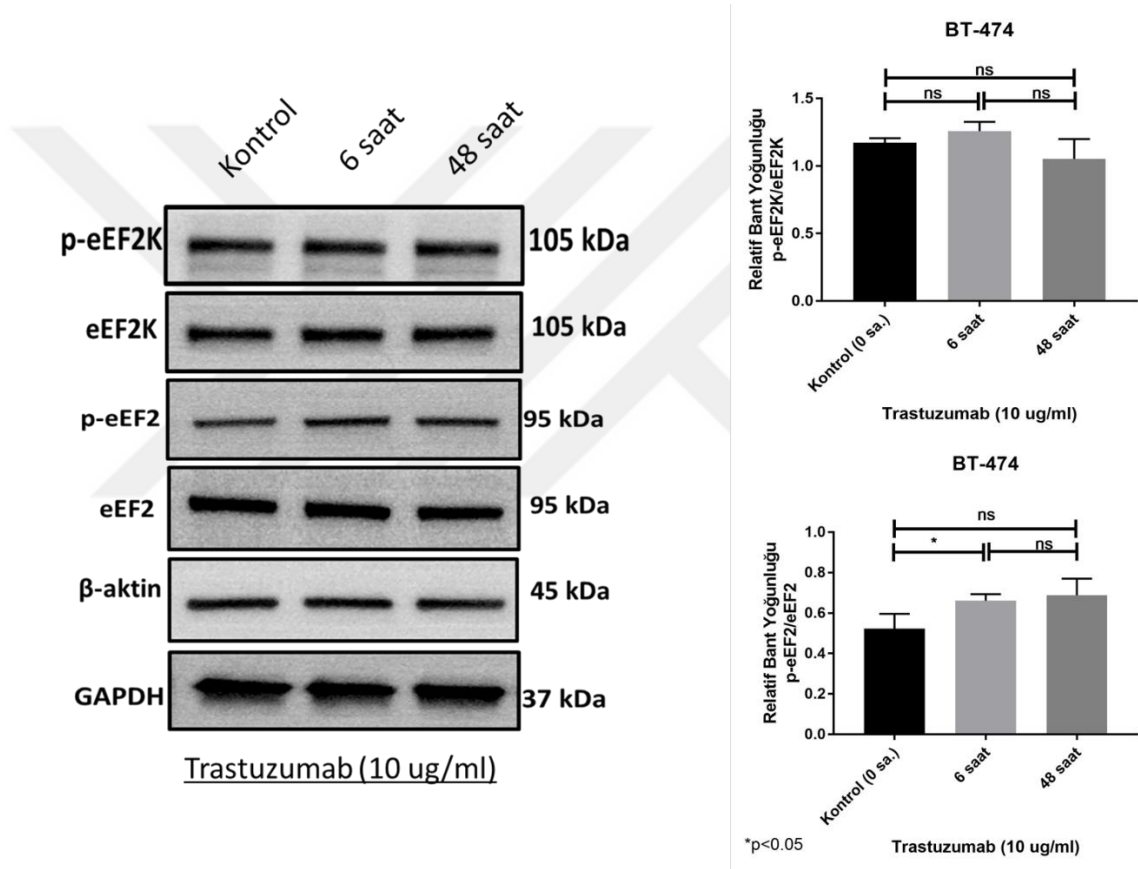
6 saat süresince 10 μ g/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p70S6K protein artış, 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucunda bu artışın kaybolduğu ancak oluşan etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 μ g/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total p70S6K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

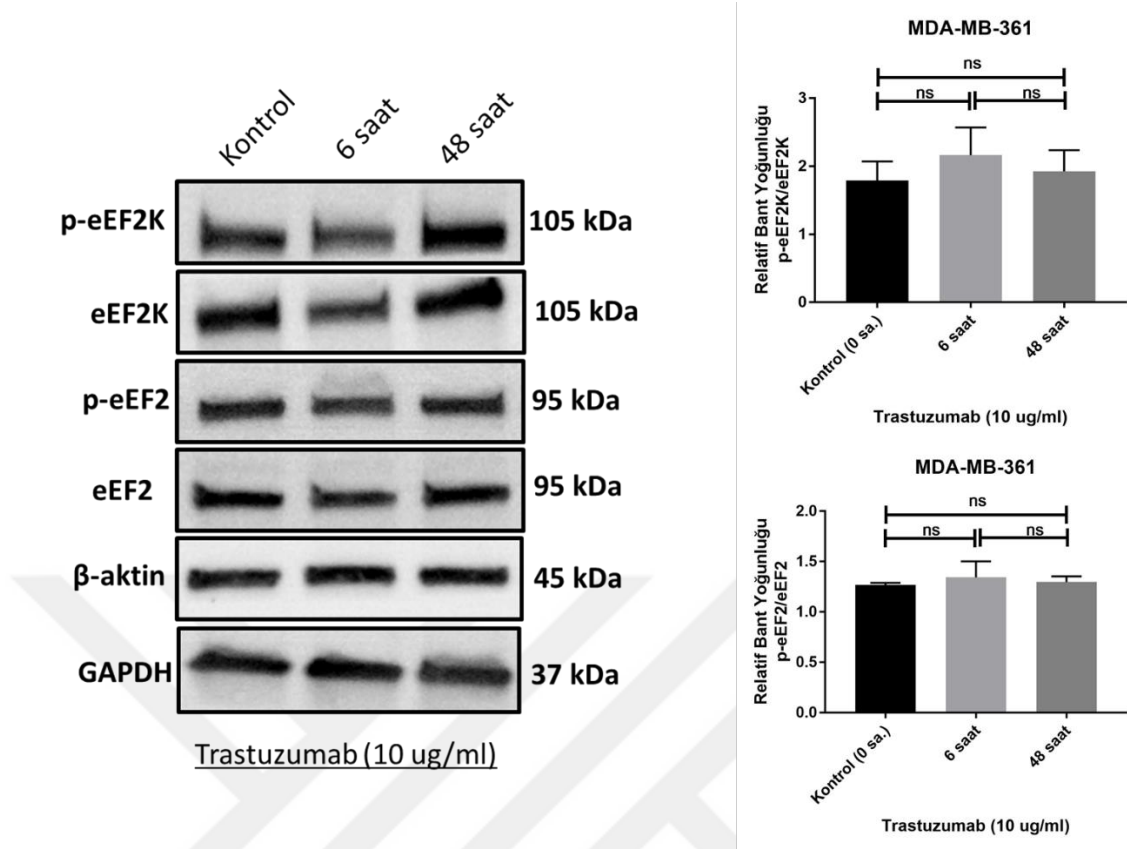
4.4.3. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu eEF2K/eEF2 Protein Fosforilasyonlarının Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla eEF2K protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. 6 saatlik trastuzumab inkübasyonu sonucu eEF2 protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü (* $p < 0.05$) (Şekil 4.23).



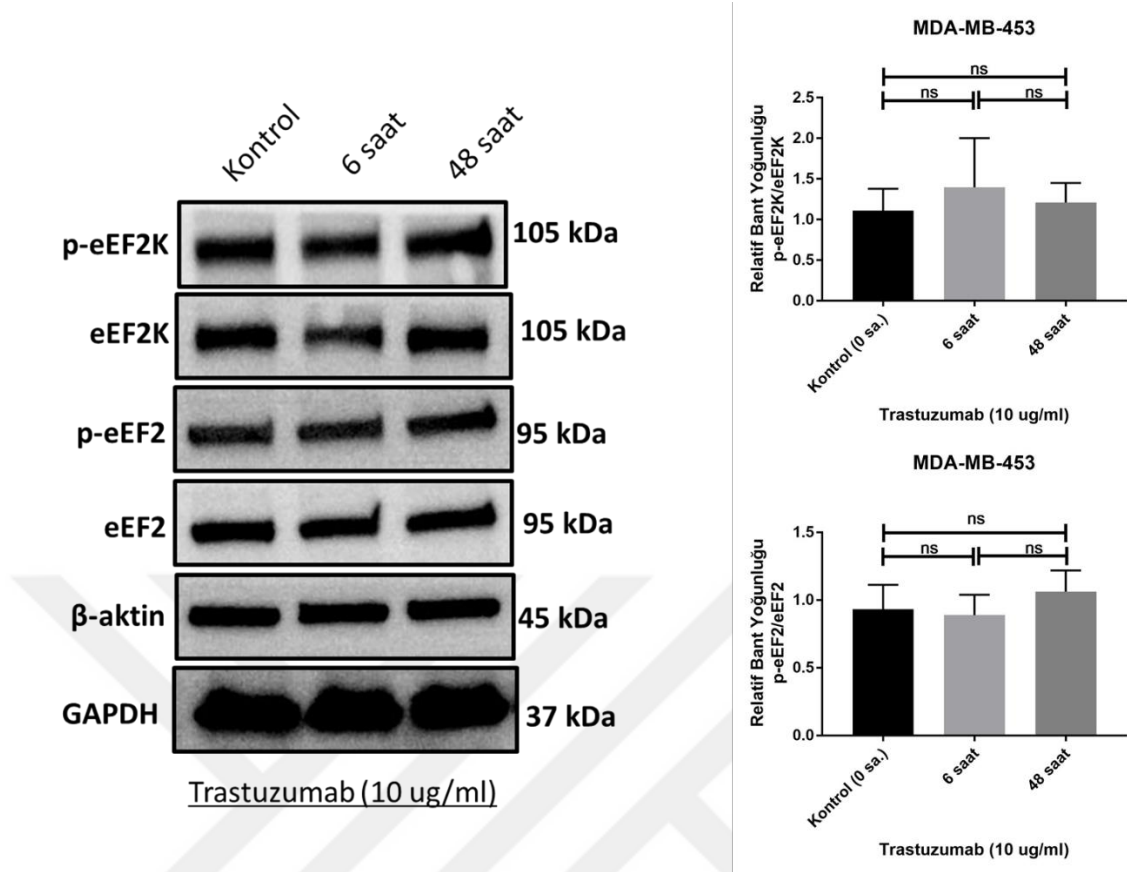
Şekil 4.23. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total eEF2K ve eEF2 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla eEF2 ve eEF2K protein aktivasyonlarında değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.24).



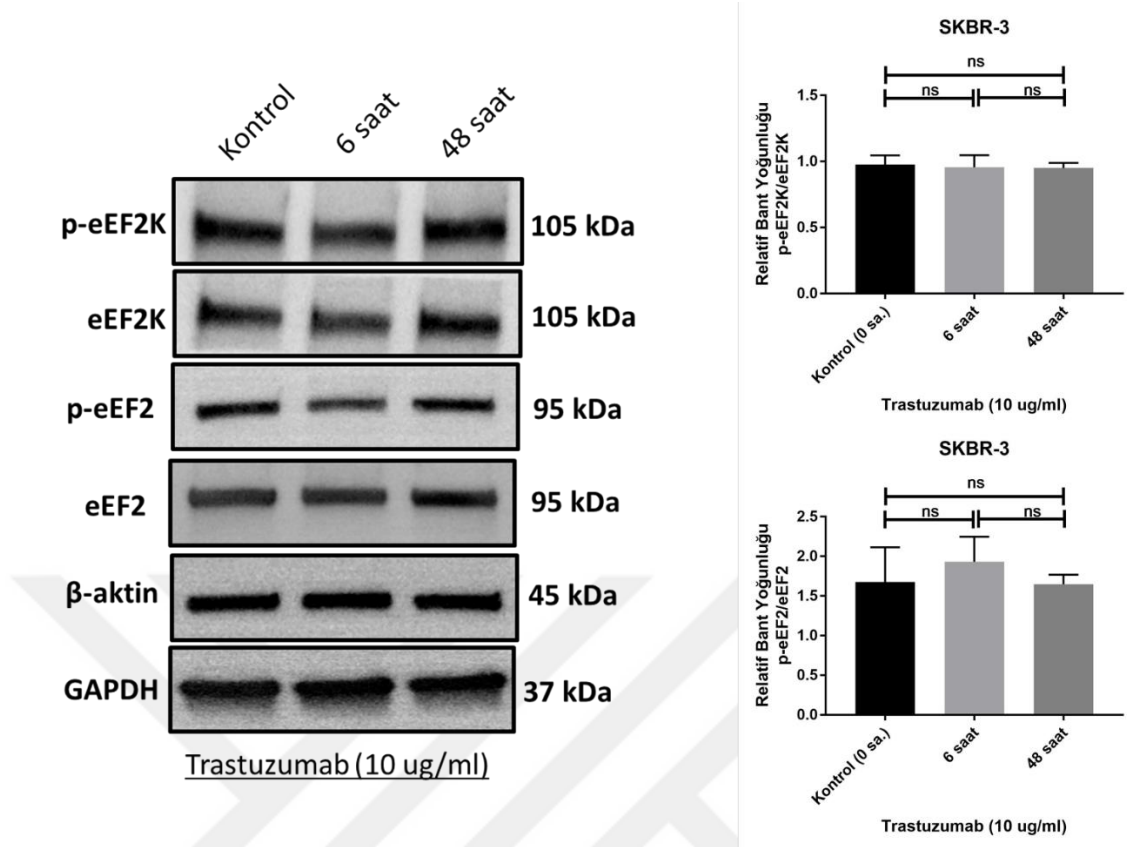
Şekil 4.24. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total eEF2K ve eEF2 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-453 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla eEF2K protein aktivasyonu artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Trastuzumab ile inkübe edilen hücrelerde eEF2 protein aktivasyonunda değişiklik olmadığı belirlendi (Şekil 4.25).



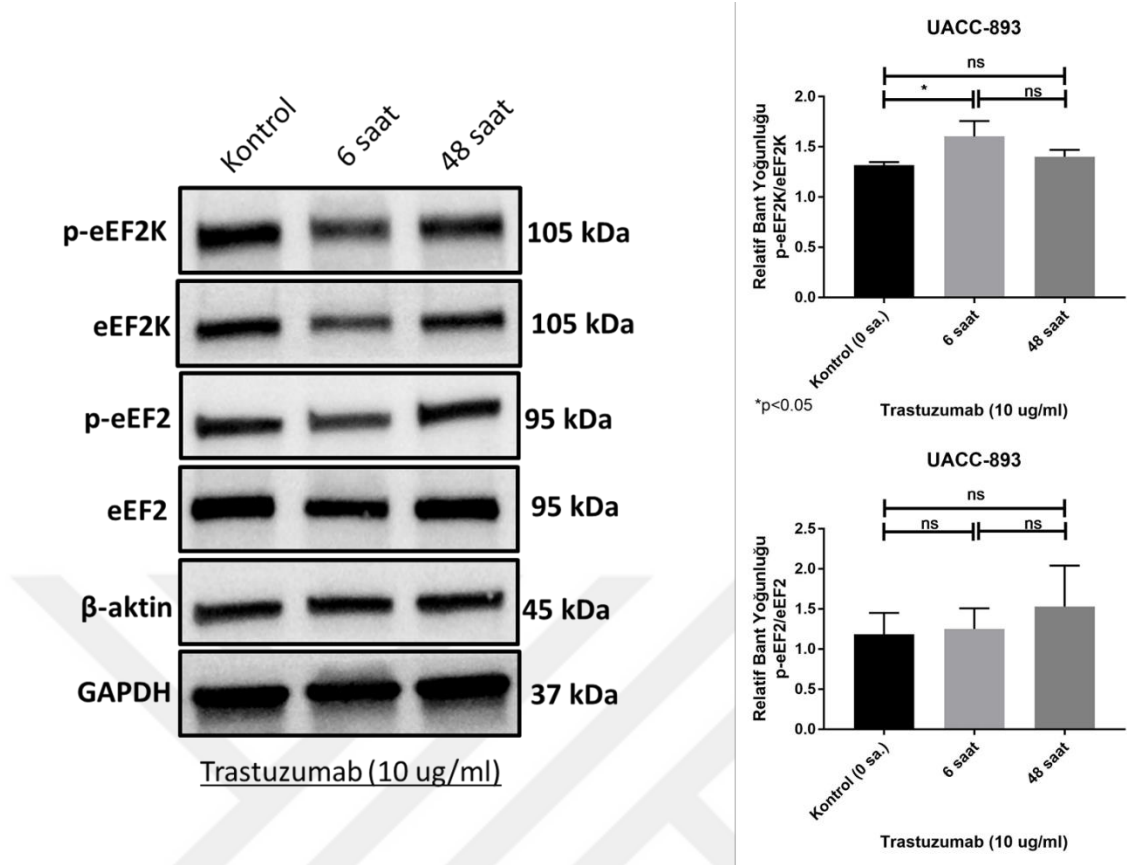
Şekil 4.25. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total eEF2K ve eEF2 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla eEF2 ve eEF2K protein aktivasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total eEF2K ve eEF2 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

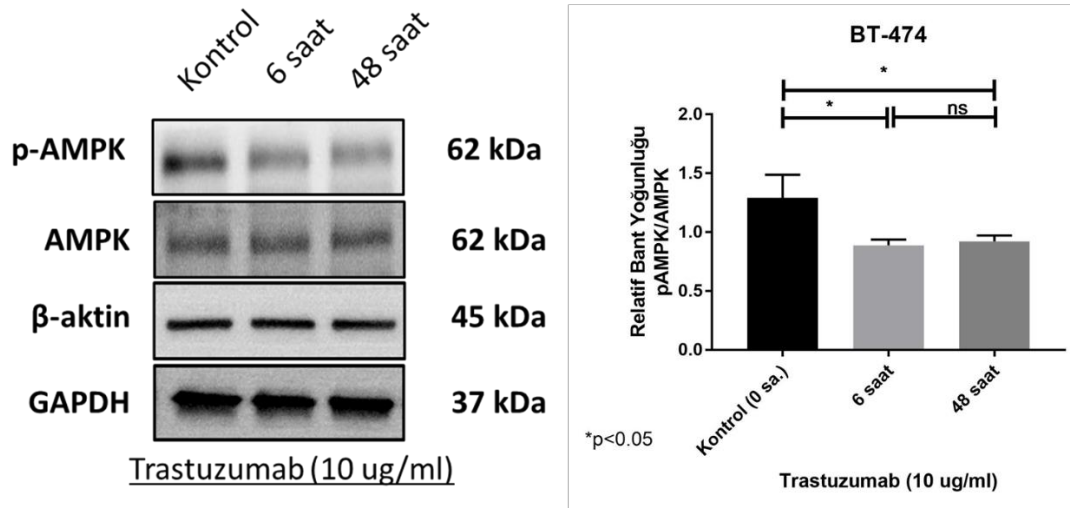
6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla eEF2K protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonuç kontrol hücrelerine oranla eEF2 protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (* $p < 0.05$) (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total eEF2 ve eEF2K protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

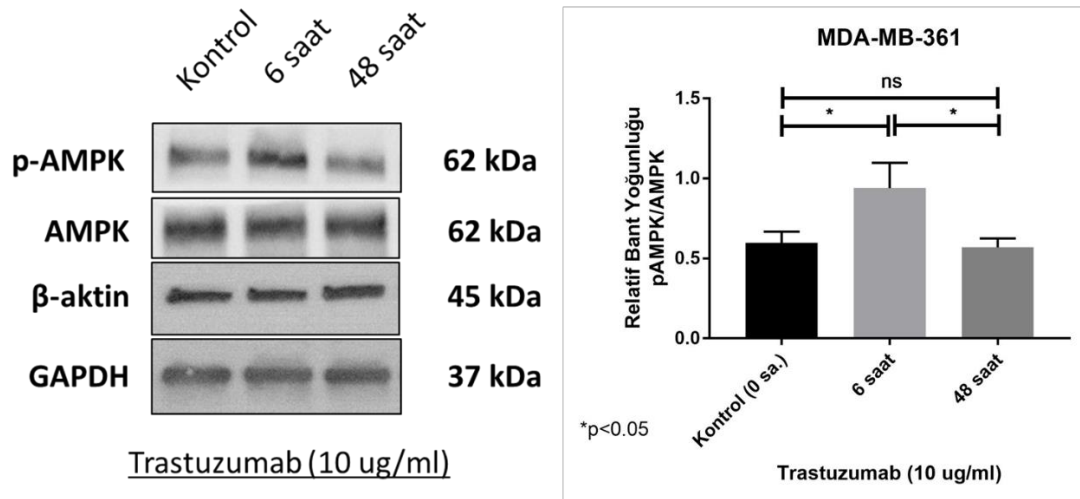
4.4.4. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu AMPK Protein Fosforilasyonunun Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla AMPK protein aktivasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir baskılanma tespit edildi (*p<0.05) (Şekil 4.28).



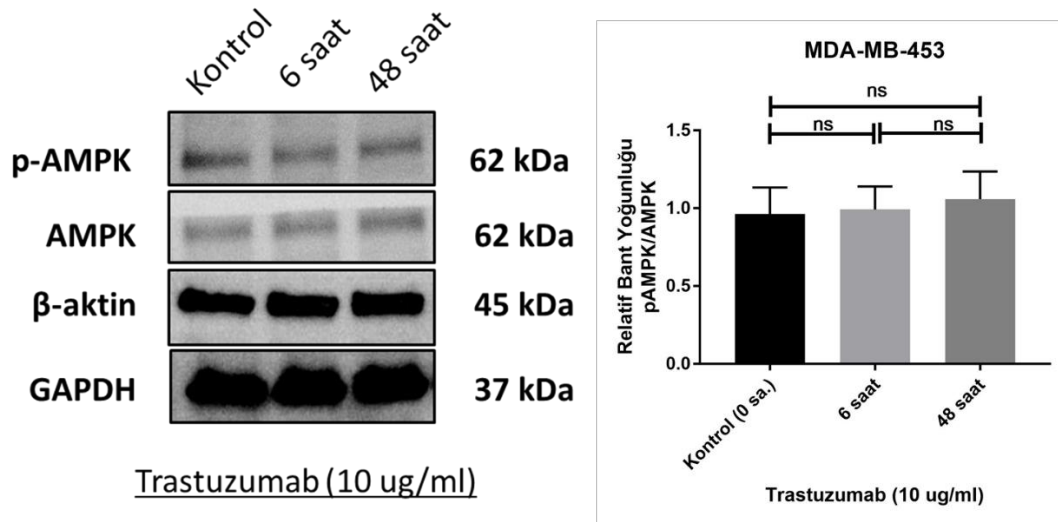
Şekil 4.28. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla AMPK protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış, 48 saat süresince ilaç ile inkübe edilmiş örneklerde ise 6 saat ilaç ile inkübe edilmiş örneklere oranla istatistiksel olarak anlamlı baskılanma görüldü (*p<0.05). 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu azalan protein aktivasyonunun kontrol hücrelerindeki aktivasyon düzeyinde olduğu tespit edildi (Şekil 4.29).



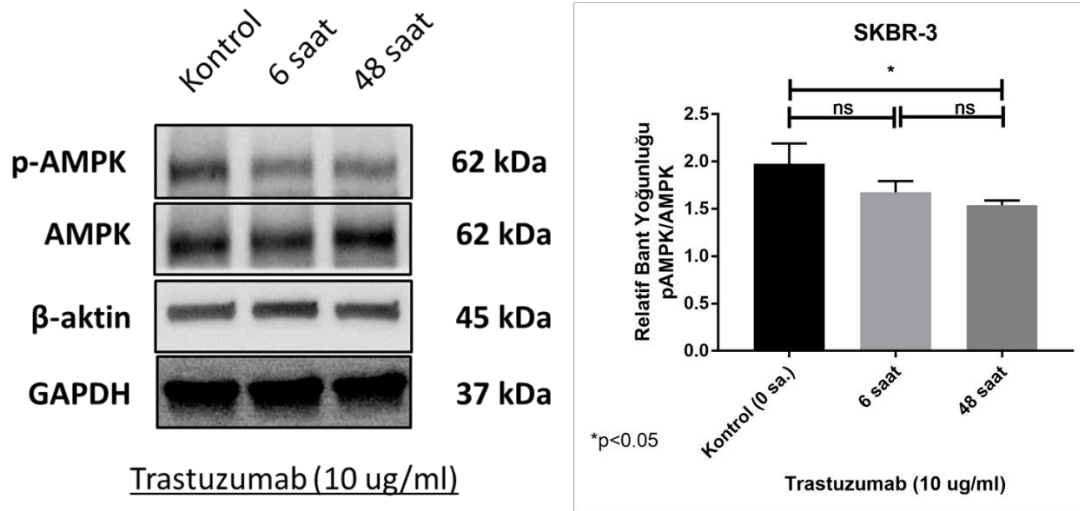
Şekil 4.29. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-453 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla AMPK protein aktivasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.30).



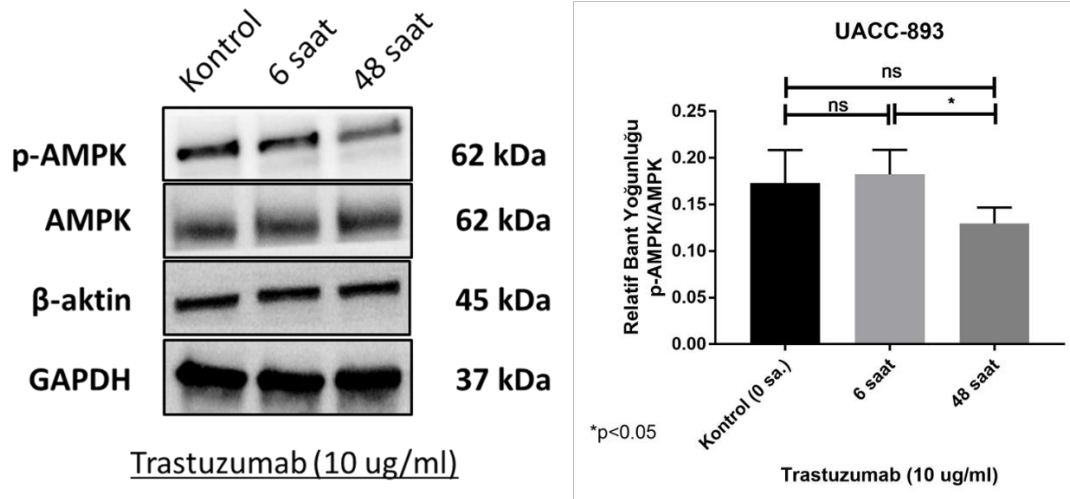
Şekil 4.30. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla AMPK protein aktivasyonlarında kademeli olarak baskılanma tespit edildi. 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu azalan AMPK aktivasyonunun kontrol hücrelerine oranla istatistiksel olarak anlamlılığı olduğu belirlendi (* $p < 0.05$) (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

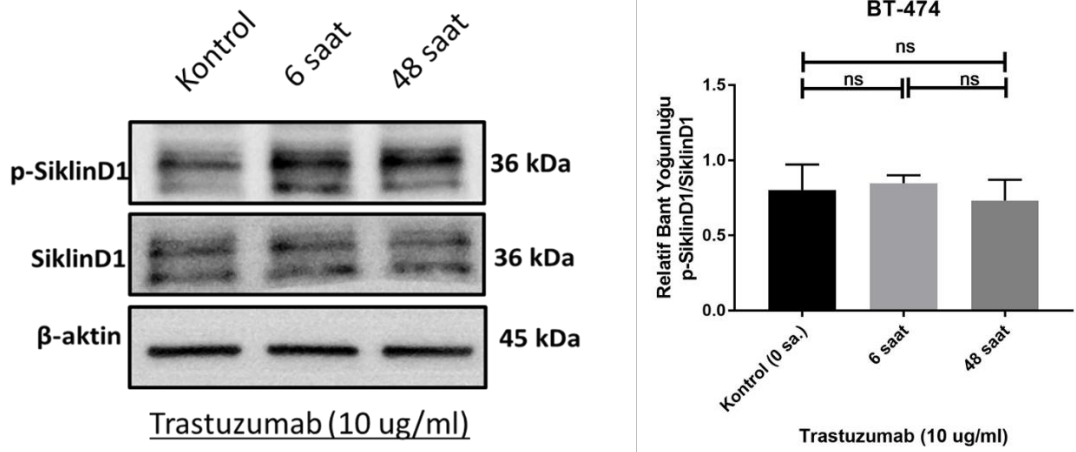
6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla AMPK protein aktivasyonunda herhangi bir değişiklik oluşmamasına karşın, 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu AMPK aktivasyonu kontrol hücrelerine oranla istatistiksel anlamlı olarak baskılanma tespit edildi (*p<0.05) (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. UACC-893 dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total AMPK protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

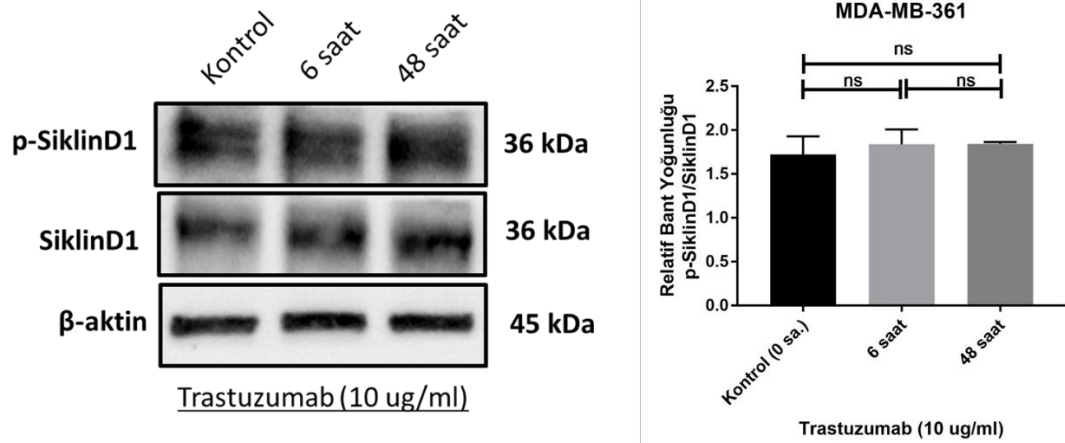
4.4.5. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu SiklinD1 Protein Fosforilasyonunun Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla siklinD1 protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.33).



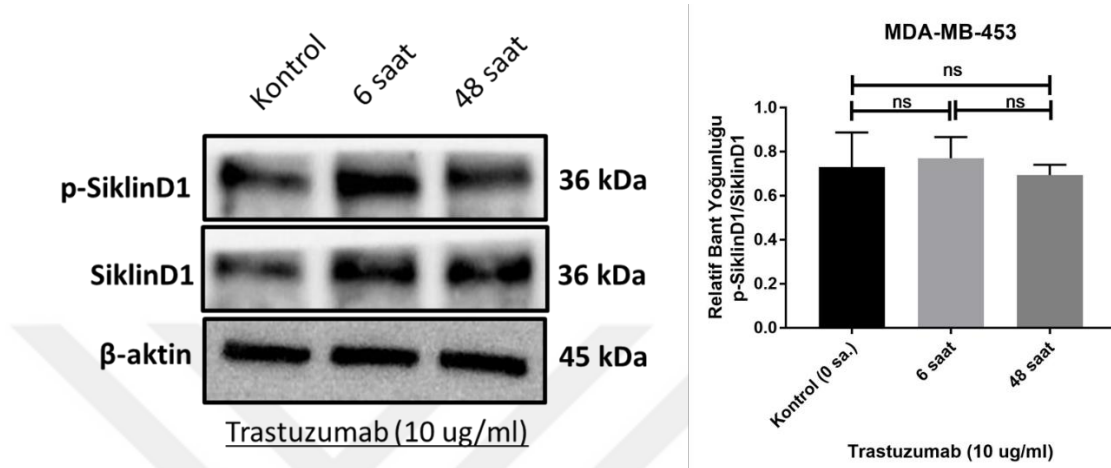
Şekil 4.33. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein ekspresyon görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla siklinD1 protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.34).



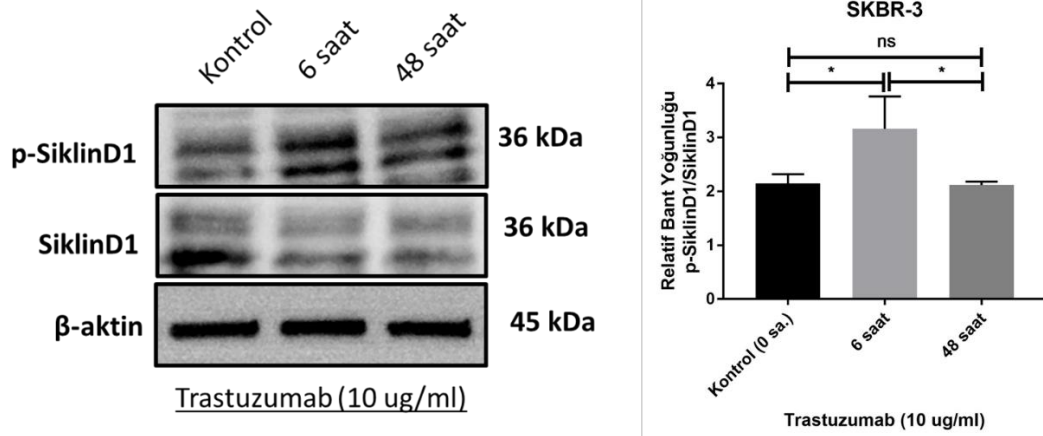
Şekil 4.34. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein ekspresyon görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-453 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla siklinD1 protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.35).



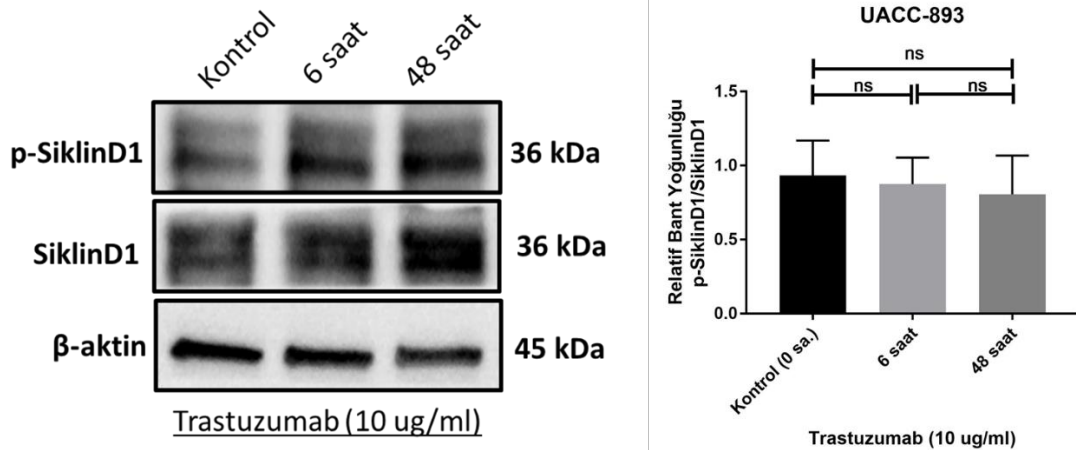
Şekil 4.35. MDA-MB-453 dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla siklinD1 protein aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tespit edildi (* $p < 0.05$). 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu artan siklinD1 protein aktivasyonunun istatistiksel olarak anlamlı olarak baskılandığı ve kontrol hücrelerindeki aktivasyon düzeyine gerilediği belirlendi (* $p < 0.05$) (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

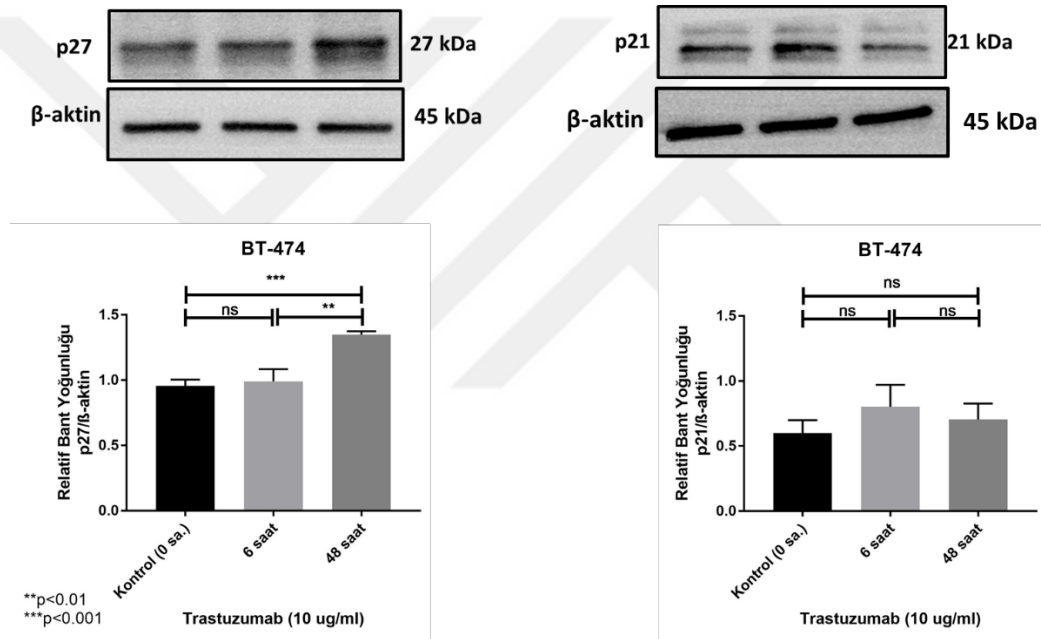
6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla siklinD1 protein aktivasyonunda zamana bağlı olarak kademeli baskınlanma olduğu ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında fosfo ve total siklinD1 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafiği

4.4.6. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu p27 ve p21 Protein İfadelerinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi

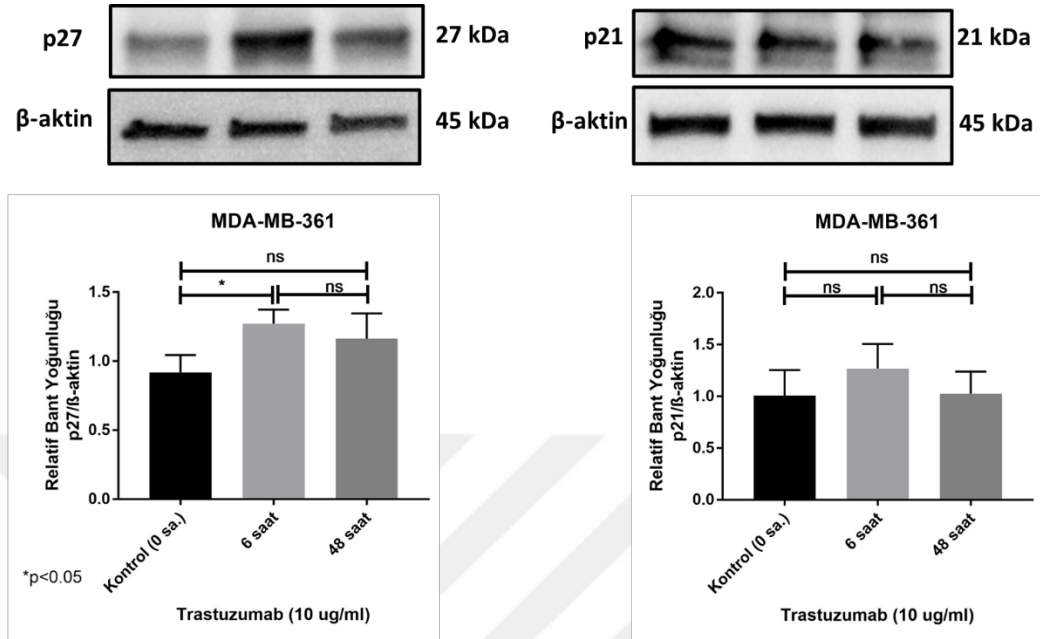
48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinde kontrol ve 6 saatlik ilaç ile inkübe edilen hücrelere oranla p27 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edildi (** $p<0.01$, *** $p<0.001$). 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p21 protein ifadesinde artış olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

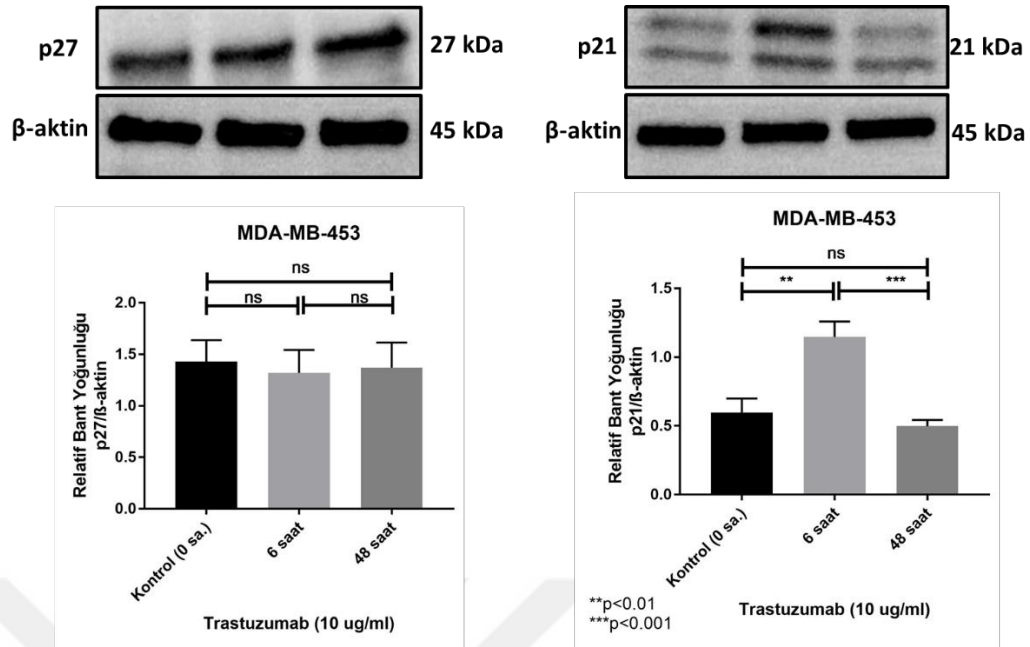
6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p27 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi (* $p<0.05$). 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine

oranla p21 protein ifadelerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.39).



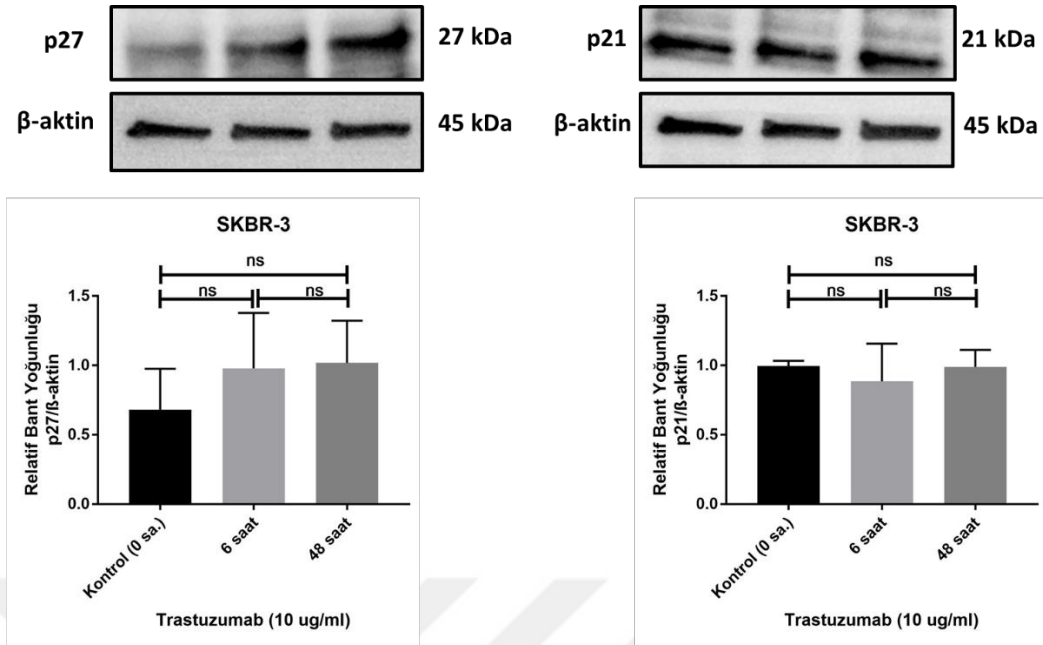
Şekil 4.39. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilmiş MDA-MB-453 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p27 protein ifadelerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi. 6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-453 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p21 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi (**p<0.01). 48 saatlik örneklerde ise 6 saatlik örneklere oranla p21 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı olarak azalış olduğu belirlendi (**p<0.001) (Şekil 4.40).



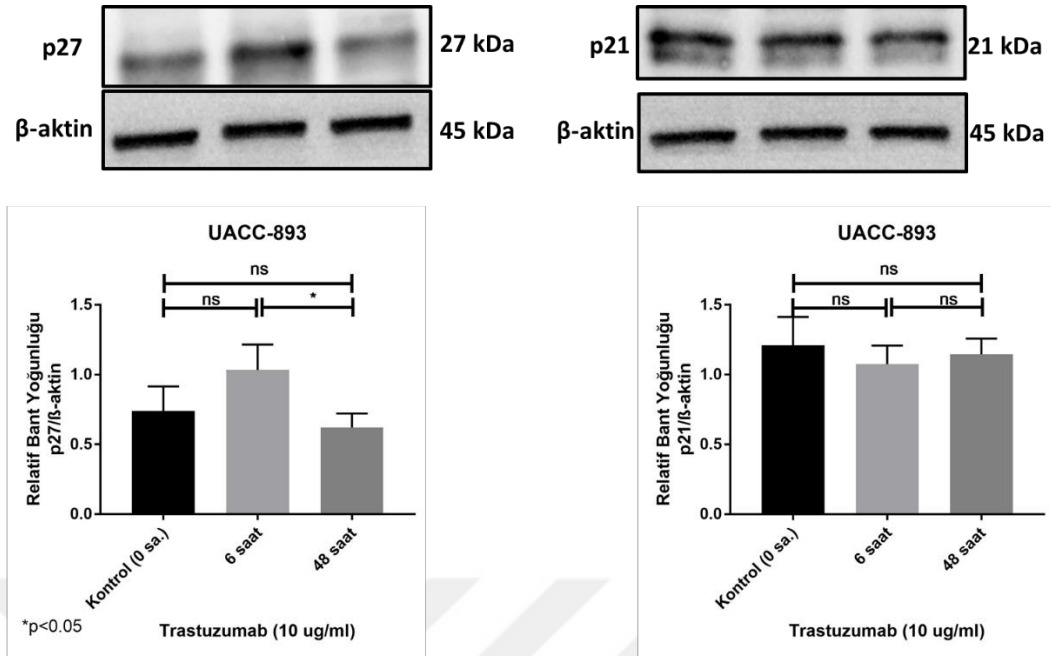
Şekil 4.40. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p27 protein ifadesinde artış görülmektedir. Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilmiş SKBR-3 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p21 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

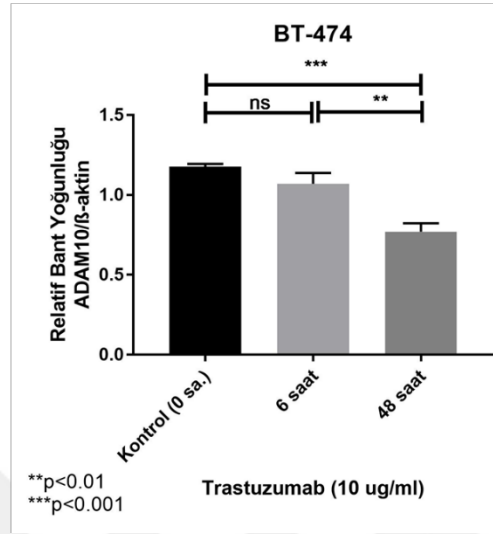
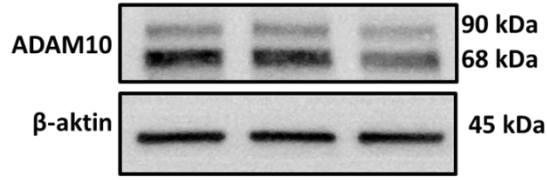
6 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p27 protein ifadesinde artış olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu p27 protein ifadesinde 6 saatlik ilaç inkübasyonuna oranla istatistiksel olarak anlamlı azalış tespit edildi (* $p < 0.05$). 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla p21 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında p27 ve p21 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

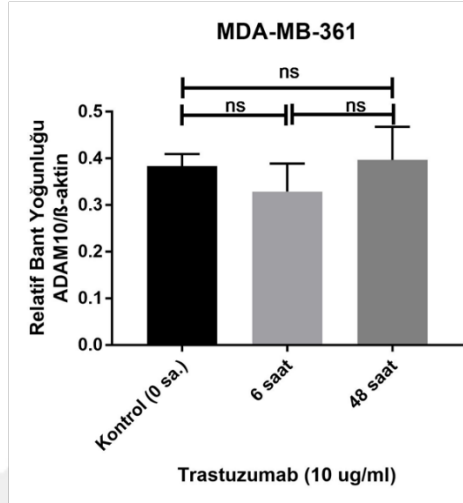
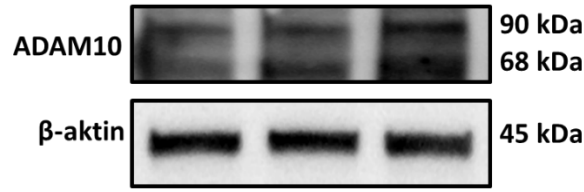
4.4.7. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu ADAM10 Protein İfadesinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla ADAM10 protein ifadesinde kademeli bir azalış olduğu görülmektedir. 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu kontrol hücrelerine oranla gerçekleşen azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, 48 saatlik ilaç inkübasyonunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (**p<0.001). Ek olarak, 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu ADAM10 ifadesi azalışının 6 saatlik örneklerle oranla da istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (**p<0.01) (Şekil 4.43).



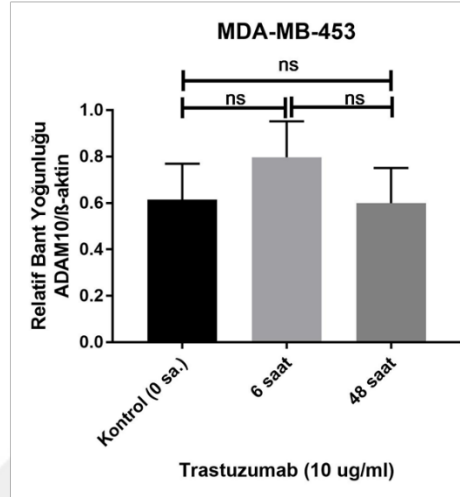
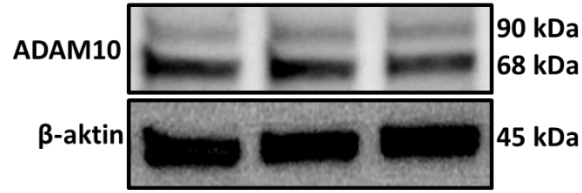
Şekil 4.43. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein bant görüntüsü ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla ADAM10 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.44).



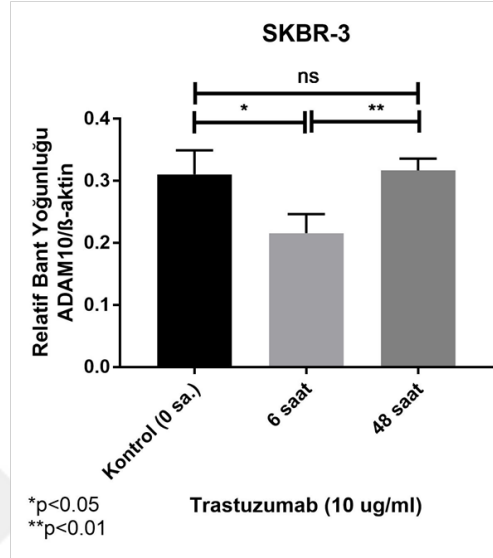
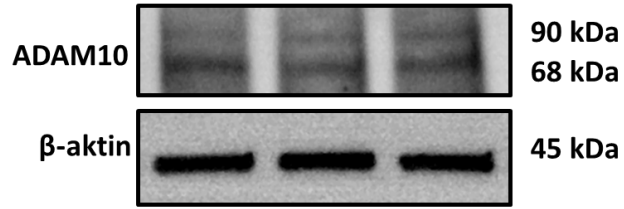
Şekil 4.44. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 μ g/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein bant görüntüsü ve relatif bant yoğunluğu grafiği

6 saat süresince 10 μ g/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-453 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla ADAM10 protein ifadesinde artış olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.45).



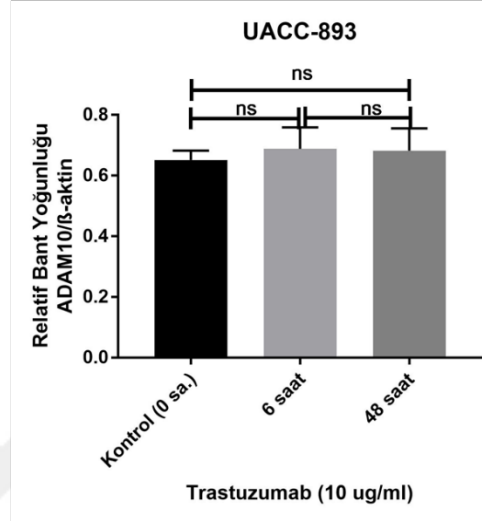
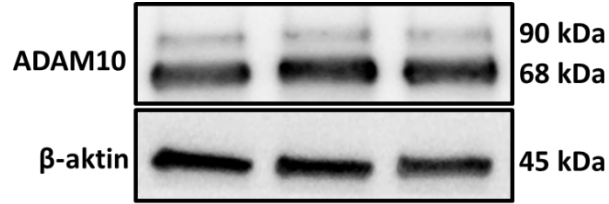
Şekil 4.45. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein bant görüntüsü ve relatif bant yoğunluğu grafiği

10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla ADAM10 protein ekspresyonu 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu istatistiksel anlamlı olarak azaldığı belirlendi (* $p < 0.05$). 48 saat süresince trastuzumab ile inkübe edilen örneklerde, 6 saatlik ilaç ile inkübe edilen örneklere oranla ADAM10 protein ifadesinin istatistiksel anlamlı olarak arttığı tespit edildi (** $p < 0.01$) (Şekil 4.46).



Şekil 4.46. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein bant görüntüsü ve relatif bant yoğunluğu grafiği

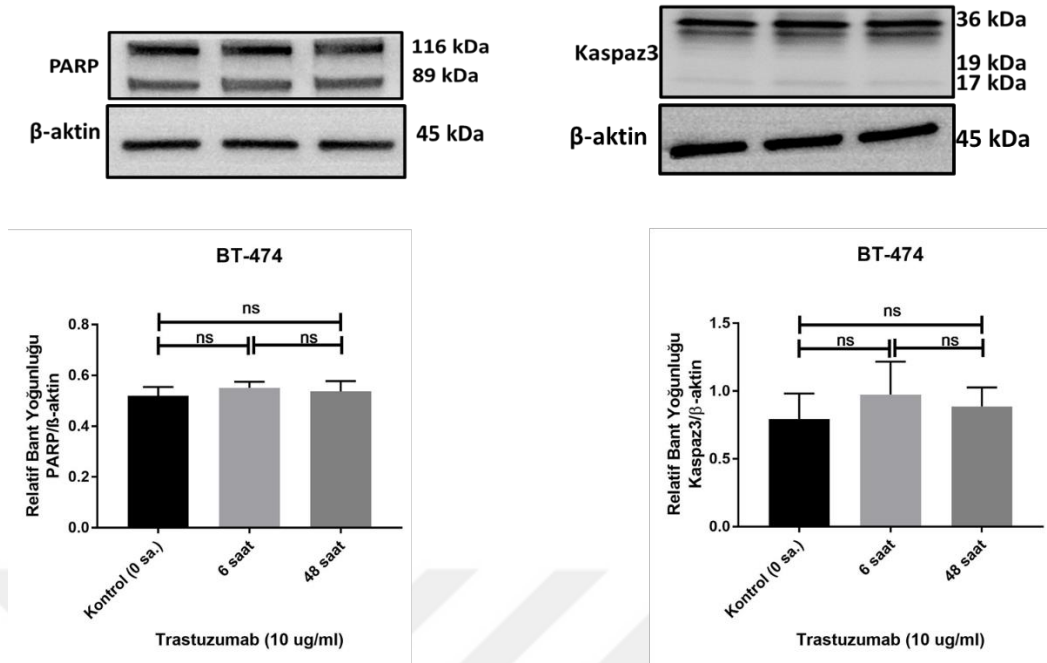
6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla ADAM10 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.47).



Şekil 4.47. UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 μ g/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında ADAM10 protein ekspresyon bant ve relatif bant yoğunluğu grafiği

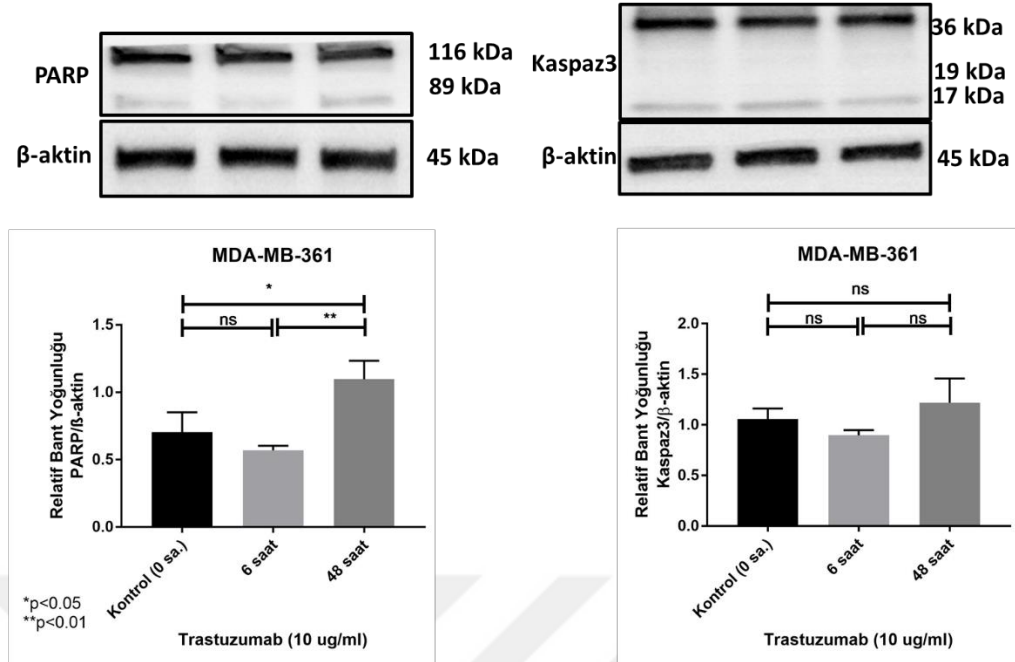
4.4.8. Trastuzumab İnkübasyonu Sonucu PARP ve Kaspaz 3 Protein İfadelerinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi

6 ve 48 saat süresince 10 μ g/ml trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla PARP ve Kaspaz 3 protein ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.48).



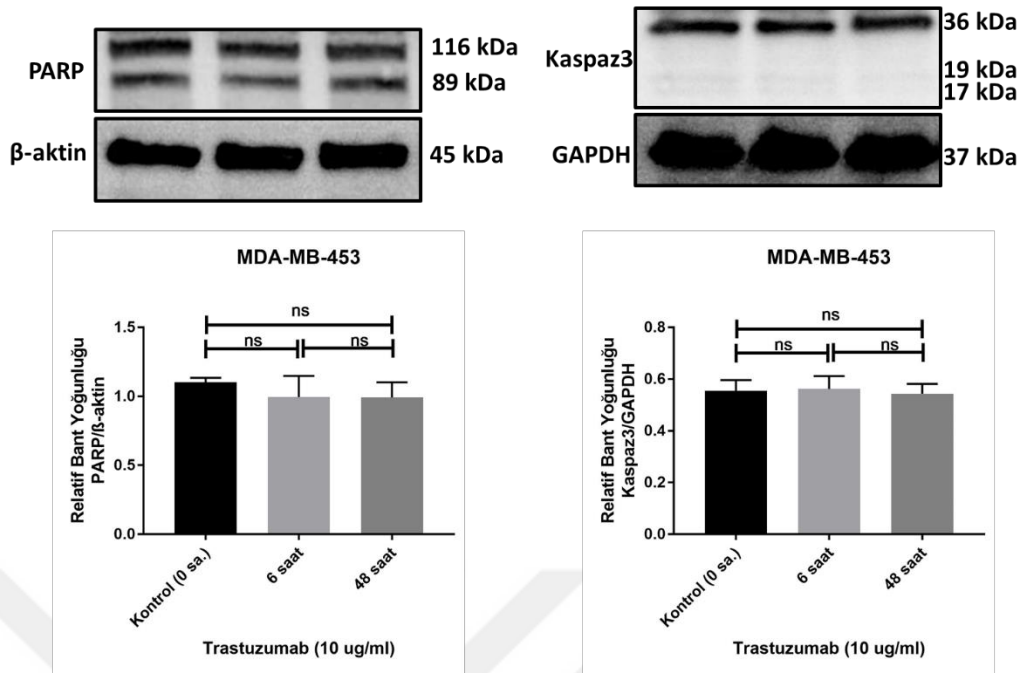
Şekil 4.48. BT-474 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine ve 6 saatlik ilaç ile inkübe edilen örneklere oranla PARP protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilmiş MDA-MB-361 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla Kaspaz 3 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.49).



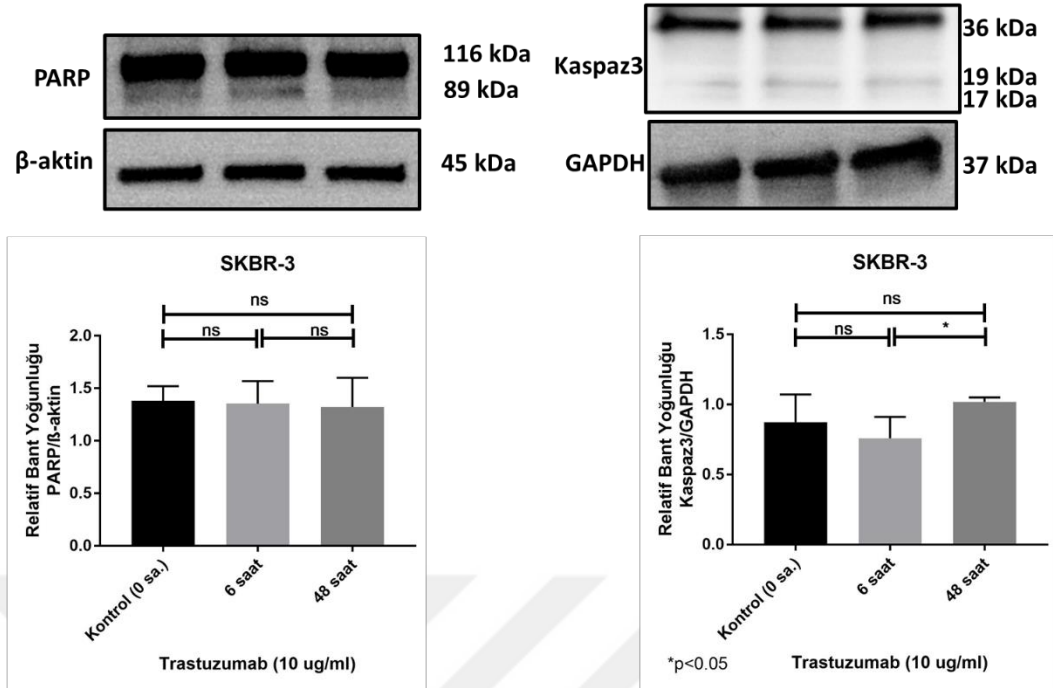
Şekil 4.49. MDA-MB-361 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-453 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla PARP ve Kaspaz 3 protein ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.50).



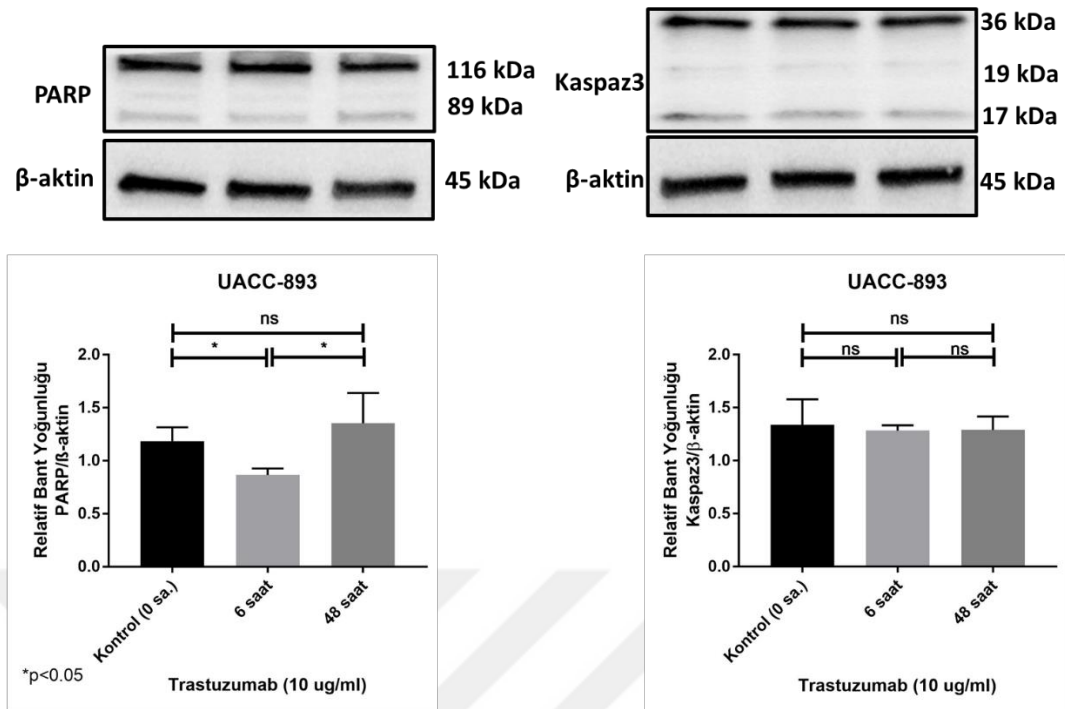
Şekil 4.50. MDA-MB-453 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla PARP protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi. 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu, 6 saatlik ilaç inkübe edilen örneklere oranla Kaspaz 3 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tespit edildi (* $p < 0.05$) (Şekil 4.51).



Şekil 4.51. SKBR-3 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

6 saatlik 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla PARP protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı azalış, 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu PARP protein ifadesinde 6 saatlik ilaç inkübasyonuna oranla istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu belirlendi (*p<0.05). 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinde kontrol hücrelerine oranla Kaspaz 3 protein ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 4.52).



Şekil 4.52. UACC-893 hücre dizisinin 6 ve 48 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübasyonu sonrasında elde edilen protein lizatlarında PARP ve Kaspaz 3 protein bant görüntüleri ve relatif bant yoğunluğu grafikleri

4.5. Trastuzumab ile İnkübe Edilmiş HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde iCELLigence Aracılı Gerçek Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizleri

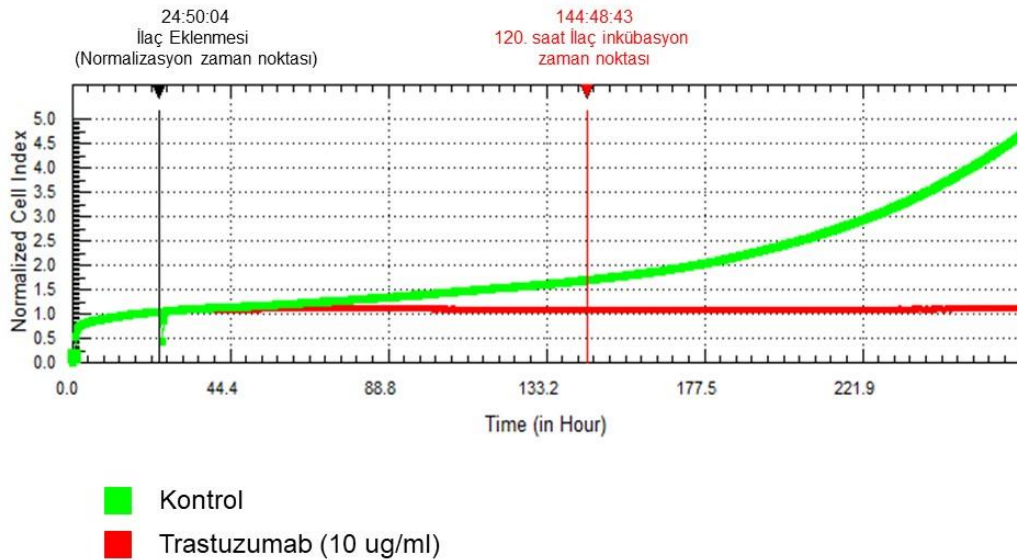
Çalışma kapsamında kullanılan 10 µg/ml trastuzumab dozunun HER2 eksprese eden meme kanseri hücreleri proliferasyonuna yönelik uzun süreli etkilerinin incelenmesi amacıyla iCELLigence gerçek zamanlı hücre proliferasyon analizi gerçekleştirildi. Bu doğrultuda, BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453 ve SKBR-3 hücrelerinin farklı sayılarda e-plate'lere ekimi gerçekleştirildi. Her hücrenin iki adet ilaçsız kontrol kuyusu ve iki adet ilaçlı deney kuyusu olmak üzere toplam 4 kuyuya ekimi sağlandı. UAC-893 hücresi deneysel limitasyondan ötürü deneye dahil edilemedi. Ekilen hücrelerin plate tabanına tutunmaları için 24 saat inkübe edildi. Bu süreden sonra, kontrol kuyularına sadece besiyeri, test kuyularına ise 10 µg/ml konsantrasyonda

trastuzumab eklendi. Hücrelerin ilaç ile 10 günlük (240 saat) proliferasyon kinetikleri gerçek zamanlı olarak incelendi.

İlacın eklendiği zaman noktası siyah çizgi ile belirtildi ve analiz aşamasında belirlenen zaman noktasından veriler normalize edildi. Elde edilen veriler kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı olarak incelendi. İncelenen veriler doğrultusunda hücre proliferasyonuna olan optimal etkinin 120. saatte olduğu belirlendi. Optimal zaman noktası grafiklerde kırmızı çizgi ile belirtildi.

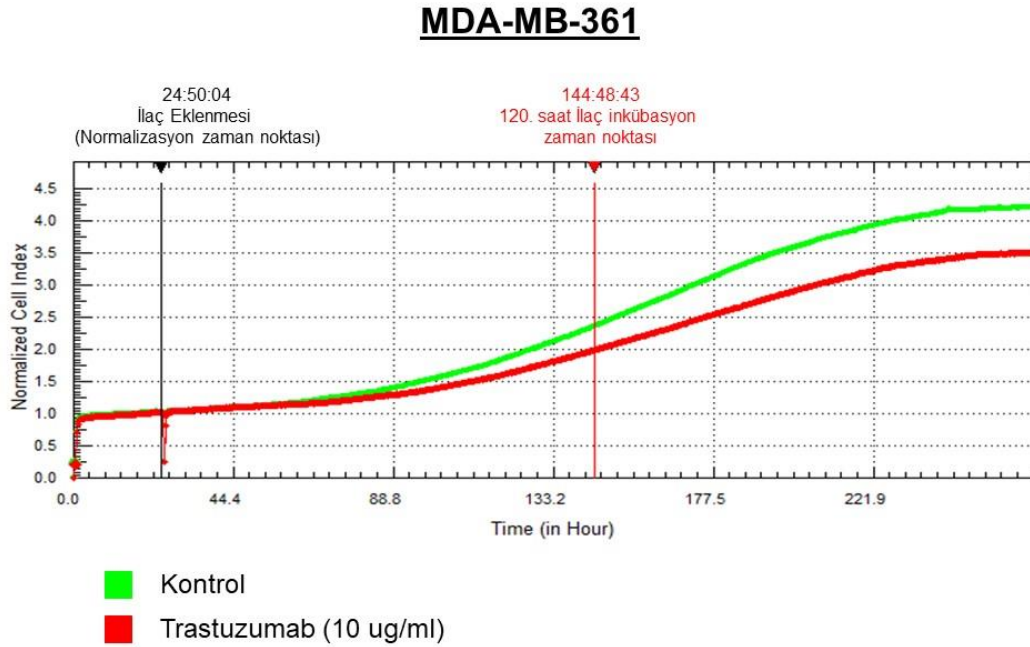
BT-474 hücrelerine ilaç eklendikten yaklaşık 64 saat sonra kontrol hücrelerine oranla empedans farkı oluşmaya başladığı tespit edildi. İlaç eklendikten 120 saat sonra kontrol hücreleri proliferasyonunun, ilaç ile inkübe edilen örneklere oranla eksponansiyel olarak artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.53).

BT-474



Şekil 4.53. BT-474 hücre dizisinin gerçek zamanlı hücre proliferasyon analiz grafiği

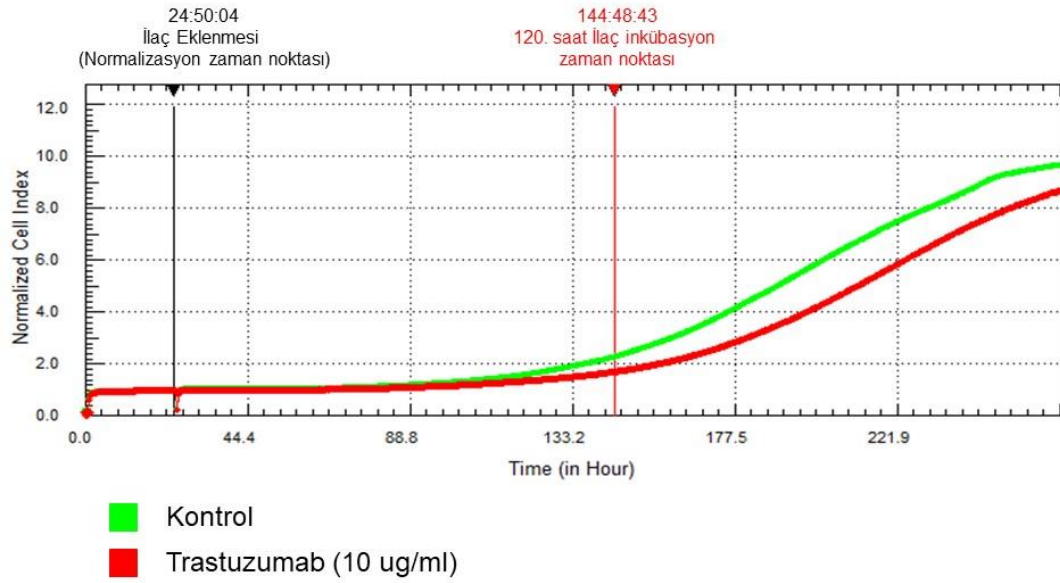
MDA-MB-361 hücrelerine ilaç eklendikten yaklaşık 78 saat sonra kontrol hücrelerine oranla empedans farkı oluşmaya başladığı tespit edildi. Devam eden saatlerde proliferasyon kinetiği kontrol hücreleri ile paralel olmasına karşın ilaç ile inkübe edilen örneklerde hücresel indeksin düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. MDA-MB-361 hücre dizisinin gerçek zamanlı hücre proliferasyon analiz grafiği

MDA-MB-453 hücrelerine ilaç eklendikten yaklaşık 109 saat sonra kontrol hücrelerine oranla empedans farkı oluşmaya başladığı tespit edildi. Devam eden saatlerde proliferasyon kinetiği kontrol hücreleri ile paralel olmasına karşın ilaç ile inkübe edilen örneklerde hücresel indeksin düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.55).

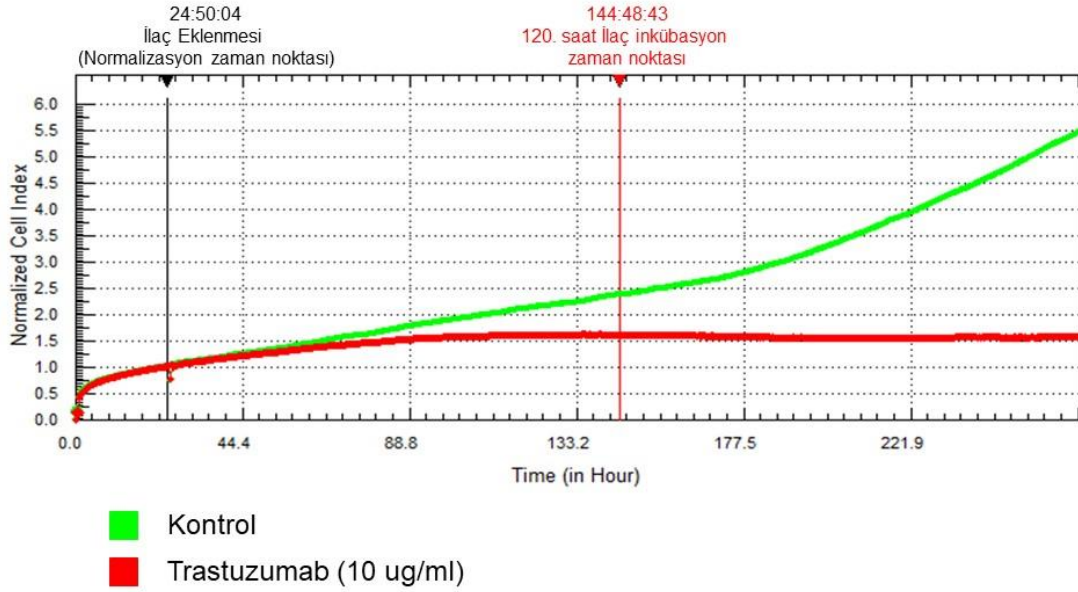
MDA-MB-453



Şekil 4.55. MDA-MB-453 hücre dizisinin gerçek zamanlı hücre proliferasyon analiz grafiği

SKBR-3 hücrelerine ilaç eklendikten yaklaşık 63 saat sonra kontrol hücrelerine oranla empedans farkı oluşmaya başladığı tespit edildi. İlaç eklendikten 120 saat sonra kontrol hücrelerinin proliferasyonu, ilaç ile inkübe edilen örneklerle oranla eksponansiyel olarak artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.56).

SKBR-3



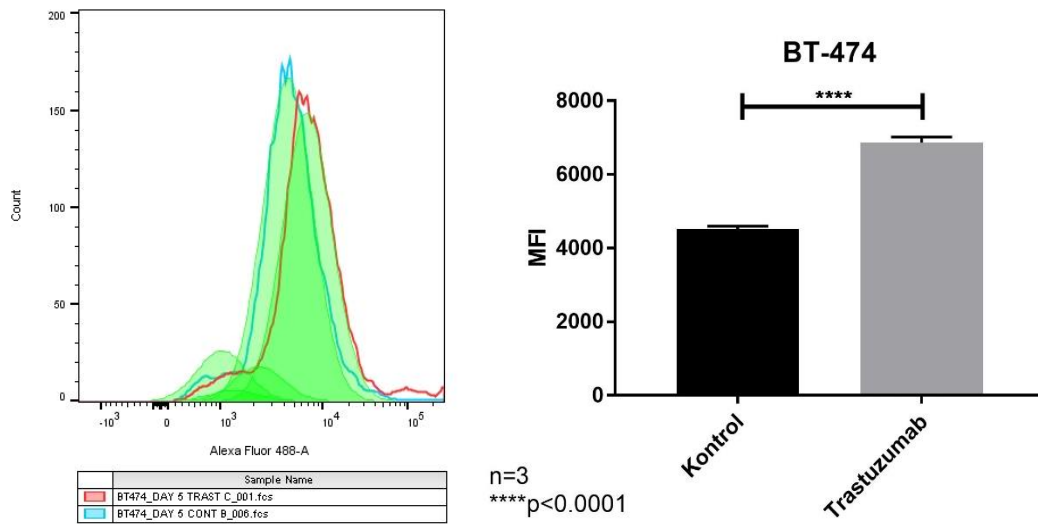
Şekil 4.56. SKBR-3 hücre dizisinin gerçek zamanlı hücre proliferasyon analiz grafiği

4.6. Trastuzumab ile İnkübe Edilmiş HER2 Eksprese Eden Meme Kanseri Hücre Dizilerinde Hücre Proliferasyon Deneyi (CFSE) ile Hücre Sağkalım Analizi

BT-474, SKBR-3, MDA-MB-361, MDA-MB-453 ve UACC-893 hücreleri, büyüme hızları göz önünde bulundurularak farklı sayılarda hücreler CFSE ile inkübe edildikten sonra T25 flasklara ekimleri sağlandı. Tüm hücrelerin flask tabanına adhezyonunun ardından kontrol flaskları sadece besiyeri ile, test flaskları ise 10 µg/ml trastuzumab ile 120 saat süreyle inkübe edildi. İlaç ile inkübe edilmemiş örnekler kontrol örnekleri olarak kullanıldı. Deney günü hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı ve akım sitometri tüplerine aktarılarak 3'er defa PBS ile yıkandılar. PBS ile yıkama aşamasından sonra 1 ml PBS içerisinde resüspande edilerek CFSE_{eksitasyon/emisyon} dalgaboyu = 492/517 nm

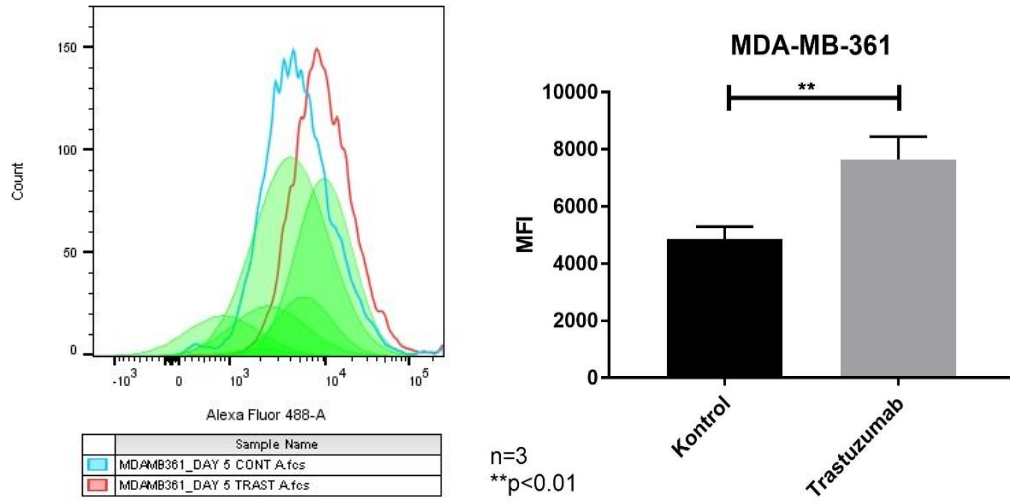
okundu. Tüm koşullarda 3 bağımsız deney yapılmış ($n=3$) ve $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Trastuzumab ile inkübe edilmemiş kontrol BT-474 hücrelerinde (4522 ± 43.41 , $n=3$), trastuzumab ile inkübe edilmiş BT-474 hücrelerine (6872 ± 84.67 , $n=3$) oranla CFSE intansitesinin istatistiksel anlamlı olarak düştüğü belirlendi ($****p<0.0001$) (Şekil 4.57). Bu durum, ilaç ile inkübe edilen hücrelerin proliferasyonlarının baskılandığını göstermektedir.



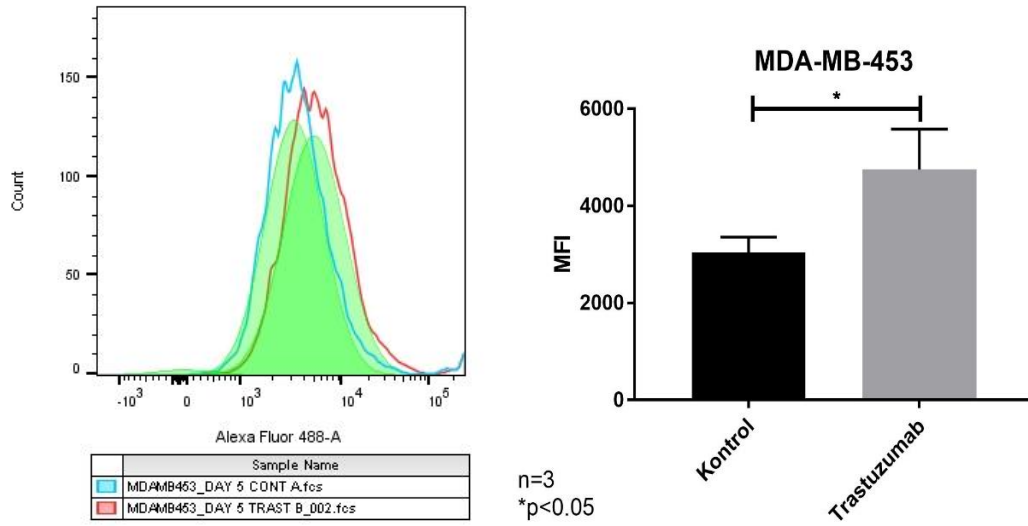
Şekil 4.57. 120 saat süresince 10 $\mu\text{g/ml}$ trastuzumab ile inkübe edilen BT-474 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği

Trastuzumab ile inkübe edilmemiş kontrol MDA-MB-361 hücrelerinde (4859 ± 252.4 , $n=3$), trastuzumab ile inkübe edilmiş MDA-MB-361 hücrelerine (7648 ± 463 , $n=3$) oranla CFSE intansitesinin istatistiksel anlamlı olarak düştüğü belirlendi ($**p<0.01$) (Şekil 4.58). Bu durum, ilaç ile inkübe edilen hücre proliferasyonlarının baskılandığını göstermektedir.



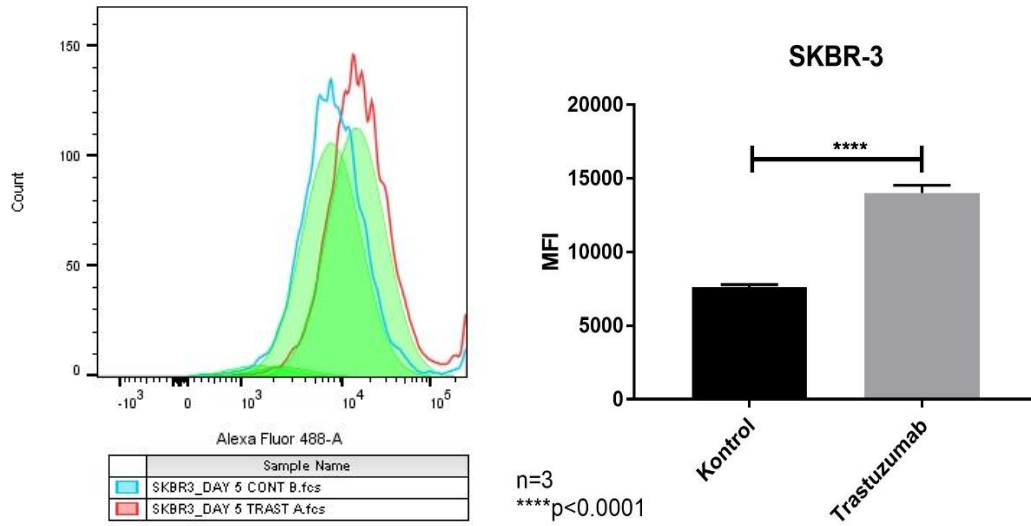
Şekil 4.58. 120 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-361 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği

Trastuzumab ile inkübe edilmemiş kontrol MDA-MB-453 hücrelerinde (3037 ± 186.3 , $n=3$), trastuzumab ile inkübe edilmiş MDA-MB-453 hücrelerine (4753 ± 478.5 , $n=3$) oranla CFSE intansitesinin istatistiksel anlamlı olarak düştüğü belirlendi ($*p<0.05$) (Şekil 4.59). Bu durum, ilaç ile inkübe edilen hücre proliferasyonlarının baskılandığını göstermektedir.



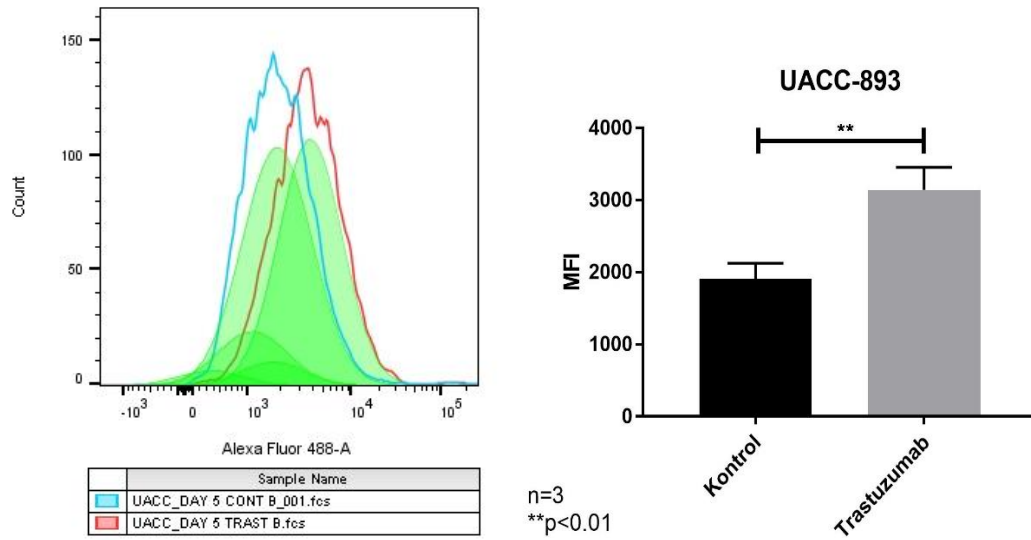
Şekil 4.59. 120 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen MDA-MB-453 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği

Trastuzumab ile inkübe edilmemiş kontrol SKBR-3 hücrelerinde (7625 ± 96 , n=3), trastuzumab ile inkübe edilmiş SKBR-3 hücrelerine (14028 ± 295.8 , n=3) oranla CFSE intansitesinin istatistiksel anlamlı olarak düştüğü belirlendi (****p<0.0001) (Şekil 4.60). Bu durum, ilaç ile inkübe edilen hücre proliferasyonlarının baskılandığını göstermektedir.



Şekil 4.60. 120 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen SKBR-3 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği

Trastuzumab ile inkübe edilmemiş kontrol UACC-893 hücrelerinde (1906 ± 127.3 , $n=3$), trastuzumab ile inkübe edilmiş UACC-893 hücrelerine (3145 ± 179.3 , $n=3$) oranla CFSE intansitesinin istatistiksel anlamlı olarak düştüğü belirlendi (** $p<0.01$) (Şekil 4.61). Bu durum, ilaç ile inkübe edilen hücre proliferasyonlarının baskılandığını göstermektedir.



Şekil 4.61. 120 saat süresince 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen UACC-893 hücrelerinin CFSE ortalama floresan intansite (MFI) grafiği

iCelligence deneyi sonuçlarına paralel olarak BT-474 ve SKBR-3 hücrelerindeki proliferasyonun baskılanması diğer hücre dizilerine oranla fazla olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, HER2 (ERBB2) ekspresyonu olan kanser hücrelerinde eEF2K'nın ekspresyon düzeyi, aktivitesi ve hücrede onkojenik sinyali regüle eden HER2 aracılı aktive olan proteinlerle ilişkisine ışık tutmaktadır. eEF2K'nın kanser hücrelerinde oksijen, besin ve enerji yetersizliği gibi çeşitli stres koşulları altında aktive olarak hücreye adaptif sağkalım avantajı sağladığı bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında yapılan *in silico* ve *in vitro* çalışmalar, HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde eEF2K'nın HER2 aracılı aktive olan PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı ile regüle olduğunu göstermektedir.

*CCL*E mikrodizin analizi verileri HER2 gen ifadesine göre değerlendirildiğinde, UACC-893 ve SKBR-3 hücre dizilerindeki HER2 ekspresyonu diğer 3 hücre dizisine oranla düşüktür. AMPK α 1 (PRKAA1) gen ekspresyon düzeyinin, UACC-893 hücrelerinde diğer hücre dizilerine oranla yüksek olduğu tespit edildi. Tüm hücre dizilerinde eEF2K gen ekspresyonu ifadesinin diğer gen ifadelerine oranla yüksek olması ve bu duruma paralel olarak, eEF2 gen ekspresyon düzeylerinin düşük olması dikkat çekmektedir. Bu durum, HER2 ekspresyonu olan meme kanseri hücrelerinde eEF2K'nın önemli bir düzenleyici molekül olabileceğine işaret etmektedir.

GEO veri tabanında bulunan GSE48216 RNA sekans verileri HER2 gen ifadesine göre değerlendirildiğinde, UACC-893 hücre dizisinin en yüksek, MDA-MB-361 hücre dizisinin en düşük HER2 ekspresyonuna sahip olduğu belirlendi. AKT1, eEF2K, eEF2, mTOR ve siklin D1 (CCND1) gen ekspresyon düzeylerinin UACC-893 ve MDA-MB-453 hücre dizilerinde diğer hücre dizilerine oranla daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu genlerin, tek başına HER2 pozitifliği gösteren ve PIK3CA açısından mutant olan hücre dizilerinde yüksek olması, literatürde over kanseri (148) ve hepatoselüler karsinomda (147) gösterilen PI3K aracılı sinyal yolaklarının eEF2K regülasyonu ile olan ilişkisini HER2 eksprese eden meme kanserinde de olabileceğini göstermektedir. Aynı durumun, HER2 ekspresyonu yüksek, PTEN mutasyonu olmayan SKBR-3 hücrelerinde görülmemesi, PTEN ve eEF2K arasındaki regülasyonu doğrular niteliktedir (22).

*CCL*E RNA sekans verileri tüm hücreler kümül olarak değerlendirildiğinde, HER2, HER3, PIK3CA, AKT1, mTOR, eEF2K, siklin D1 ve ADAM10 düzeyleri arasındaki pozitif korelasyona ek olarak bu genler ile AKT3 ve p21 arasındaki negatif korelasyon dikkat çekmektedir. ADAM10 ekspresyonunun HER2'nin hücre dışı domainini keserek p95HER2 formu oluşturduğu (108), p95HER2 ifadesi yüksek meme kanseri hastalarının kötü prognoz gösterdiği ve trastuzumab direnci oluşturduğu bilinmektedir (183, 184). Bu analizdeki eEF2K ve ADAM10 ifadelerindeki pozitif korelasyon, her iki tedavi direnci ilişkili proteinin sinerjik etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde, eEF2K'nın susturulmasından sonra hücrelerin kemoterapötiklere yönelik hassasiyetinin arttığı ve eEF2K inhibisyonuna ek olarak kullanımının etkili terapötik etkinliği artırdığı belirtilmektedir (18, 185). Bu doğrultuda, *CCL*E RNA sekans verileri kullanılarak 4 farklı HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizisinde (BT-474, MDA-MB-453, SKBR-3 ve UACC-893) ve 4 farklı üçlü negatif meme kanseri hücre dizisinde (BT-20, HCC38, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468) bazal eEF2K ekspresyonları *KEGG* ve *GSEA* analiz sistemleri kullanılarak karşılaştırıldı. İki grup arasında kontrol yolağı olarak *KEGG* ERBB sinyal yolağı karşılaştırıldığında HER2 ve AKT ifadelerinin arttığı görülmektedir. *KEGG* AMPK sinyal yolağı incelendiğinde, HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde üçlü negatif meme kanseri hücrelerine oranla bazal AMPK ifadesinin daha az olduğu, bazal eEF2K ifadesinin ise daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı veriler *GSEA* analiz sistemi üzerinden 135 genden oluşan translasyonel elongasyon ve 37 genden oluşan hücresel stres ile ilişkili p38/MAPK gen setlerinde incelendi. Her iki gen seti içerisinde HER2 eksprese eden grupta üçlü negatif meme kanseri grubuna oranla en yüksek (zenginleştirilmiş) gen ifadesi istatistiksel anlamlı olarak eEF2K çıkmaktadır. Bu durum, üçlü negatif meme kanserinde önemli bir terapötik hedef olarak ifade edilen eEF2K'nın, üçlü negatif meme kanserine oranla daha fazla ifade edilmesinden ötürü, HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde hedeflenmesinin daha etkin sonuçlar oluşturabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda, HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinin trastuzumab ile hedeflenmesi sonucu eEF2K aktivitesinin PI3K/Akt yolağı ile ilişkisi incelendi. Bu amaç doğrultusunda, MTT sitotoksite deneyi ile 5 farklı hücre dizisinde deneylerde kullanılacak optimal doz belirlendi. MTT deneyinde kullanılacak 5 farklı doz (80-40-20-10-5 µg/ml) literatürde kullanılan çalışma dozları dikkate alınarak belirlendi (168, 170, 186). Belirlenen dozların hücre canlılıklarına yönelik 48 ve 72 saatlik etkileri incelendi. Hücre canlılıklarına göre trastuzumaba karşı en hassas hücrenin BT-474 olduğu tespit edildi. Bu sonuç, Yang ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış oldukları çalışma ile uyumludur (187). MDA-MB-453 ve UACC-893 hücrelerinde ilacın hücreler üzerindeki etkisi 72 saatlik inkübasyon sonucu 48 saatlik inkübasyona oranla artmaktadır. SKBR-3 ve MDA-MB-361 hücrelerinde ilaca yönelik yanıtın diğer hücrelere oranla daha fazla olduğu tespit edildi. SKBR-3 hücrelerinin ilaca yönelik göstermiş olduğu yanıt (188) ve SKBR-3 ve MDA-MB-361 hücrelerinin ilaca benzer cevap vermelerinin literatür ile uyumlu olduğu belirlendi (167). Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, 10 µg/ml trastuzumab dozu subtoksik doz olarak belirlendi. Çalışma kapsamında uygulanan trastuzumab dozunun literatür çalışmalarıyla uyumlu olduğu tespit edildi (189, 190). Schwill ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada, HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizilerinde uygulanan trastuzumabın erken (6 saat) ve geç (48 saat) etkilerinin yolak proteinlerinin ifadeleri ve aktivasyonları üzerinde farklılık gösterdiği ve zamana bağlı ilaç etkisinin yolak regülasyonu ile direnç katkısının olduğu belirtilmektedir (167). Bu kapsamda, çalışmamızda, 6 ve 48 saat 10 µg/ml trastuzumab ile inkübe edilen hücrelerde zamana bağlı etki de karşılaştırıldı.

Çalışmamızda, belirlenen ilaç dozu ve sürelerde inkübe edilen hücrelerden elde edilen protein lizatlarında hedef proteinlerin (p-EGFR/EGFR, p-HER2/HER2, p-HER3/HER3, p-AKT/AKT, p-S6K/S6K, p-eEF2K/eEF2K, p-eEF2/eEF2, p-siklin D1/siklin D1, p-AMPK/AMPK, p27, p21, ADAM10, PARP ve Kaspaz 3) ifadeleri analiz edildi. UACC-893 hücre dizisi dışında diğer hücrelerde, 6 saatlik trastuzumab inkübasyonu sonucu, kontrol hücrelerine oranla HER2 aktivasyonunun istatistiksel anlamlı olarak arttığı tespit edildi.

EGFR aktivasyonunun da UACC-893 hücresi dışında istatistiksel olarak tüm hücrelerde anlamlı olmamasına karşın benzer patern gösterdiği dikkat çekmektedir. 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu protein aktivasyonu bazal düzeylere veya bazal düzeyin altına inebilmektedir. UACC-893 hücrelerinde ise EGFR ve HER2 aktivasyonu ilaç inkübasyonu ile azaldı. Bu sonuçlar, ilacın hücreler üzerindeki erken etkisinin reseptör aktivasyonu yönünde olduğuna işaret etmektedir. *COSMIC* veri tabanı incelendiğinde, BT-474'ün EGFR hücre içi tirozin kinaz ve C-terminal domainleri mutasyonuna, MDA-MB-361'in EGFR hücre içi transmembran ve kinaz domaini arasında kalan bölgede mutasyona ve HER2 mutasyonuna, MDA-MB-453'ün HER2 hücre dışı 1. domainde mutasyona sahip oldukları tespit edildi (191). UACC-893 hücrelerinde herhangi bir mutasyon olmadığı saptandı. SKBR-3 ile ilgili mutasyon verisi mevcut bulunmamaktadır. Tüm hücre dizilerinde, trastuzumab inkübasyonu sonucu HER3 reseptör aktivasyonunda azalma tespit edildi. Bu sonuç, *COSMIC* mutasyon verisi bulunan tüm hücrelerde HER3 mutant olmaması ile açıklanabilir. Elde edilen reseptör tirozin kinaz aktivitesi değişiklikleri Schwill ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yayınlanan sonuçlar ile uyumludur (167).

Akt protein aktivasyonu için katalitik domaininde bulunan treonin308 (T308) rezidüsünün ve düzenleyici bölgede bulunan serin473 (S473) rezidüsünün dual fosforilasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (78, 79). Çalışmamızda, ilaç inkübasyonu sonucu tüm hücrelerde Akt katalitik bölge fosforilasyonunda (T308) artma ve düzenleyici bölge fosforilasyonunda (S473) azalma tespit edildi. Tüm hücrelerde benzer cevabın tespit edilmesi sebebiyle bu durumun PIK3CA mutasyonundan bağımsız olduğu düşünüldü. *COSMIC* veri setinde AKT mutasyon varlıkları incelendiğinde BT-474 ve MDA-MB-361 hücrelerinde AKT mutasyonu olduğu, MDA-MB-453 ve UACC-893 hücrelerinde AKT mutasyonu olmadığı tespit edildi (191). Fosforilasyon bölgelerinin zıt yönde etkilenmeleri sinyal yolağının bu basamakta Akt'ın inaktivasyonuna yönelik önemli bir regülasyona uğradığına işaret etmektedir. İlaç inkübasyonu sonucu düzenleyici bölge aktivasyonundaki azalış literatür ile uyumlu bulunmuştur (167). Trastuzumabın inkübasyonu sonrasında Akt'ın

S473 fosforilasyonunun kaybı ve S6K aktivitesi kaybının gözlenmesi, 48 saat sonunda tek başına T308 fosforilasyonunun yolak aktivasyonunu sağlamadığına işaret etmektedir.

eEF2K'nın düzenleyici proteinlerinden biri olan S6K'nın mTORC1 aracılı aktivasyonu sonucu, eEF2K S366 bölgesinden fosforile olmaktadır. eEF2K'nın S366 bölgesinden fosforilasyonu sonucu eEF2K'nın inhibisyonu sağlanmaktadır. eEF2K protein aktivasyonunun baskılanmasıyla birlikte eEF2 proteini fosforile olamamakta ve bu durum protein translasyonunu indüklemektedir (192). Çalışmamızda, S6K'nın SKBR-3 hücre dizisi hariç diğer hücrelerde 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu aktivasyonunda artma ve 48 saatlik inkübasyon sonucu aktivasyonunda azalma eğilimi olması, eEF2K'nın HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde de S6K tarafından regüle edildiğini doğrulamaktadır (11, 193). SKBR-3 hücrelerinde ise S6K aktivasyonunun ilaç inkübasyon gruplarında 6 ve 48 saatte ikisinde büyük oranda baskılanması dikkat çekmektedir.

Çalışmamızda hücresel stresi, protein elongasyonunu düzenleyerek regüle edebilen önemli bir kinaz proteini olan eEF2K ve bu proteinin hedef proteini olan eEF2 protein ifadeleri incelendi. SKBR-3 hücresi hariç diğer hücrelerde istatistiksel anlamlı olmamasına karşın 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu eEF2K inhibisyonunda artma ve 48 saatlik inkübasyon sonucu inhibisyonunda azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi. 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonrasında artan eEF2K inhibisyonunun UACC-893 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonrasında azalan eEF2K inhibisyonuna paralel olarak eEF2 protein fosforilasyonundaki artış uyumlu bulundu. 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonrasında BT-474 hücre dizisinde eEF2 protein fosforilasyonundaki istatistiksel olarak anlamlı artışın, bu hücrelerin diğer hücrelere oranla ilaca karşı daha hassas olmasını sağlayan faktörlerden biri olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda, hücrede hipoksik stres durumunda aktive olan ve eEF2K'nın pozitif düzenleyici proteinlerinden biri olan AMPK'nın ilaç inkübasyonu sonucu protein ifadesindeki değişiklikler incelendi. Trastuzumab

ile inkübe edilmiş BT-474 ve SKBR-3 hücrelerinde AMPK aktivasyonunda azalma tespit edildi. MDA-MB-361 hücrelerinde 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu AMPK protein aktivasyonunda artış olması dikkat çekmektedir. Bu durum, Schwill ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmadaki trastuzumab dirençli ve duyarlı hücre dizisi sınıflandırması ile uyumlu sonuçlar vermektedir (167). Bu bulgular, AMPK aktivasyonunun azalmasının hücrelerde ilaca karşı duyarlılığa, değişiklik olmaması veya artış göstermesinin ise hücrelerde ilaç direncinin gelişimine yol açabileceğine işaret etmektedir.

Hücre döngüsünün kontrolünden sorumlu olan siklin D1, p21 ve p27 protein ifadelerinde, apoptotik regülasyondan sorumlu olan PARP ve kaspaz 3 protein ifadelerinde ve HER2 trunkasyonu ile ilişkilendirilen ADAM10 protein ifadelerinde hücreler arasında değişkenlik dikkat çekmektedir. BT-474 hücrelerinde ilaçla inkübasyon sonucu zamana bağlı olarak ADAM10 protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmektedir. Bu bulgu, BT474'ün çalışmamızda MTT sonuçlarına göre en duyarlı hücre dizisi bulunması ile uyumludur. SKBR-3 hücre dizisinde siklin D1 protein aktivasyonunun 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu artması dikkat çekmektedir. p21 ve p27 proteinlerinde genel olarak ilaç inkübasyonu ile birlikte artış eğiliminde olmasına karşın oluşan varyatif sonuçların PDK1 aracılı Akt T308 fosforilasyonu sebebiyle oluşabileceği düşünülmektedir (194). Son olarak, 48 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu MDA-MB-361 hücrelerinde kırılmış PARP ve kaspaz 3 protein ifadelerinin arttığı görülmektedir.

Çalışmamızda, trastuzumab inkübasyonunun hücrelerin büyümesi ve çoğalmasına yönelik etkisinin incelenmesi amacıyla *iCelligence* gerçek zamanlı hücre proliferasyon analizi ve *CFSE* analizi yapıldı. Her iki çalışma sonucunda, BT-474 ve SKBR-3 hücrelerinin trastuzumab inkübasyonu ile birlikte büyüme ve proliferasyonlarının diğer hücrelere oranla daha fazla etkilendiği belirlendi.

HER2+ meme kanseri başta olmak üzere, çeşitli kanser türlerinde PI3K/Akt/mTOR yolağı sıklıkla deregülasyona uğramaktadır ve PI3K/Akt/mTOR yolağının terapötik olarak hedeflenmesi ve/veya reseptörlerin

ligand bağımsız aktivasyonlarına yönelik kombine ilaç stratejileri denenmektedir (195-197). Yapılan çalışmalar umut vaat etmesine karşın, kanser hücreleri adaptif mekanizmalar sayesinde geliştirilen yeni tedavi stratejilerine karşı direnç geliştirebilmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında, hücre içi stres koşullarına karşı aktivasyonu ile hücreye sağkalım avantajı sağlayan eEF2K'nın kanser hücrelerinde gelişen direnç mekanizmalarından biri olabileceği ve potansiyel bir hedef olabileceği belirtilmektedir (20).

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile BT-474, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR3 ve UACC-893 hücre dizilerinde trastuzumab inkübasyonunun eEF2K aktivasyonu üzerindeki zamana bağlı etkisi ve yolak proteinleri ile ilişkisi incelendi. Yapılan biyoenformatik analizler sonucunda, HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde eEF2K bazal ifadesinin varlığı, HER2 reseptör tirozin kinaz ve PI3K/Akt/mTOR yolak proteinleri ile etkileşimlerinin olabileceği belirlendi. Ek olarak, üçlü negatif meme kanserine oranla HER2 eksprese eden meme kanserindeki eEF2K ifadesinin daha fazla olması daha kuvvetli bir terapötik hedef olabileceğine işaret etmektedir. Western blot deneyi sonuçlarında, eEF2K ve ilişkili proteinlerin ilaca karşı direnç mekanizmalarında önemli rol oynayabilecekleri ilk defa tespit edildi. Bu aşamada, AKT'ın önemli bir regülasyon sağladığına kanaat edildi.

HER2 hedefli tedaviye direnç mekanizmalarına ilişkin edinilen bilgi her geçen gün artmasına rağmen direnç mekanizmaları henüz tam olarak çözümlenememiştir (110). Bu bağlamda, HER2 eksprese eden meme kanserinin patogenezinin altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve hedefe yönelik yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesi, kansere yönelik tedavi etkinliğinin artırılmasına önemli katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Mikrodizin ve RNA sekans veri setlerinde 20 farklı genin HER2 eksprese eden meme kanseri hücre dizilerinde bazal ifadeleri incelendi. ERBB sinyal yolağı ilişkili gen ifadelerinin eEF2K ile korelasyon gösterdiği tespit edildi.
2. *CCL*E RNA sekans verileri ile *KEGG* analiz sistemi ile sinyal yolağı etkinlikleri ve *GSEA* analiz sistemi ile HER2 eksprese eden ve üçlü negatif meme kanseri arasında belirlenen genlerin farklılıkları incelendi. Üçlü negatif meme kanserine oranla HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde eEF2K'nın daha fazla regüle olduğu tespit edildi.
3. MTT sitotoksikite deneyi ile farklı trastuzumab dozlarının (80-40-20-10-5 µg/ml) hücrelerin canlılığına olan etkileri incelendi. Tüm hücre dizileri için 10 µg/ml subtoksik doz olarak seçildi.
4. Trastuzumabın 6 saatlik hücreler üzerindeki erken etkisi ve 48 saatlik geç etkisi incelendi. İki farklı zaman koşulunda trastuzumabın p-EGFR/EGFR, p-HER2/HER2, p-HER3/HER3, p-AKT/AKT, p-S6K/S6K, p-eEF2K/eEF2K, p-eEF2/eEF2, p-siklin D1/siklin D1, p-AMPK/AMPK, p27, p21, ADAM10, PARP ve Kaspaz 3 proteinlerine yönelik etkileri *western blot* yöntemi ile incelendi:
 - UACC-893 hücre dizisi hariç diğer hücrelerde, 6 saatlik trastuzumab inkübasyonu sonucu, kontrol hücrelerine oranla HER2 aktivasyonunun istatistiksel anlamlı olarak arttığı tespit edildi. 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu sadece UACC-893 hücrelerinde HER2 aktivasyonunun baskılanabildiği belirlendi.
 - Tüm hücrelerde 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu HER3 aktivasyonunun baskılandığı belirlendi.
 - İlaç inkübasyonu sonucu tüm hücrelerde Akt katalitik bölge fosforilasyonunun (T308) arttığı, UACC-893 hücre dizisi hariç diğer hücrelerde düzenleyici bölge fosforilasyonunun (S473) azaldığı görüldü. Trastuzumab ile inkübe edilen hücrelerin sinyal

kaskadı içerisinde en kuvvetli regülasyonu Akt proteini düzeyinde gerçekleştirdiği belirlendi.

- SKBR-3 hücresi hariç diğer hücrelerde istatistiksel anlamlı olmamasına karşın 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu eEF2K aktivasyonunun artış ve 48 saatlik inkübasyon sonucu aktivasyonunun azalış paterninde olduğu gözlemlendi. 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonrasında BT-474 hücre dizisinde eEF2 fosforilasyonunda artış olduğu belirlendi.
 - eEF2K'nın düzenleyici proteinlerinden biri olan S6K'nın SKBR-3 hücre dizisi hariç diğer hücrelerde 6 saatlik ilaç inkübasyonu sonucu aktivasyonunun artış ve 48 saatlik inkübasyon sonucu aktivasyonunun azalış paterninde olması, eEF2/eEF2K'nın HER2 eksprese eden meme kanseri hücrelerinde de S6K tarafından regüle edildiğine işaret etmektedir.
 - eEF2K'nın pozitif düzenleyici proteinlerinden biri olan AMPK'nın ilaç inkübasyonu sonucu protein ifadesindeki değişiklikler incelendi. Trastuzumab ile inkübe edilmiş BT-474 ve SKBR-3 hücrelerinde AMPK aktivasyonunda azalma tespit edildi.
5. *iCelligence* gerçek zamanlı hücre proliferasyon analiz yöntemi ve *CFSE* deneyleri ile trastuzumab hücreler üzerindeki etkileri incelendi. Her iki analiz sonucunda BT-474 ve SKBR-3 hücrelerindeki proliferasyonun baskılanması diğer hücre dizilerine oranla fazla olduğu belirlendi.
 6. Yapılan çalışmalara ek olarak, HER2+ meme kanseri hücrelerinde eEF2K'nın siRNA ile tek başına veya AKT inhibitörü ile kombine şekilde susuturulması ve etkilerinin incelenmesi araştırılabilir.
 7. Ksenograft fare modelleri üzerinde, eEF2K'nın hedeflenmesi sonucu tümör mikroçevresinin sinyal mekanizmasına ne yönde etki ettiği araştırılabilir.
 8. eEF2K'nın potansiyel epigenetik düzenleyicileriyle hedeflenmesi sonucu sinyal yollarının ne yönde etkilendiği analiz edilebilir.
 9. eEF2K'nın hedeflenmesi sonucu HER2+ hücrelerdeki moleküler profilin değişikliği RNA sekans çalışması ile incelenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30.
2. Mohd Sharial MS, Crown J, Hennesy BT. Overcoming resistance and restoring sensitivity to HER2-targeted therapies in breast cancer. *Ann Oncol*. 2012;23(12):3007-16.
3. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
4. Sandhu R, Parker JS, Jones WD, Livasy CA, Coleman WB. Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *Laboratory Medicine*. 2010;41(6):364-72.
5. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2014;25(3):282-303.
6. Burris HA, 3rd. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71(4):829-42.
7. Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. *Annu Rev Med*. 2015;66:111-28.
8. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2013;39(8):935-46.
9. Proud CG. Regulation and roles of elongation factor 2 kinase. *Biochem Soc Trans*. 2015;43(3):328-32.
10. Kenney JW, Moore CE, Wang X, Proud CG. Eukaryotic elongation factor 2 kinase, an unusual enzyme with multiple roles. *Adv Biol Regul*. 2014;55:15-27.
11. Liu R, Proud CG. Eukaryotic elongation factor 2 kinase as a drug target in cancer, and in cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2016;37(3):285-94.
12. Redpath NT, Price NT, Proud CG. Cloning and expression of cDNA encoding protein synthesis elongation factor-2 kinase. *J Biol Chem*. 1996;271(29):17547-54.
13. Zamboni M, Brigotti M, Montanaro L, Sperti S. Elongation factor 2 from *Artemia salina* embryos and its affinity for ribosomes. *Eur J Biochem*. 1991;200(1):13-8.
14. Redpath NT, Price NT, Severinov KV, Proud CG. Regulation of elongation factor-2 by multisite phosphorylation. *Eur J Biochem*. 1993;213(2):689-99.

15. Nygard O, Nilsson A, Carlberg U, Nilsson L, Amons R. Phosphorylation regulates the activity of the eEF-2-specific Ca(2+)- and calmodulin-dependent protein kinase III. *J Biol Chem.* 1991;266(25):16425-30.
16. Leprivier G, Remke M, Rotblat B, Dubuc A, Mateo AR, Kool M, et al. The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell.* 2013;153(5):1064-79.
17. Manning BD. Adaptation to starvation: translating a matter of life or death. *Cancer Cell.* 2013;23(6):713-5.
18. Tekedereli I, Alpay SN, Tavares CD, Cobanoglu ZE, Kaoud TS, Sahin I, et al. Targeted silencing of elongation factor 2 kinase suppresses growth and sensitizes tumors to doxorubicin in an orthotopic model of breast cancer. *PLoS One.* 2012;7(7):e41171.
19. Bayraktar R, Pichler M, Kanlikilicer P, Ivan C, Bayraktar E, Kahraman N, et al. MicroRNA 603 acts as a tumor suppressor and inhibits triple-negative breast cancer tumorigenesis by targeting elongation factor 2 kinase. *Oncotarget.* 2016.
20. Fu LL, Xie T, Zhang SY, Liu B. Eukaryotic elongation factor-2 kinase (eEF2K): a potential therapeutic target in cancer. *Apoptosis.* 2014;19(10):1527-31.
21. Leprivier G, Sorensen PH. How does oncogene transformation render tumor cells hypersensitive to nutrient deprivation? *Bioessays.* 2014;36(11):1082-90.
22. Russnes HG, Caldas C. eEF2K--a new target in breast cancers with combined inactivation of p53 and PTEN. *EMBO Mol Med.* 2014;6(12):1512-4.
23. 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.* 2018;68(6):394-424.
24. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000;321(7261):624-8.
25. Bydoun M, Marcato P, Dellaire G. Chapter 13 - Breast Cancer Genomics. In: Arceci GDNBJ, editor. *Cancer Genomics.* Boston: Academic Press; 2014. p. 213-32.
26. Gayther SA, Pharoah PD, Ponder BA. The genetics of inherited breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998;3(4):365-76.
27. Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(12):937-48.
28. Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med.* 2001;7(5):552-6.
29. Lakhani SR, Gusterson BA, Jacquemier J, Sloane JP, Anderson TJ, van de Vijver MJ, et al. The pathology of familial breast cancer: histological features

of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. *Clin Cancer Res.* 2000;6(3):782-9.

30. Melhem-Bertrandt A, Bojadzieva J, Ready KJ, Obeid E, Liu DD, Gutierrez-Barrera AM, et al. Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. *Cancer.* 2012;118(4):908-13.

31. Hynes NE, Dey JH. PI3K inhibition overcomes trastuzumab resistance: blockade of ErbB2/ErbB3 is not always enough. *Cancer cell.* 2009;15(5):353-5.

32. Curigliano G. New drugs for breast cancer subtypes: targeting driver pathways to overcome resistance. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(4):303-10.

33. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):66.

34. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch.* 2014;465(1):1-14.

35. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol.* 2010;4(3):192-208.

36. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL. Robbins basic pathology. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013.

37. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61-70.

38. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(14):8418-23.

39. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68.

40. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene.* 2005;24(29):4660-71.

41. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics.* 2006;7:96.

42. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S, Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *The EMBO journal.* 2013;32(5):617-28.

43. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 2000;19(49):5548-57.

44. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010;141(7):1117-34.

45. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 2001;411(6835):355-65.

46. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. *Lehninger principles of biochemistry*. Sixth edition ed. 1 volume (various pagings) p.
47. Du Z, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):58.
48. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(5):361-70.
49. Weinberg RA. *The biology of cancer*. Second edition. ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2014. xx, 876, A 6, G 30, I 28 pages p.
50. Choura M, Rebai A. Receptor tyrosine kinases: from biology to pathology. *J Recept Signal Transduct Res*. 2011;31(6):387-94.
51. Li E, Hristova K. Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies. *Biochemistry*. 2006;45(20):6241-51.
52. Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E, Menard S. Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol*. 2004;200(3):343-50.
53. Loibl S, Gianni L. HER2-positive breast cancer. *Lancet*. 2017;389(10087):2415-29.
54. Eccles SA. The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *Int J Dev Biol*. 2011;55(7-9):685-96.
55. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):54-65.
56. Jura N, Shan Y, Cao X, Shaw DE, Kuriyan J. Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(51):21608-13.
57. Choi BK, Cai X, Yuan B, Huang Z, Fan X, Deng H, et al. HER3 intracellular domains play a crucial role in HER3/HER2 dimerization and activation of downstream signaling pathways. *Protein Cell*. 2012;3(10):781-9.
58. Gala K, Chandarlapaty S. Molecular pathways: HER3 targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(6):1410-6.
59. Amin DN, Campbell MR, Moasser MM. The role of HER3, the unpretentious member of the HER family, in cancer biology and cancer therapeutics. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21(9):944-50.
60. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*. 2014;79:34-74.
61. Hervent AS, De Keulenaer GW. Molecular mechanisms of cardiotoxicity induced by ErbB receptor inhibitor cancer therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2012;13(10):12268-86.
62. Staaf J, Ringner M, Vallon-Christersson J, Jonsson G, Bendahl PO, Holm K, et al. Identification of subtypes in human epidermal growth factor

receptor 2--positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1813-20.

63. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):117-23.

64. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(8):553-63.

65. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004;30(2):193-204.

66. Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(7):366-76.

67. Nelson DL, Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed. New York: W.H. Freeman; 2008. 1 volume (various pagings) p.

68. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.

69. Wymann MP, Pirola L, Katanaev VL, Bulgarelli-Leva G. Phosphoinositide 3-kinase signalling: no lipids. *Biochem Soc Trans*. 1999;27(4):629-34.

70. Blunsom NJ, Cockcroft S. Phosphatidylinositol synthesis at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2020;1865(1):158471.

71. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1):7-24.

72. Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, Luo J, Brachmann SM, Pearline RV, et al. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):10992-1000.

73. Wymann MP, Marone R. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(2):141-9.

74. Vogt PK, Kang S, Elsliger MA, Gymnopoulos M. Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(7):342-9.

75. Lopez-Knowles E, O'Toole SA, McNeil CM, Millar EK, Qiu MR, Crea P, et al. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer*. 2010;126(5):1121-31.

76. Leontiadou H, Galdadas I, Athanasiou C, Cournia Z. Insights into the mechanism of the PIK3CA E545K activating mutation using MD simulations. *Sci Rep*. 2018;8(1):15544.

77. Gedik ME, Dogan AL. *Biology and Genetics of Breast Cancer*. Breast Disease 2019. p. 125-42.

78. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002;14(5):381-95.
79. Hemmings BA, Restuccia DF. The PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(4).
80. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004;9(6):667-76.
81. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-74.
82. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6084-91.
83. West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat*. 2002;5(6):234-48.
84. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*. 2003;4(4):257-62.
85. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-76.
86. Sabatini DM. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(45):11818-25.
87. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18(16):1926-45.
88. Condon KJ, Sabatini DM. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. *J Cell Sci*. 2019;132(21).
89. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(1):21-35.
90. Efeyan A, Sabatini DM. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):169-76.
91. Becker S. A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015;131 Suppl 1:S36-9.
92. Esteva FJ, Hubbard-Lucey VM, Tang J, Pusztai L. Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer. *Lancet Oncol*. 2019;20(3):e175-e86.
93. Joensuu H. Dual targeting of HER2 with lapatinib and trastuzumab. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1050-2.
94. Pinto AC, Ades F, de Azambuja E, Piccart-Gebhart M. Trastuzumab for patients with HER2 positive breast cancer: delivery, duration and combination therapies. *Breast*. 2013;22 Suppl 2:S152-5.
95. Cameron D, Piccart-Gebhart MJ, Gelber RD, Procter M, Goldhirsch A, de Azambuja E, et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant

chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet*. 2017;389(10075):1195-205.

96. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019;321(3):288-300.

97. Ban M, Petric Mise B, Vrdoljak E. Early HER2-Positive Breast Cancer: Current Treatment and Novel Approaches. *Breast Care (Basel)*. 2020;15(6):560-9.

98. Spring LM, Wander SA, Andre F, Moy B, Turner NC, Bardia A. Cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitors for hormone receptor-positive breast cancer: past, present, and future. *Lancet*. 2020;395(10226):817-27.

99. Jones KL, Buzdar AU. Evolving novel anti-HER2 strategies. *Lancet Oncol*. 2009;10(12):1179-87.

100. Costa RLB, Czerniecki BJ. Clinical development of immunotherapies for HER2(+) breast cancer: a review of HER2-directed monoclonal antibodies and beyond. *NPJ Breast Cancer*. 2020;6(1):10.

101. Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL, Gomez-Caraballo M, Siddiqui FM, Mulvey HE, et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat Med*. 2016;22(3):262-9.

102. Jaiswal BS, Kljavin NM, Stawiski EW, Chan E, Parikh C, Durinck S, et al. Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. *Cancer Cell*. 2013;23(5):603-17.

103. Hynes NE. ErbB2: From an EGFR Relative to a Central Target for Cancer Therapy. *Cancer Res*. 2016;76(13):3659-62.

104. Guo G, Gong K, Wohlfeld B, Hatanpaa KJ, Zhao D, Habib AA. Ligand-Independent EGFR Signaling. *Cancer Res*. 2015;75(17):3436-41.

105. Ruiz-Saenz A, Dreyer C, Campbell MR, Steri V, Gulizia N, Moasser MM. HER2 Amplification in Tumors Activates PI3K/Akt Signaling Independent of HER3. *Cancer Res*. 2018;78(13):3645-58.

106. Loibl S, Majewski I, Guarneri V, Nekljudova V, Holmes E, Bria E, et al. PIK3CA mutations are associated with reduced pathological complete response rates in primary HER2-positive breast cancer: pooled analysis of 967 patients from five prospective trials investigating lapatinib and trastuzumab. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1519-25.

107. Khoury T, Kanehira K, Wang D, Ademuyiwa F, Mojica W, Cheney R, et al. Breast carcinoma with amplified HER2: a gene expression signature specific for trastuzumab resistance and poor prognosis. *Mod Pathol*. 2010;23(10):1364-78.

108. Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL. p95HER2 and breast cancer. *Cancer Res*. 2011;71(5):1515-9.

109. Niederst MJ, Engelman JA. Bypass mechanisms of resistance to receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer. *Sci Signal*. 2013;6(294):re6.

110. Figueroa-Magalhaes MC, Jelovac D, Connolly R, Wolff AC. Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast*. 2014;23(2):128-36.
111. Callahan R, Hurvitz S. Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: Current management of early, advanced, and recurrent disease. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2011;23(1):37-43.
112. Skelding KA, Rostas JA. The role of molecular regulation and targeting in regulating calcium/calmodulin stimulated protein kinases. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:703-30.
113. Vig M, Kinet JP. Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol*. 2009;10(1):21-7.
114. Tidow H, Nissen P. Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. *FEBS J*. 2013;280(21):5551-65.
115. Hoeflich KP, Ikura M. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell*. 2002;108(6):739-42.
116. Zhu H, Yang X, Liu J, Zhou L, Zhang C, Xu L, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase confers tolerance to stress conditions in cancer cells. *Cell Stress Chaperones*. 2015;20(2):217-20.
117. Taha E, Gildish I, Gal-Ben-Ari S, Rosenblum K. The role of eEF2 pathway in learning and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem*. 2013;105:100-6.
118. Pigott CR, Mikolajek H, Moore CE, Finn SJ, Phippen CW, Werner JM, et al. Insights into the regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and the interplay between its domains. *Biochem J*. 2012;442(1):105-18.
119. Proud XWJXaCG. Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase (eEF2K) in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(12).
120. Tavares CD, O'Brien JP, Abramczyk O, Devkota AK, Shores KS, Ferguson SB, et al. Calcium/calmodulin stimulates the autophosphorylation of elongation factor 2 kinase on Thr-348 and Ser-500 to regulate its activity and calcium dependence. *Biochemistry*. 2012;51(11):2232-45.
121. Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J*. 2001;20(16):4370-9.
122. Smith EM, Proud CG. cdc2-cyclin B regulates eEF2 kinase activity in a cell cycle- and amino acid-dependent manner. *EMBO J*. 2008;27(7):1005-16.
123. Liao Y, Chu HP, Hu Z, Merkin JJ, Chen J, Liu Z, et al. Paradoxical Roles of Elongation Factor-2 Kinase in Stem Cell Survival. *J Biol Chem*. 2016;291(37):19545-57.
124. Chu HP, Liao Y, Novak JS, Hu Z, Merkin JJ, Shymkiv Y, et al. Germline quality control: eEF2K stands guard to eliminate defective oocytes. *Dev Cell*. 2014;28(5):561-72.

125. Lazarus MB, Levin RS, Shokat KM. Discovery of new substrates of the elongation factor-2 kinase suggests a broader role in the cellular nutrient response. *Cell Signal*. 2017;29:78-83.
126. Johanns M, Pyr Dit Ruys S, Houddane A, Vertommen D, Herinckx G, Hue L, et al. Direct and indirect activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by AMP-activated protein kinase. *Cell Signal*. 2017;36:212-21.
127. Kruiswijk F, Yuniati L, Magliozzi R, Low TY, Lim R, Bolder R, et al. Coupled activation and degradation of eEF2K regulates protein synthesis in response to genotoxic stress. *Sci Signal*. 2012;5(227):ra40.
128. Meloche S, Roux PP. F-box proteins elongate translation during stress recovery. *Sci Signal*. 2012;5(227):pe25.
129. Moore CE, Mikolajek H, Regufe da Mota S, Wang X, Kenney JW, Werner JM, et al. Elongation Factor 2 Kinase Is Regulated by Proline Hydroxylation and Protects Cells during Hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2015;35(10):1788-804.
130. Xie J, Mikolajek H, Pigott CR, Hooper KJ, Mellows T, Moore CE, et al. Molecular Mechanism for the Control of Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase by pH: Role in Cancer Cell Survival. *Mol Cell Biol*. 2015;35(10):1805-24.
131. Knight JR, Bastide A, Roobol A, Roobol J, Jackson TJ, Utami W, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase regulates the cold stress response by slowing translation elongation. *Biochem J*. 2015;465(2):227-38.
132. Rider MH, Hussain N, Horman S, Dilworth SM, Storey KB. Stress-induced activation of the AMP-activated protein kinase in the freeze-tolerant frog *Rana sylvatica*. *Cryobiology*. 2006;53(3):297-309.
133. Kenney JW, Genheden M, Moon KM, Wang X, Foster LJ, Proud CG. Eukaryotic elongation factor 2 kinase regulates the synthesis of microtubule-related proteins in neurons. *J Neurochem*. 2016;136(2):276-84.
134. Heise C, Gardoni F, Culotta L, di Luca M, Verpelli C, Sala C. Elongation factor-2 phosphorylation in dendrites and the regulation of dendritic mRNA translation in neurons. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:35.
135. Weng W, Chen Y, Wang M, Zhuang Y, Behnisch T. Potentiation of Schaffer-Collateral CA1 Synaptic Transmission by eEF2K and p38 MAPK Mediated Mechanisms. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:247.
136. Heise C, Taha E, Murru L, Ponzoni L, Cattaneo A, Guarnieri FC, et al. eEF2K/eEF2 Pathway Controls the Excitation/Inhibition Balance and Susceptibility to Epileptic Seizures. *Cereb Cortex*. 2017;27(3):2226-48.
137. Beckelman BC, Yang W, Kasica NP, Zimmermann HR, Zhou X, Keene CD, et al. Genetic reduction of eEF2 kinase alleviates pathophysiology in Alzheimer's disease model mice. *J Clin Invest*. 2019;129(2):820-33.
138. Kameshima S, Okada M, Yamawaki H. Eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) kinase/eEF2 plays protective roles against glucose deprivation-induced cell death in H9c2 cardiomyoblasts. *Apoptosis*. 2019;24(3-4):359-68.

139. Usui T, Okada M, Hara Y, Yamawaki H. Eukaryotic elongation factor 2 kinase regulates the development of hypertension through oxidative stress-dependent vascular inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(5):H756-68.
140. Kodama T, Okada M, Yamawaki H. Mechanisms underlying the relaxation by A484954, a eukaryotic elongation factor 2 kinase inhibitor, in rat isolated mesenteric artery. *J Pharmacol Sci*. 2018;137(1):86-92.
141. Carlberg U, Nilsson A, Nygard O. Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *Eur J Biochem*. 1990;191(3):639-45.
142. Xie J, Van Damme P, Fang D, Proud CG. Ablation of elongation factor 2 kinase enhances heat-shock protein 90 chaperone expression and protects cells under proteotoxic stress. *J Biol Chem*. 2019;294(18):7169-76.
143. Li S, Li Y, Bai Y. What is the impact of eukaryotic elongation factor 2 kinase on cancer: A systematic review. *Eur J Pharmacol*. 2019;857:172470.
144. Zhang C, Lei JL, Zhang H, Xia YZ, Yu P, Yang L, et al. Calyxin Y sensitizes cisplatin-sensitive and resistant hepatocellular carcinoma cells to cisplatin through apoptotic and autophagic cell death via SCF betaTrCP-mediated eEF2K degradation. *Oncotarget*. 2017;8(41):70595-616.
145. Wang Y, Huang G, Wang Z, Qin H, Mo B, Wang C. Elongation factor-2 kinase acts downstream of p38 MAPK to regulate proliferation, apoptosis and autophagy in human lung fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2018;363(2):291-8.
146. Xie J, Shen K, Lenchine RV, Gethings LA, Trim PJ, Snel MF, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase upregulates the expression of proteins implicated in cell migration and cancer cell metastasis. *Int J Cancer*. 2018;142(9):1865-77.
147. Zhou Y, Li Y, Xu S, Lu J, Zhu Z, Chen S, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma via PI3K/Akt and STAT3. *Int J Cancer*. 2020;146(5):1383-95.
148. Shi N, Chen X, Liu R, Wang D, Su M, Wang Q, et al. Eukaryotic elongation factors 2 promotes tumor cell proliferation and correlates with poor prognosis in ovarian cancer. *Tissue Cell*. 2018;53:53-60.
149. Hamurcu Z, Ashour A, Kahraman N, Ozpolat B. FOXM1 regulates expression of eukaryotic elongation factor 2 kinase and promotes proliferation, invasion and tumorigenesis of human triple negative breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(13):16619-35.
150. Bayraktar R, Ivan C, Bayraktar E, Kanlikilicer P, Kabil NN, Kahraman N, et al. Dual Suppressive Effect of miR-34a on the FOXM1/eEF2-Kinase Axis Regulates Triple-Negative Breast Cancer Growth and Invasion. *Clin Cancer Res*. 2018;24(17):4225-41.
151. Shi Q, Xu X, Liu Q, Luo F, Shi J, He X. MicroRNA-877 acts as a tumor suppressor by directly targeting eEF2K in renal cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2016;11(2):1474-80.

152. Xie CM, Liu XY, Sham KW, Lai JM, Cheng CH. Silencing of EEF2K (eukaryotic elongation factor-2 kinase) reveals AMPK-ULK1-dependent autophagy in colon cancer cells. *Autophagy*. 2014;10(9):1495-508.
153. Moore CE, Wang X, Xie J, Pickford J, Barron J, Regufe da Mota S, et al. Elongation factor 2 kinase promotes cell survival by inhibiting protein synthesis without inducing autophagy. *Cell Signal*. 2016;28(4):284-93.
154. Chen Y, Wang S, Zhang L, Xie T, Song S, Huang J, et al. Identification of ULK1 as a novel biomarker involved in miR-4487 and miR-595 regulation in neuroblastoma SH-SY5Y cell autophagy. *Sci Rep*. 2015;5:11035.
155. Zhu H, Song H, Chen G, Yang X, Liu J, Ge Y, et al. eEF2K promotes progression and radioresistance of esophageal squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol*. 2017;124(3):439-47.
156. Moore CE, Regufe da Mota S, Mikolajek H, Proud CG. A conserved loop in the catalytic domain of eukaryotic elongation factor 2 kinase plays a key role in its substrate specificity. *Mol Cell Biol*. 2014;34(12):2294-307.
157. Wang X, Xie J, da Mota SR, Moore CE, Proud CG. Regulated stability of eukaryotic elongation factor 2 kinase requires intrinsic but not ongoing activity. *Biochem J*. 2015;467(2):321-31.
158. Leprivier G, Rotblat B, Khan D, Jan E, Sorensen PH. Stress-mediated translational control in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849(7):845-60.
159. Faller WJ, Jackson TJ, Knight JR, Ridgway RA, Jamieson T, Karim SA, et al. mTORC1-mediated translational elongation limits intestinal tumour initiation and growth. *Nature*. 2015;517(7535):497-500.
160. Meric-Bernstam F, Chen H, Akcakanat A, Do KA, Lluch A, Hennessy BT, et al. Aberrations in translational regulation are associated with poor prognosis in hormone receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012;14(5):R138.
161. Liu JC, Voisin V, Wang S, Wang DY, Jones RA, Datti A, et al. Combined deletion of Pten and p53 in mammary epithelium accelerates triple-negative breast cancer with dependency on eEF2K. *EMBO Mol Med*. 2014;6(12):1542-60.
162. Guo Y, Zhao Y, Wang G, Chen Y, Jiang Y, Ouyang L, et al. Design, synthesis and structure-activity relationship of a focused library of beta-phenylalanine derivatives as novel eEF2K inhibitors with apoptosis-inducing mechanisms in breast cancer. *Eur J Med Chem*. 2018;143:402-18.
163. Hong-Brown LQ, Brown CR, Huber DS, Lang CH. Lopinavir impairs protein synthesis and induces eEF2 phosphorylation via the activation of AMP-activated protein kinase. *J Cell Biochem*. 2008;105(3):814-23.
164. De Gassart A, Demaria O, Panes R, Zaffalon L, Ryazanov AG, Gilliet M, et al. Pharmacological eEF2K activation promotes cell death and inhibits cancer progression. *EMBO Rep*. 2016;17(10):1471-84.

165. De Gassart A, Martinon F. Translating the anticancer properties of eEF2K. *Cell Cycle*. 2017;16(4):299-300.
166. Devkota AK, Warthaka M, Edupuganti R, Tavares CD, Johnson WH, Ozpolat B, et al. High-throughput screens for eEF-2 kinase. *J Biomol Screen*. 2014;19(3):445-52.
167. Schwill M, Tamaskovic R, Gajadhar AS, Kast F, White FM, Pluckthun A. Systemic analysis of tyrosine kinase signaling reveals a common adaptive response program in a HER2-positive breast cancer. *Sci Signal*. 2019;12(565).
168. Zazo S, Gonzalez-Alonso P, Martin-Aparicio E, Chamizo C, Cristobal I, Arpi O, et al. Generation, characterization, and maintenance of trastuzumab-resistant HER2+ breast cancer cell lines. *Am J Cancer Res*. 2016;6(11):2661-78.
169. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res*. 2008;68(22):9280-90.
170. Ginestier C, Adelaide J, Goncalves A, Repellini L, Sircoulomb F, Letessier A, et al. ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene*. 2007;26(50):7163-9.
171. Turker Sener L, Albeniz G, Dinc B, Albeniz I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp Ther Med*. 2017;14(3):1866-70.
172. Garcia SN, Gutierrez L, McNulty A. Real-time cellular analysis as a novel approach for in vitro cytotoxicity testing of medical device extracts. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(7):2097-106.
173. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012;483(7391):603-7.
174. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):27-30.
175. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50.
176. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics*. 2011;27(12):1739-40.
177. Daemen A, Griffith OL, Heiser LM, Wang NJ, Enache OM, Sanborn Z, et al. Modeling precision treatment of breast cancer. *Genome Biol*. 2013;14(10):R110.
178. Costello JC, Heiser LM, Georgii E, Gonen M, Menden MP, Wang NJ, et al. A community effort to assess and improve drug sensitivity prediction algorithms. *Nat Biotechnol*. 2014;32(12):1202-12.

179. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W537-W44.
180. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21.
181. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923-30.
182. Batut B, Hiltemann S, Bagnacani A, Baker D, Bhardwaj V, Blank C, et al. Community-Driven Data Analysis Training for Biology. *Cell Syst.* 2018;6(6):752-8 e1.
183. Kocar M, Bozkurtlar E, Telli F, Yumuk F, Kaya H, Kocar H, et al. p95-HER2 and trastuzumab resistance in metastatic breast cancer; is immunohistochemistry appropriate? *J BUON.* 2014;19(1):245-9.
184. Chumsri S, Sperinde J, Liu H, Gligorov J, Spano JP, Antoine M, et al. High p95HER2/HER2 Ratio Associated With Poor Outcome in Trastuzumab-Treated HER2-Positive Metastatic Breast Cancer NCCTG N0337 and NCCTG 98-32-52 (Alliance). *Clin Cancer Res.* 2018;24(13):3053-8.
185. Wang RX, Xu XE, Huang L, Chen S, Shao ZM. eEF2 kinase mediated autophagy as a potential therapeutic target for paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer. *Ann Transl Med.* 2019;7(23):783.
186. Gijssen M, King P, Perera T, Parker PJ, Harris AL, Larijani B, et al. HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti-HER2 herceptin in breast cancer. *PLoS Biol.* 2010;8(12):e1000563.
187. Yang L, Li Y, Bhattacharya A, Zhang Y. A recombinant human protein targeting HER2 overcomes drug resistance in HER2-positive breast cancer. *Sci Transl Med.* 2019;11(476).
188. Vanderhoeven F, Redondo AL, Martinez AL, Vargas-Roig LM, Sanchez AM, Flamini MI. Synergistic antitumor activity by combining trastuzumab with retinoic acid in HER2 positive human breast cancer cells. *Oncotarget.* 2018;9(41):26527-42.
189. Kneissl J, Hartmann A, Pfarr N, Erlmeier F, Lorber T, Keller S, et al. Influence of the HER receptor ligand system on sensitivity to cetuximab and trastuzumab in gastric cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;143(4):573-600.
190. G DIC, Marengo G, Albanese NN, Marabeti MR, Musso R, Cancemi P, et al. Proteomic profiling of Trastuzumab (Herceptin(R))-sensitive and -resistant SKBR-3 breast cancer cells. *Anticancer Res.* 2013;33(2):489-503.
191. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D941-D7.

192. Wang X, Regufe da Mota S, Liu R, Moore CE, Xie J, Lanucara F, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase activity is controlled by multiple inputs from oncogenic signaling. *Mol Cell Biol.* 2014;34(22):4088-103.
193. Cully M, Downward J. Translational responses to growth factors and stress. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 1):284-8.
194. Tseng PH, Wang YC, Weng SC, Weng JR, Chen CS, Brueggemeier RW, et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer cells by using a novel celecoxib-derived phosphoinositide-dependent kinase-1 inhibitor. *Mol Pharmacol.* 2006;70(5):1534-41.
195. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer.* 2019;18(1):26.
196. Liu R, Chen Y, Liu G, Li C, Song Y, Cao Z, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death Dis.* 2020;11(9):797.
197. Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell.* 2009;15(5):429-40.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -1533

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 21 KASIM 2017 SALI
Toplantı No : 2017/25
Proje No : GO 17/914 (Değerlendirme Tarihi: 21.11.2017)
Karar No : GO 17/914- 32

Üniversitemiz Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN' ın sorumlu araştırmacı olduğu ve Uzm. Biol. Mustafa Emre GEDİK' in doktora tezi olan, GO 17/914 kayıt numaralı, **"Her2 Ekspresyonu Olan Meme Kanseri Hücrelerinde Ökaryotik Elongasyon Faktör-2 Kinaz (eEF-2K) Aktivasyonunun Rolü"** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU	(Başkan)	10. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	11. Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ	(Üye)
İZİNLİ			
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA	(Üye)	12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
4. Prof. Dr. Neçdet SAĞLAM	(Üye)	13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU	(Üye)	14. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
İZİNLİ			
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
KATILMADI			
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR	(Üye)
8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN	(Üye)	17. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	(Üye)
9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	18. Av. Meltem ONURLU	(Üye)

EK-2: Turnitin Ekran Görüntüsü

Tezin Tam Başlığı: HER2 Ekspresyonu Olan Meme Kanseri Hücrelerinde Ökaryotik Elongasyon Faktör-2 Kinaz (eEf2k) Aktivasyonunun Rolü

Öğrencinin Adı Soyadı: Mustafa Emre Gedik

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 117

HER2 Ekspresyonu Olan Meme Kanseri Hücrelerinde
Ökaryotik Elongasyon Faktör-2 Kinaz (eEF2K) Aktivasyonunun
Rolü

ORJİNALLİK RAPORU

%5

BENZERLİK ENDEKSİ

%5

İNTERNET KAYNAKLARI

%3

YAYINLAR

%1

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

mersin.mitosweb.com

İnternet Kaynağı

<%1

2

www.yumpu.com

İnternet Kaynağı

<%1

3

dspace.gazi.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

4

openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%1

5

www.freepatentsonline.com

İnternet Kaynağı

<%1

6

N. S. Persky, D. Hernandez, M. Do Carmo, L. Brenan et al. "Defining the landscape of ATP-competitive inhibitor resistance residues in protein kinases", Nature Structural & Molecular Biology, 2020

Yayın

<%1

7

www.fizyolojikongresi2014.org

İnternet Kaynağı

<%1

EK-3: Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Mustafa Emre Gedik
 Assignment title: Mustafa Emre Gedik Tez Teslim
 Submission title: HER2 Ekspresyonu Olan Meme Kanseri Hücrelerinde Ökaryo...
 File name: Mustafa_Emre_Gedik_Doktora_Tez_Turnitin_Son.pdf
 File size: 6.62M
 Page count: 120
 Word count: 17,302
 Character count: 115,742
 Submission date: 29-Jun-2021 12:33AM (UTC+0300)
 Submission ID: 1613475158

