

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**BETA-ADRENERJİK RESEPTÖR LİGANDLARININ MEME KANSERİ  
HÜCRELERİNİN REGÜLASYONUNA ETKİSİ**

**Dr. Matilda Merve TUĞLU  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Hakan GÜRDAL**

“Bu tez, TUBİTAK tarafından 113S396 numaralı proje ile desteklenmiştir”

**ANKARA  
2016**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

### ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

#### I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN

|                     |                                   |                |
|---------------------|-----------------------------------|----------------|
| Adı, Soyadı         | : Dr. Matilda Merve TUĞLU         | Sınav tarihi:  |
| Anabilim/Bilim Dalı | : Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı | 31 / 05 / 2016 |
| Tez Danışmanı       | : Prof. Dr. Hakan GÜRDAL          |                |

#### II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Tezin Başlığı: Beta adrenerejik reseptör ligandlarının meme kanseri hücrelerinin regülasyonuna etkisi.

Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi

Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

#### III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne  
☐ Reddine  
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine  
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

#### IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

#### Jüri Başkanı

Prof. Dr. H. Ongun ONARAN  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim/Bilim Dalı

#### Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hakan GÜRDAL  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim/Bilim Dalı

#### Jüri Üyesi

Prof. Dr. Remzi ERDEM  
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Farmakoloji Anabilim/Bilim Dalı

## ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmanın gerçekleşmesi için her türlü imkânı sağlayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hakan Gürdal'a en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Uzmanlık eğitimim süresince emeği geçen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyeleri Prof. Dr. Hasan Ongun Onaran, Prof. Dr. Mehmet Melli, Prof. Dr. Özden Palaoğlu, Prof. Dr. Emine Demirel Yılmaz, Prof. Dr. Eyüp Sabri Akarsu, Prof. Dr. Özlem Uğur, Prof. Dr. Hakan Ergün ve Doç. Dr. Kemal Sayar'a teşekkür ederim.

Birlikte çalışma fırsatı bulduğum "bench" arkadaşlarıma Fatma Gözde Özyön ve Saber Yari'ye ve asistan oda arkadaşlarım; Emire Ayşe Şahin, Nihan Gürcan, Tuğba Gümüştaz ve Tuğçe Kılınç'a manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Her zaman elinden geleni yapan, güler yüzünü hiç eksik etmeyen sekreterimiz Nevin Dalyan'a ve yardımlarından dolayı Metehan Taş'a teşekkür ederim.

Farmakoloji uzmanlık eğitimi boyunca desteğini esirgemeyen hayat arkadaşım, sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Devrim Tuğlu'ya teşekkür ederim.

"Bu tez çalışmasını sevgili oğullarım Enis Efe ve Ediz Ege Tuğlu'ya ithaf ediyorum".

# İÇİNDEKİLER

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| Kabul ve Onay                                                         | i    |
| Önsöz                                                                 | ii   |
| İçindekiler                                                           | iii  |
| Simgeler ve Kısaltmalar Dizini                                        | v    |
| Şekiller Dizini                                                       | viii |
| Tablolar Dizini                                                       | xi   |
| 1. Giriş                                                              | 1    |
| 2. Genel Bilgiler                                                     | 4    |
| 3. Materyal ve yöntem                                                 | 15   |
| 3.1. Materyal                                                         | 15   |
| 3.1.1. Hücre kültürü                                                  | 15   |
| 3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler                                   | 15   |
| 3.2. Yöntem                                                           | 15   |
| 3.2.1. Proteinlerin ekspresyonunun değerlendirilmesi                  | 15   |
| 3.2.1.1. Konfluent hücrelerde yapılan deneyler                        | 16   |
| 3.2.1.2. Protein elektroforezi ve immüno blot                         | 16   |
| 3.2.1.3. Protein mRNA düzeyi                                          | 17   |
| 3.2.2. Hücre proliferasyonu deneyi                                    | 18   |
| 3.2.2.1. WST-1 proliferasyon deneyi                                   | 18   |
| 3.2.2.2. iCelligence system ile proliferasyon deneyi                  | 18   |
| 3.2.3. İstatistiksel değerlendirme                                    | 19   |
| 4. Bulgular                                                           | 20   |
| 4.1. Adrenerjik reseptör agonistleri aracılı pERK1/2 defosforilasyonu | 20   |
| 4.2. $\beta_2$ -AR aracılı pERK1/2 defosforilasyonu                   | 21   |
| 4.3. $\beta_2$ -AR aracılı pERK1/2 defosforilasyonu ve $G_{i/o}$      | 22   |

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4. $\beta_2$ -AR aracılı pERK1/2 defosforilasyonu ve Protein Kinaz A ile ilişkisi                      | 23        |
| 4.5. $\beta_2$ -AR aracılı pERK1/2 defosforilasyonunda DUSP1 ve DUSP6 enzimlerinin rolü                  | 24        |
| 4.6. $\beta_2$ -AR uyarısı ile DUSP1/DUSP6 protein seviyeleri                                            | 25        |
| 4.7. $\beta_2$ -AR uyarısı ile total DUSP1 mRNA seviyeleri                                               | 27        |
| 4.8. $\beta_2$ -AR uyarısı ile total DUSP1 ve PKA ilişkisi                                               | 28        |
| 4.9. $\beta$ -AR aracılı pERK1/2 defosforilasyonunda PP1 ve PP2A'nın rolü                                | 29        |
| 4.10. $\beta_2$ -AR uyarısı ve PP1/PP2A aktivitesi                                                       | 30        |
| 4.11. Farklı sürelerde $\beta_2$ -AR uyarısı ile PP1 ve PP2A protein seviyeleri                          | 31        |
| 4.12. PP1 ve PP2A inhibitörlerinin varlığında $\beta_2$ -AR uyarısı ile pPP1 ve pPP2A protein seviyeleri | 32        |
| 4.13. $\beta_2$ -AR uyarısı ile pPP1 enzim seviyesinde PKA'nın rolü                                      | 34        |
| 4.14. $\beta_2$ -AR uyarı ve hücre proliferasyonu                                                        | 35        |
| 4.15. Farklı agonistlerle $\beta_2$ -AR uyarısı ve MDA-MB231 hücre proliferasyonu                        | 36        |
| 4.16. $\beta_2$ -AR agonistler aracılı pERK1/2 defosforilasyonun süresi                                  | 37        |
| 4.17. Hücre proliferasyonu ve $\beta_2$ -AR uyarısının sürekliliği                                       | 39        |
| 4.18. PKA'nın hücre proliferasyonuna etkisi                                                              | 40        |
| <b>5. Tartışma</b>                                                                                       | <b>42</b> |
| <b>6. Sonuçlar</b>                                                                                       | <b>51</b> |
| <b>Özet</b>                                                                                              | <b>52</b> |
| <b>Summary</b>                                                                                           | <b>54</b> |
| <b>Kaynaklar</b>                                                                                         | <b>56</b> |
| <b>Ekler</b>                                                                                             | <b>76</b> |
| <b>Ek 1</b>                                                                                              | <b>76</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                |                                                               |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>AC</b>                      | Adenilat Siklaz                                               |
| <b>AKAP</b>                    | “PKA Anchoring Proteinler”                                    |
| <b>AR</b>                      | Adrenerjik reseptör                                           |
| <b>ATP</b>                     | Adenozin trifosfat                                            |
| <b><math>\beta_2</math>-AR</b> | Beta-2 adrenerjik reseptör                                    |
| <b>BMK1</b>                    | “Big MAP kinase 1”                                            |
| <b>°C</b>                      | Celcius                                                       |
| <b>cAMP</b>                    | 3'-5'-siklik adenozin monofosfat                              |
| <b>Caly</b>                    | Calyculin                                                     |
| <b>Cln</b>                     | Clenbuterol                                                   |
| <b>dk</b>                      | Dakika                                                        |
| <b>DMEM</b>                    | “Dulbecco’s Modified Eagle Medium”                            |
| <b>DSP</b>                     | “Dual-specificity phosphatase”                                |
| <b>DUSP</b>                    | Dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatase |
| <b>EDTA</b>                    | Etilendiamin tetra asetik asit                                |
| <b>EGF</b>                     | “Epidermal growth factor”                                     |
| <b>EGFR</b>                    | “Epidermal growth factor receptor”                            |
| <b>Epac</b>                    | “Exchange protein activated by cAMP”                          |
| <b>Epi</b>                     | Epinefrin                                                     |
| <b>ER</b>                      | Östrojen reseptör                                             |
| <b>ERK1/2</b>                  | “Extracellular signal regulated kinase”                       |
| <b>FSS</b>                     | Fetal sığır serumu                                            |
| <b>FGF</b>                     | “Fibroblast growth factor”                                    |
| <b>Fmt</b>                     | Formoterol                                                    |
| <b>Frs</b>                     | Forskolin                                                     |
| <b>GAPDH</b>                   | Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz                           |

|                      |                                                  |
|----------------------|--------------------------------------------------|
| <b>GDP</b>           | Guanozin 5' difosfat                             |
| <b>GPKR</b>          | G protein ile kenetli reseptör                   |
| <b>G<sub>s</sub></b> | “Stimulatory guanin-nukleotide binding protein”  |
| <b>GTP</b>           | Guanozin 5' trifosfat                            |
| <b>HCl</b>           | Hidroklorik asit                                 |
| <b>HER2</b>          | “Human epidermal growth factor 2 receptor”       |
| <b>HRP</b>           | “Horse radish peroxidase”                        |
| <b>I-1</b>           | Inhibitör-1                                      |
| <b>I-2</b>           | Inhibitör-2                                      |
| <b>İzo</b>           | İzoproterenol                                    |
| <b>JNK</b>           | c-Jun amino-terminal kinaz                       |
| <b>M</b>             | Molarite                                         |
| <b>MAPK</b>          | “Mitogen activated protein kinase”               |
| <b>MAPKK</b>         | “Mitogen activated protein kinase kinase”        |
| <b>MAPKKK</b>        | “Mitogen activated protein kinase kinase kinase” |
| <b>MDA-MB231</b>     | Meme kanser hücresi                              |
| <b>mg</b>            | Miligram                                         |
| <b>MKB</b>           | “MAPK-binding”                                   |
| <b>MKP</b>           | “Mitogen-activated protein kinase phosphatase”   |
| <b>ml</b>            | Mililitre                                        |
| <b>µg</b>            | Mikrogram                                        |
| <b>µl</b>            | Mikrolitre                                       |
| <b>ng</b>            | Nanogram                                         |
| <b>NGF</b>           | “Neuronal growth factor”                         |
| <b>nm</b>            | Nanometre                                        |
| <b>ParP</b>          | “poly (ADP ribose) polymerase”                   |
| <b>p-ERK</b>         | Fosforile ERK                                    |
| <b>PBS</b>           | “Phosphate buffer saline”                        |
| <b>PKA</b>           | Protein kinaz A                                  |
| <b>PSP</b>           | Protein serin/treonin fosfataz                   |

|                 |                                                       |
|-----------------|-------------------------------------------------------|
| <b>PTP</b>      | Protein tirozin fosfataz                              |
| <b>PP</b>       | Protein fosfataz                                      |
| <b>PPP</b>      | Fosfoprotein fosfatazı                                |
| <b>PP1</b>      | Protein fosfataz 1                                    |
| <b>PP2</b>      | Protein fosfataz 2                                    |
| <b>pPP1</b>     | Fosforile PP1                                         |
| <b>pPP2</b>     | Fosforile PP2                                         |
| <b>PR</b>       | Progesteron reseptör                                  |
| <b>PTX</b>      | Pertussis toksin                                      |
| <b>PVDF</b>     | “Polyvinylidene Difluoride”                           |
| <b>RTK</b>      | Tirozin kinaz reseptör                                |
| <b>S</b>        | Saat                                                  |
| <b>SDS</b>      | Sodyum dodesil sülfat                                 |
| <b>SDS-PAGE</b> | Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi |
| <b>sn</b>       | Saniye                                                |
| <b>t-ERK</b>    | Total ERK                                             |
| <b>TBS</b>      | “Tris-Buffered Saline”                                |
| <b>Trb</b>      | Terbutalin                                            |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                  |                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.1</b> | MDA-MB231 kanser hücrelerinde, $\beta_2$ -AR ligandları ve cAMP aktivatörü forskolin ile uyarıldıktan sonra fosforile ERK1/2 düzeyi .....                                                                | 20 |
| <b>Şekil 4.2</b> | $\beta_2$ -AR antagonisti ICI118,551 ile inkübasyondan sonra terbutalin ile uyarılmış MDA-MB231 kanser hücrelerinde fosforile ERK1/2 düzeyi.....                                                         | 21 |
| <b>Şekil 4.3</b> | $G_{i\alpha}$ inhibitörü pertusis toxini (PTX) ile inkübe edildikten sonra $\beta_2$ -AR ligandları terbutalin ve clenbuterol ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi..... | 22 |
| <b>Şekil 4.4</b> | PKA inhibitörü H89 ile inkübe edildikten sonra $\beta_2$ -AR ligandı terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi.....                                               | 23 |
| <b>Şekil 4.5</b> | DUSP1/6 inhibitörü BCI ile inkübasyon sonrası $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi.....                                               | 24 |
| <b>Şekil 4.6</b> | $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş DUSP1, total DUSP1 ve total DUSP6 düzeyi.....                                                 | 26 |
| <b>Şekil 4.7</b> | $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde total DUSP1 mRNA düzeyleri.....                                                                              | 27 |

|                   |                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.8</b>  | PKA inhibitörü H89 ile inkübe edildikten sonra $\beta_2$ -AR ligandı terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücrelerinde total DUSP1 düzeyi.....                                                            | 28 |
| <b>Şekil 4.9</b>  | MDA-MB231 hücreleri PP1/PP2A inhibitörü Calyculin A ile inkübe edildikten sonra $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin uyarısından sonra fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi.....                                         | 29 |
| <b>Şekil 4.10</b> | MDA-MB231 kanser hücresinde, $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin uyarısı ile fosforillenmiş PP1, total PP1, fosforillenmiş PP2A, total PP2A düzeyleri.....                                                      | 30 |
| <b>Şekil 4.11</b> | $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş PP1 ve fosforillenmiş PP2A düzeyleri.....                                                          | 32 |
| <b>Şekil 4.12</b> | PP1/PP2A inhibitörü Calyculin A ile inkübasyon sonrası $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş PP1 ve fosforillenmiş PP2A protein seviyeleri.....           | 33 |
| <b>Şekil 4.13</b> | PKA inhibitörü H89 ile inkübe edildikten sonra $\beta_2$ -AR ligandı terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş PP1 düzeyi.....                                                       | 34 |
| <b>Şekil 4.14</b> | $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücrelerinde WST-1 yöntemi ve iCelligence sistemi ile saptanan proliferasyon ve hücre sayısının ikiye katlanma süreleri..... | 36 |

|                   |                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.15</b> | $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin, formoterol ve clenbuterol ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücrelerinde WST-1 yöntemi ile saptanan proliferasyon düzeyleri.....    | 37 |
| <b>Şekil 4.16</b> | $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi.....                                                       | 38 |
| <b>Şekil 4.17</b> | $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile 24 saat'lik uyarıdan sonra 96. saatte ve 96 saat'lik uyarıdan sonra WST-1 yöntemi ile saptanan MDA-MB231 kanser hücre proliferasyonları ..... | 40 |
| <b>Şekil 4.18</b> | PKA inhibitörü varlığında $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile 72 ve 96 saat'lik uyarıdan sonra WST-1 yöntemi ile saptanan MDA-MB231 kanser hücre proliferasyonları.....           | 41 |
| <b>Şekil 5.1</b>  | $\beta_2$ -AR uyarı ile ERK1/2 defosforilasyon mekanizmasının şematik gösterilmesi.....                                                                                             | 50 |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                   |                                                                      |   |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------|---|
| <b>Tablo 1.1.</b> | Meme kanseri hücrelerinin immünohistokimyasal sınıflandırılması..... | 1 |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------|---|



## 1. GİRİŞ

Her yıl milyonlarca insan kanserden ölmektedir. Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra dünyada en sık görülen kanser türüdür. Genel popülasyonda meme kanserinden ölüm beşinci sırada yer alırken, kadın popülasyonunda birinci sırada yer almaktadır. Meme kanserinin görülme sıklığı ve beraberinde getirdiği maliyet kaybı her geçen yıl önemli ölçüde artmaktadır (Jemal ve ark., 2010). Meme kanserleri hücresel düzeyde farklı özellikler göstermektedir ve barındırdığı reseptör tipine göre östrojen reseptörü pozitif (ER+), negatif (ER-), progesteron reseptörü pozitif (PR+), negatif (PR-) ve insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 pozitif (HER2+), negatif (HER2-) olarak sınıflandırılmaktadır. Belirli reseptör içeren kanser hücreleri belirli gruplara ayrılmaktadır; Luminal A (ER+ ve/veya PR+, HER2-, düşük Ki67), Luminal B (ER+ ve/veya PR+, HER2-, yüksek Ki67), HER2 (ER-, PR-, HER2+) ve üçlü negatif (ER-, PR-, HER2-) (Tablo 1.1).

| Meme kanserin alttipi | Özellikleri                                        |
|-----------------------|----------------------------------------------------|
| Luminal A             | ER+ ve/veya PR+,<br>HER2-, (düşük Ki67)            |
| Luminal B             | ER+ ve/veya PR+<br>HER2+ (veya HER2-, yüksek Ki67) |
| HER2                  | ER-, PR-, HER2+                                    |
| Üçlü negatif          | ER-, PR-, HER2-                                    |

**Tablo 1.1.** Meme kanseri hücrelerin immünohistokimyasal sınıflandırılması.

Hormon reseptörlerini içeren Luminal A ve B alt tip kanser hücreleri hormonal tedaviye, HER2 reseptörlerini içeren kanser hücreleri ise HER2 reseptörlerine karşı geliştirilmiş antikorlara duyarlılık göstermektedir. Üçlü negatif meme kanser türü ER, PR ve HER2 reseptörleri içermediği için hormonal ilaçların ve transtuzumab gibi HER2 antikorlarının uygulandığı tedavilere dirençlidir. Bugün üçlü negatif meme kanserinde uygulanan tedavi protokolleri cerrahi, radyoterapi ve çeşitli kemoterapötiklerin kombinasyonlarından oluşmaktadır. Ayrıca poly (ADP ribose) polymerase (ParP) inhibitörleri tedavide denenmektedir ve faz 2, faz 3 klinik araştırmalarının sonuçları umut vaat etmektedir (Plummer, 2011).

Çalışmalarımızda MDA-MB231 hücre serisi kullanılmıştır. Bu hücreler üçlü negatif kanser hücre serisi olarak sınıflandırılmakta olup tedaviye dirençli ve yüksek invazyon yeteneğine sahip hücrelerdir (Neve ve ark., 2006). MDA-MB231 hücre serisi ER, PR ve HER2 reseptörlerini içermemesine rağmen beta-2 adrenerjik reseptörleri ( $\beta_2$ -AR) çok yoğun olarak içermektedir (Barron ve ark., 2012).  $\beta_2$ -AR'ün kanser hücrelerinde regülatör etkileri çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Carie ve Sebti, 2007; Ally ve ark., 1989; Slotkin ve ark., 2000). MDA-MB231 hücreleri yoğun  $\beta_2$ -AR içermeleri nedeniyle, bu reseptörlerin kanser hücre proliferasyonunun regülasyonundaki önemini anlamak amacı ile birçok çalışmada kullanılmıştır.  $\beta_2$ -AR uyarısı farklı hücrelerin proliferasyonunda farklı etkilere neden olmaktadır. Bazı hücrelerin proliferasyonunda inhibisyon (Slotkin ve ark., 1987) oluştururken, farklı hücrelerde proliferasyonu artırıcı etki göstermektedir (Re ve ark., 1992). Carie ve Sebti, (2007) MDA-MB231 hücrelerinde  $\beta_2$ -AR uyarısının ERK1/2 fosforilasyonunu inhibe ettiğini ve bu yanıtın  $\beta_2$ -AR aracılı antiproliferatif etkinin bir mekanizması olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Fakat gözlemlenen bu antiproliferatif etkinin mekanizmaları günümüzde yeterince açıklık kazanmamıştır. Literatürde  $\beta_2$ -AR aracılı ERK aktivitesinin düzenlenmesi merak edilen ve araştırılan bir konudur. Kinazların aktivitesini düzenleyen en önemli enzimler fosfatazların olduğu bugün iyi bilinmektedir. ERK aktivitesi ile ilişkisi gösterilen DUSP1, DUSP6, PP1 ve PP2A fosfatazların etkisi MB231 hücrelerde henüz net bir şekilde ortaya konulmamıştır.

Dolayısıyla ERK1/2 yolağının inhibisyonu ile MDA-MB231 kanser hücresinin proliferasyonunun ne şekilde etkilendiğı merak edilen güncel bir konudur.

Bizim çalışmamızın amacı,  $\beta_2$ -AR uyarısı ile oluşan ERK1/2 defosforilasyon mekanizmasının fosfatazlarla ilişkisini ve bu defosforilasyonun  $\beta_2$ -AR reseptörler aracılı gözlemlenen antiproliferatif etkideki rolünü aydınlatmaya çalışmaktır. Üçlü negatif meme kanser hücresinin davranış biçiminin ortaya konması, hücre proliferasyonunu yakından ilgilendiren mekanizmaların aydınlatılması ve elde edilen sonuçların tartışılmasının, kanser tedavisine yönelik yaklaşımlara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.



## 2. GENEL BİLGİLER

Kanser oluşumunda normal canlı hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi esastır. Bu dönüşümü sağlayan birçok neden vardır. Bunlar arasında hücrelerin kontrolsüz çoğalması, apoptoza direnç geliştirmesi, artmış invazyon ve anjiogenezis gibi unsurlar yer almaktadır (Wright ve ark., 1989; Evan ve Littlewood, 1998; Hanahan ve Folkman, 1996; Johnson, 1991). Her yıl milyonlarca insan kanserden ölmektedir. Meme kanseri kadınlarda sık görülen ve ölüm oranı yüksek olan bir kanser türüdür. Meme kanserleri çok geniş heterojen bir grup oluşturmaktadır. Barındırdığı reseptör tipine göre (ER, PR ve HER2) meme kanser hücreleri immünohistokimyasal olarak üç ana grup içinde sınıflandırılmaktadır; 1) hormon reseptörü pozitif (ER+, PR+), 2) HER2 reseptörü pozitif (HER2+) ve 3) PR, ER ya da HER2 reseptörü içermeyen kanser hücresi. Son grupta yer alan kanser hücre tipi üç reseptörden hiçbirini taşımadığı için üçlü negatif olarak adlandırılmaktadır (Chavez ve ark., 2010). ER, PR ve HER2 reseptör içeren kanser hücrelerinin tedavisinde hormonal tedaviler ve bu reseptörleri hedefleyen terapötik yaklaşımlar mevcuttur. Üçlü negatif meme kanserleri, tüm meme kanserlerinin % 10–15’ini oluşturmakta ve diğer meme kanseri tiplerine göre daha kötü prognoz sergilemektedir. Ayrıca ER, PR ve HER2 reseptörü içermediğinden hormonal ve trastuzumab gibi HER2 reseptörlerine yönelik tedavilere dirençlidir (Chavez ve ark., 2010). Bugün en çok uygulanan tedavi türü kemoterapi ajanlarının kombinasyonları ile uygulanan tedavi protokolleridir (Brenton ve ark., 2005). Üçlü negatif kanser hücrelerinin tedaviye dirençliliği ve kötü prognozu göz önünde bulundurulduğunda, bu hücrelerin doğasını anlamak ve terapötik açıdan hedef olabilecek yolları ortaya koymak oldukça önemlidir.

*Mitogen-activated protein kinaz (MAPK)*’lar evrim boyunca iyi korunmuş enzimlerdir ve apoptoz, büyüme ve diferansiyasyon gibi hücre içi olayların regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bugün dört grup MAPK bilinmektedir; *extracellular signal-regulated kinaz (ERK1 ve ERK2)*’lar, c-Jun amino-terminal kinazlar (JNK1, JNK2 ve

JNK3), p38 kinazlar (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  ve p38 $\delta$ ) ve ERK5/Big MAP kinaz 1 (BMK1). Her biri farklı yollarla aktive olmaktadır ve ayrı ayrı ya da koordine bir şekilde sinyali iletmektedirler (Chang ve Karin, 2001; Davis, 2000; Nishida ve Gotoh, 1993; Robinson ve Cobb, 1997; Sturgill ve Wu, 1991; Waskiewicz ve Cooper, 1995).

ERK1/2 proteini, Ras/Raf/MEK sinyal yolağının önemli bir MAPK üyesidir. Bu yolak evrim boyunca korunmuş olup tirozin kinaz reseptörleri (RTK), G proteini ile kenetli reseptörler (GPKR) ve integrinlerin stimülasyonu ile aktive olabilmektedir (Widmann ve ark., 1999). ERK1/2'in aktivasyonu birçok sitoplazmik ve nükleer efektör proteinlerin fosforilasyonuna neden olmaktadır ve hücrenin akıbetini belirleyen proliferasyon, diferansiyasyon, yaşlanma ve ölüm gibi olaylarda önemli role sahiptir (Dudley ve ark., 1995; Chen ve ark., 2001). ERK1/2 aktifleştğinde nükleusa transloke olmakta ve önemli efektör proteinler olan transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek (Chen ve ark., 1992; Gonzalez ve ark., 1993; Lenormand ve ark., 1993; Zheng ve Guan, 1994) bazı genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol almaktadır (Gille ve ark., 1995; Hill ve Treisman, 1995; Sugimoto ve ark., 1997).

Sıçan fibroblast HIRcB hücrelerinde, onkogen ailesinin bir üyesi olan Elk-1 transkripsiyon faktörünün aktivitesi ERK1/2 tarafından regüle edilmektedir (Gille ve ark., 1992). Nakajima ve ark. (1993) çalışmalarında fibroblast NIH 3T3 ve embriyonik karsinoma P19 hücre serisinde sitokin sinyalinin düzenlenmesinde rolü olan NF-IL6 transkripsiyon faktörünün regülasyonunun ERK1/2 tarafından sağlandığını göstermişlerdir. Literatür bulguları ERK1/2 sinyalinin hücre davranışını düzenlemekte anahtar role sahip olduğunu göstermektedir. ERK1/2 aktivitesinin süresi ve düzeyi ERK1/2'in etkinliği açısından önemlidir (Pouyssegur ve ark., 2003; Murphy ve Blenis, 2006). Sıçan PC12 hücre serisi ile yapılan deneylerde epidermal büyüme faktör (EGF) uyarısı ile meydana gelen kısa süreli ERK1/2 aktivasyonu hücre proliferasyonuna neden olurken, aynı hücre serisinde nöronal büyüme faktörüne (NGF) bağlı gelişen uzun süreli ERK1/2 aktivasyonu hücrelerin diferansiyasyonuna neden olmaktadır (Marshall, 1995). Bazı çalışmalar ERK sinyalinin hücre apoptozunu indüklediğini göstermişlerdir. MCF-7 meme kanser hücresinde RAF inhibisyonu ile meydana gelen azalmış ERK1/2 sinyali, bu hücreleri antitümöral bir madde olan

taxol aracılı apoptozisten korumuştur (Blagosklonny ve ark., 1996). Artmış ERK1/2 sinyalinin nöron ve T lenfosit hücrelerinin ölümüne neden olduğu literatürde gösterilmiştir (Subramaniam ve Unsicker, 2010; Teixeira ve Daniels, 2010). Bu çalışmalardan farklı olarak bazı araştırmacılar ERK1/2 sinyalinin hücre proliferasyonunu arttırdığını, kanserle yakından ilişkili olduğunu ve kanserlerin yaklaşık % 30'unda bozulmuş ERK1/2 sinyalinin söz konusu olduğunu literatürde bildirmişlerdir (Sebolt-Leopold ve Herrera, 2004; Eisenmann ve ark., 2003). İnsan ve hamster pankreas kanser hücresinde bazal ERK1/2 aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir (Tan ve ark., 2004). Zayzafoon ve ark. (2004) çalışmalarında prostat kanser hücrelerinin kemik dokusuna metastaz yapması için ERK1/2 aktivitesine ihtiyacı olduğunu ileri sürmüşler. Böbrek, kolon ve akciğer kaynaklı bazı kanser hücrelerinde artmış bazal ERK1/2 aktivitesi gözlemlenmiştir (Hoshino ve ark., 1999). İmmünohistokimyasal yöntemle primer kolon kanser hücrelerinde ve adenomalarda artmış ERK1/2 ekspresyonu tespit edilmiş ve elde edilen bulgular artmış MAPK aktivitesinin tümörögenezisde rolü olabileceğini göstermiştir (Lee ve ark., 2004). Antiapoptik proteinleri (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, IAP) indükleyerek ya da proapoptik proteinleri (Bad, Bim) baskılayarak, ERK1/2'in proonkogenik etki gösterdiği düşünülmektedir (Balmanno ve Cook, 2009). Ayrıca ERK1/2 yolağında yer alan proteinlerin aşırı aktivitesi ya da ERK1/2 sinyalini negatif regüle eden proteinlerin aktivitesinde azalma, ERK1/2'in artmış bazal aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır (Cobb ve Goldsmith, 1995). ERK1/2 aktivitesinin süresi ve büyüklüğü sinyal yolağını etkileyen kinazlar ile fosfatazların aktivitesine bağlı olarak düzenlenebilmektedir. RAF-1 veya RAS proteinlerin indüklenmesi ile ERK1/2 aktivitesinde artış meydana gelmektedir (Hoshino ve ark., 1999; Keiper ve ark., 2004). ERK1/2 aktivasyon halkasında tirozin ve/veya treonin rezidülerin defosforilasyonu ile ERK1/2 aktivitesinde azalma meydana gelmektedir. Protein serin/treonin fosfatazlar (PSPs) ve protein tirozin fosfatazlar (PTPs) ERK1/2 defosforilasyonunda rol alan enzimlerdir.

*Dual-specificity fosfatazlar* (DUSPs) PTP ailesinin bir üyesi olup MAPK'ların serin/treonin ile tirozin bölgelerini defosforile ederler. *Mitogen-activated protein*

*kinaz fosfatazlar* (MKPs) ise DUSP ailesinin üyesidir ve MAPK'ların aktif halkasında treonin ve tirozin rezidülerini defosforile ederek onları inaktive etmektedir. MKP enzimlerinin etkilerinin tanımlanmasında iki bölge önemli görünmektedir, N-terminal kısmında yerleşik *MAPK-binding* (MKB) bölgesi ve C-terminal kısmında yerleşik *dual-specificity fosfataz* (DSP) bölgesi. MKB bölgesi enzimin MAPK'a karşı spesifitesini belirlemekte rol almaktadır, DSP bölgesi ise enzimin katalitik aktivitesinden sorumludur (Tanoue ve ark., 2000; Tanoue ve ark., 2001b). MKP'ler substrat afiniteleri, doku dağılımları, subsellüler lokalizasyonları ve ekstrasellüler uyarılarla indüklenme özellikleri açısından farklılık göstermektedirler. Subsellüler lokalizasyonuna göre üç gruba ayrılırlar; 1) nukleusta lokalize olanlar MKP1/DUSP1, PAC1/DUSP2, MKP-2/DUSP4 ve hVH3/DUSP5 (Rohan ve ark., 1993; Guan ve Butch, 1995; Kwak ve Dixon, 1995), 2) sitoplazmada lokalize olanlar MKP3/DUSP6, MKP-X/DUSP7 ve MKP-4/DUSP9, (Dowd ve ark., 1998; Tanoue ve ark., 2001a; Groom ve ark., 1996), 3) hem sitoplazma hem nukleusta lokalize olanlar M3-6/DUSP8, MKP-7/DUSP16 ve MKP-5/DUSP10 (Tanoue ve ark., 1999; Muda ve ark., 1997; Theodosiou ve ark., 1996; Kondoh ve Nishida, 2007). Bu proteinlerin farklı MAPK'lara karşı afiniteleri değişkenlik göstermektedir. Bazı MKP proteinler FXFP motifi içerdiğinden ERK1/2'e karşı afiniteleri daha yüksektir (Jacobs ve ark., 1999). DUSP1 diğer adı ile MKP-1 nukleusta lokalize bir enzimdir. MAPK'ların aktivasyonunu sağlayan büyüme faktörleri, ısı şoku proteinleri (*heat shock proteins*) ve oksidatif stres gibi stimuluslarla indüklenebilmektedir (Charles ve ark., 1992; Keyse ve Emslie, 1992). DUSP1 enzimi çok hızlı indüklenen *MKP1* geni tarafından kodlanmaktadır. Aktif ERK'in sitozolden nukleusa translokasyonu ile *MKP-1* geni indüklenir ve DUSP1 enziminin ekspresyonu artar. ERK1/2'in aktive edilmesi ile DUSP1 mRNA ekspresyonunda artış bildirilmiştir (Brondello ve ark., 1997; Cook ve ark., 1997). Bokemeyer ve ark. (1996) ise NIH3T3 fibroblast hücrede, DUSP1 transkripsiyonu için ERK1/2 proteinin aktivasyonundan çok JNK/SAPK aktivasyonun gerekli olduğunu savunmuştur. Aktif ERK1/2'in sitozolden nukleusa translokasyonu ile *MKP-1* gen indüklenir ve DUSP1'in ekspresyonu artmaktadır. Artmış DUSP, ERK1/2'yi defosforile ederek onu inaktif hale getirmektedir (Wu ve ark., 2005a). Sun

ve ark. (1993) çalışmalarında serum ile indüklenen fare 3T3 fibroblast hücrelerinde ERK1/2'in inaktivasyon kinetiğinin DUSP1 protein sentezi ile paralellik gösterdiğini ve DUSP1 protein sentezinin inhibisyonu ile ERK1/2 aktivitesinin süresinin uzadığını göstermişlerdir. Damar düz kas hücresinde, DUSP1 mRNA inhibisyonuna neden olan aktinomisin D ve DUSP1-spesifik antisens oligonükleotidler, ERK1/2 aktivitesinin uzamasına neden olmuştur (Duff ve ark., 1995). Fibroblastlarda DUSP1 indüksiyonuna neden olan uyarılardan sonra, ERK1/2 deaktivasyonu ile DUSP1 indüksiyonu arasında zamansal olarak paralellik gözlemlenmiştir (Wayne ve ark., 2006). Rekombinant DUSP1 gen transferinin, ERK1/2 defosforilasyonuna ve ERK1/2 deaktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Alessi ve ark., 1993; Sun ve ark., 1993; Zheng ve Guan, 1993).

DUSP1 aktivitesi ayrıca ERK1/2 aktivitesi ile düzenlenebilmektedir. Fosforillenmiş ERK1/2 DUSP1'i fosforile etmekte ve DUSP1'i yıkan proteazlara karşı dirençli hale getirmekte ve onun stabilitesi arttırabilmektedir (Brondello ve ark., 1999). Ayrıca DUSP1'in katalitik aktivitesinin fosforillenmiş her üç MAPK ile etkileştiğinde arttığını ileri süren çalışmalar mevcuttur (Slack ve ark., 2001). DUSP1'in MAPK'larla yakın ilişkisi, bu enzimin hücre siklusu ve apoptoz regülasyonunda rol aldığını düşündürmektedir (Zhou ve ark., 2006; Wu ve Bennett, 2005).

Birçok çalışma meme, akciğer, over, prostat, pankreas, karaciğer ve mide gibi farklı kanser türlerinde DUSP1 ekspresyonunun değiştiğini göstermiştir (Wang ve ark., 2003; Vicent ve ark., 2004; Denkert ve ark., 2002; Rauhala ve ark., 2005, Liao ve ark., 2003; Tsujita ve ark., 2005; Bang ve ark., 1998). Kötü huylu tümörlerde DUSP1 ekspresyonunun normal hücrelere göre beş kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2003). Küçük hücreli olmayan akciğer kanser (NSCLC)'de yüksek seviyede DUSP1 ekspresyonu tespit edilmiş ve klinik sonuçlar için bir prognostik marker olabileceği ileri sürülmüştür (Vicent ve ark., 2004). Oysa hormonal tedaviye dirençli prostat kanserlerinde DUSP1 seviyeleri benign prostat hiperplaziye göre çok daha düşük seviyede tespit edilmiştir (Rauhala ve ark., 2005). Midede DUSP1 aşırı ekspresyonu adenokanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Bang ve ark., 1998). Farklı dokulardan alınan 164 insan epitelyal tümöründe (erken faz prostat, kolon ve

mesane kanserlerinde) DUSP1 aşırı ekspresyonu gözlemlenirken, histopatolojik derecesi yüksek olan ya da metastatik tümörlerde, enzimin progresif bir ekspresyon kaybı gösterdiği sapanmıştır (Loda ve ark., 1996). DU145 kanser hücrelerinde DUSP1 aşırı ekspresyonunun Fas ligand-aracılı apoptozu inhibe ederek anti-kanser ilaçların etkisini engellediği gösterilmiştir (Srikanth ve ark., 1999). BT-474 meme kanser hücrelerinde proteozom inhibitörleri tarafından indüklenen DUSP1 proteini, apoptozu inhibe etmektedir (Small ve ark., 2004). Tüm bu bilgiler, DUSP1'in kanserogeneizde etkisi olabileceğini ve kanserli hastalar için prognostik değeri olabileceğini göstermektedir. DUSP1 etkisi ile ilgili literatürde farklı bildirimler bulunmaktadır. EGF ile uyarılan PC12 hücrelerde, DUSP1 mRNA'sının indüksiyonu meydana gelmektedir fakat ERK1/2 inaktivasyonunun mRNA'nın indüksiyonundan önce gözlemlenmesi, ERK1/2 aktivasyonunu düzenlenmesinde DUSP1'den farklı bir mekanizmanın rol aldığını düşündürmektedir (Wu ve ark., 1994; Alessi ve ark., 1995).

DUSP6 diğer adı MKP-3, sitozolik bir enzimdir ve ERK1/2'e karşı 100 kat (JNK veya p38'e göre) daha spesifik bir proteindir (Theodosiou ve Ashworth, 2002; Groom ve ark., 1996; Muda ve ark., 1996). DUSP6'nın amino terminal bölgesi ile fosforillenmiş ERK1/2 etkileşmesi sonucu, DUSP6'nın katalitik bölgesinde konformasyon değişikliği meydana gelmekte ve enzimin katalitik aktivitesi artmaktadır (Stewart ve ark., 1999; Zhou ve Zhang, 1999; Rigas ve ark., 2001). Böylece DUSP6 kendi substratı ile katalitik düzeyde indüklenmektedir (Camps ve ark., 1998a; Muda ve ark., 1998). DUSP6'nın aktivitesinin regülasyonu hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Bazı hücrelerde yapısal olarak aktif olan DUSP6 bazı hücrelerde çeşitli büyüme faktörleri tarafından indüklenmektedir. Sıçan PC12 feokromasitoma hücre serisinde DUSP6 ekspresyonu nöronal büyüme faktörü (NGF) tarafından artırılmaktadır (Camps ve ark., 1998b). Fare embriyosunun gelişmekte olan dokularında DUSP6 mRNA ekspresyonu tespit edilmiş ve *fibroblast growth faktor* (FGF) uyarısı ile indüklendiği gösterilmiştir (Dickinson ve ark., 2002; Kawakami ve ark., 2003). Bazı çalışmalar aktif ERK'in, DUSP6'nın ekspresyon düzeyini indükleyebildiğini göstermiştir (Groom ve ark., 1996; Muda ve ark., 1996). DUSP6 ekspresyonunun

inhibisyonu apoptoza yol açarken, aşırı ekspresyonu embriyonun gelişim anomalileri ile sonuçlanmaktadır. Bu bulgular DUSP6 proteinin, ERK1/2 ekspresyon seviyelerini düzenleyerek dokuların gelişiminde rol aldığını göstermektedir (Kawakami ve ark., 2003). Bu varsayımı doğrular nitelikte *zebrafish* embriyosu ile yapılan bir çalışmada, DUSP6 enzimin ERK1/2 aktivitesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Tsang ve ark., 2004).

Literatür bilgilerine dayanarak DUSP1 ve DUSP6'nın, kanser gelişiminde rol alan ERK1/2 yolağını etkilediği düşünülmektedir. Dolayısıyla birçok araştırmacı bu fosfatazların kansere yönelik ilaç hedefi olabileceği düşüncesindedir.

Protein serin/treonin fosfatazlar (PSPs) serin ve treonin aminoasidleri üzerinde defosforilasyon yapan proteinlerdir. PSP ailesi geniş bir aile olup en büyük altgrubu fosfoprotein fosfatazlardır (PPP). Bu grupta PP1, PP2A, PP3 (PP2B/ calcineurin), PP4, PP5, PP6 ve PP7 enzimleri yer almaktadır (Peti ve ark., 2013).

PP1 ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan bir serin/treonin fosfatazdır (Shi, 2009). Hücre proliferasyonu, apoptoz, metabolizma, protein sentezi, membran reseptör ve iyon kanalı regülasyonunda rol almaktadır (Ceulemans ve Bollen, 2004; Cohen, 2002). PP1 enzimi evrim boyunca iyi korunmuş ve bir katalitik altbirim ile bir regülatör altbirim kompleksinden oluşmaktadır (Hubbard ve Cohen, 1993). Katalitik altbirim birbirinden farklı birçok altbirim subunit ile eşleşebilmektedir. PP1 enzimin regülatör subuniti hücrenin belirli bir kompartmana geçişini, substratla etkileşmesini ve aktivitesini düzenlemektedir (Ceulemans ve ark., 2002; Cohen, 1997). Bazı regülatör altbirimler PP1 enzim aktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır: inhibitor-1 (I-1) (Nimmo ve Cohen, 1978), inhibitor-2 (I-2) (Foulkes ve Cohen, 1980), CPI-17 (Eto ve ark., 1997) ve DARPP-32 (Walaas ve Greengard, 1991). Bugün literatürde, PP1 enziminin mitoz ile ilişkisi bilinmektedir. Bu enzimin eksikliğinde mitoz gerçekleşmemekte ve hücre ölümü meydana gelmektedir (Axton ve ark., 1990). Mitoz siklusunda önemli role sahip olan Cdk1, PP1 tarafından defosforile olmaktadır (Lorca ve ark., 1992). Ayrıca PP1, mitoz olayında önemli bir kinaz olan Plk1 (polo-like kinase 1) ile etkileşip onun inhibisyonuna neden olmaktadır (Yamashiro ve ark., 2008). Bugün Plk1'in birçok tümör hücresinde aşırı eksprese

olduğu bilinmektedir (Strebhardt ve Ullrich, 2006), dolayısıyla PP1'in kanser ile ilişkisi olabileceği düşünülmektedir. PP1 enziminin ERK1/2 ile ilişkisini inceleyen araştırmacılar, çalışmalarında bu enzimin RAF-1 aktivasyonu için gerekli Ser259 fosforilasyonunu inhibe ederek RAF/MEK/ERK1/2 yolağının inhibisyonuna neden olduğunu göstermişler (Jaumot ve Hancock, 2001).

PP2A enzimi PPP'nin bir diğer üyesidir. Scaffold altbirim, katalitik altbirim ve enzimin aktivitesini düzenleyen regülatör altbirim içeren trimerik bir kompleksten oluşmaktadır (Janssens ve Goris, 2001). PP1 enziminden farklı olarak I-1 ve I-2 gibi inhibitör proteinlerden etkilenmemektedir (Ingebritsen ve Cohen, 1983). PP2A katalitik subunit C-terminal Tyr-307 aminoasidi tirozin kinaz p60, pS6, EGFR ve insülin reseptörü uyarısı ile fosforillendiğinde aktivitesi yaklaşık % 90 oranında inhibe olmaktadır (Chen ve ark., 1992). PP2A hücre proliferasyonu, yaşam siklusu, ölümü ve birçok sinyal yolağın düzenlenmesinde rol almaktadır (Janssens ve Goris, 2001). Tümörögenез ile ilişkili bazı genlerin ekspresyonu PP2A aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. Bazı çalışmalar PP2A enzimin hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ve dolayısıyla anti-tümöral etkisi olduğunu göstermiştir. Hücre stimülasyonu ile indüklenen FOS transkripsiyon faktörü, aktif PP2A enzimi tarafından inhibe edilmiştir (Zinck ve ark., 1993). SV40 small tumor antijen (small t) PP2A'yı inhibe ederek MEK/ERK1/2 aktivitesinin ve hücre proliferasyonun artmasına neden olmuştur (Sontag ve ark., 1993). PMC42 insan meme kanser hücre serisinde PP2A nükleer telomeraz aktivitesinin inhibisyonu gösterilmiştir (Li ve ark., 1997). Birçok çalışma PP2A aktivitesinin, MAPK'ların aktivite regülasyonundaki rolünü ortaya koymuştur. *In vitro* çalışmalar PP2A enzimin ERK1/2'in aktivitesini inhibe ettiğini bildirmiştir (Sontag ve ark., 1993; Ugi ve ark., 2002). PP1 ile benzer şekilde PP2A enzimi RAF-1 aktivasyonu için gerekli Ser259 fosforilasyonunu inhibe ederek RAF/MEK/ERK1/2 yolağını inhibe etmektedir (Jaumot ve Hancock, 2001).

Çalışmalarımızda MDA-MB231 kanser hücre serisi kullanıldı. Bu hücreler insan plevral infüzyon sıvısından elde edilmiş ve yüksek metastaz yeteneğine sahip hücrelerdir. MDA-MB231'ler üçlü negatif hücre grubunda yer aldığından (Cailleau ve ark., 1974) ER, PR ve HER2 reseptörlerini içermemekte fakat çok yoğun  $\beta_2$ -AR

içermektedirler (Vandewalle ve ark., 1990). Bu hücrelerde ERK1/2'nin bazal ekspresyonu ve intrinsik aktivitesi diğer hücrelere kıyasla fazladır, dolayısıyla ERK1/2'nin yüksek bazal aktivite sergilediği ve bu unsurların hücre proliferasyonunda rol oynadığı ileri sürülmektedir (Johnson, 1997). Birçok çalışma MDA-MB231 hücre serisinde büyüme faktörü reseptörlerini inhibe ederek bu hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmeyi hedeflemiş ve olası terapötik hedefleri tespit etmeye çalışmıştır. Fakat bu hücrelerin, büyüme faktörlerinin sinyal yolağını inhibe etmeye yönelik uygulamalara gösterdiği direnç, araştırmacıları başka hedeflerin arayışına yönlendirmiştir.

$\beta_2$ -AR, GPCR ailesinin üyesidir. Spesifik ligandın reseptöre bağlanmasıyla reseptörde konformasyonel değişiklik oluşur ve  $\beta_2$ -AR ile uyarıcı *guanine-nukleotide binding protein* ( $G_s$ ) arasında etkileşim meydana gelir.  $G_s$  proteini üç farklı altbirim oluşmaktadır ( $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ ). Reseptörle etkileşme sonucu olarak  $G_s$  proteinin  $\alpha$  subunitine bağlı olan GDP ayrılır ve yerine GTP bağlanır. Oluşan  $\alpha_s$ -GTP kompleksi, adenilil siklaz enzimini aktive eder ve ardından adenilil siklaz hızlı bir şekilde ATP'yi katalize ederek hücre içi cAMP düzeyinin artmasına neden olur (Lefkowitz ve ark., 1977; Levitzki, 1988). cAMP'nin iyi bilinen iki efektör proteini vardır, 1) cAMP ile aktive olan 'exchange' proteinler (Epac) ve cAMP-bağımlı protein kinase A (PKA). Artmış cAMP düzeyi PKA'yı aktive eder ve PKA-aracılı efektör proteinler fosforile olur. cAMP hücrede birçok olayda rol oynamaktadır ve hücrenin akıbetini etkilemektedir. cAMP'nin etkilerinin büyük kısmı PKA aktivasyonu aracılığıyla meydana gelmekle birlikte, bu yolak oldukça karmaşıktır. cAMP düzeyini belirleyen dokuz adet hücre zarına bağlı ve bir adet sitozolik adenilil siklaz ve cAMP'yi katalize eden sekiz tane fosfodiesteraz enzimi vardır. cAMP yolağının önemli bir efektörü olan PKA'nın yapısında 3 çeşit katalitik, 4 çeşit regülatör altbirim vardır. Ayrıca cAMP'nin hedefi olan 2 farklı Epac (Epac1, Epac2) olduğu bilinmektedir (Sunahara ve Taussig, 2002; Cho-Chung ve ark., 2002).

MAPK yolağının RTK'ların aktivasyonu ile yakın ilişkisinin yanısıra bu yolağın  $\beta_2$ -AR ile aktive edilebildiği bilinmektedir. Birçok çalışmada, cAMP'nin ERK1/2'nin aktivasyonuna olan etkileri ile ilgili sonuçlar bildirilmiştir. Kortikal nöronlarda ve

melanositlerde cAMP'nin RAS yolağını aktive ederek ERK1/2 aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Ambrosini ve ark., 2000; Busca ve ark., 2000). cAMP'nin RAS yolağını aktive eden mekanizmaları bugün hala tartışma konusudur. Bunun yanı sıra cAMP'nin ERK1/2 inhibisyonu yaptığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bazı araştırmacılar, cAMP'nin PKA aracılığıyla C-RAF'ın sekestrasyonuna yol açtığı ve RAS aktivasyonunu engellediğini dolayısıyla ERK1/2 aktivitesini inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir (Schmitt ve Stork., 2001; Schmitt ve Stork., 2002). Adiposit hücrelerinde cAMP'nin artışı ERK1/2 inaktivasyonuna neden olmuştur (Sevetson ve ark., 1993). Bazı meme kanser hücrelerinde  $\beta_2$ -AR uyarımı ERK1/2 aktivitesini inhibe etmiştir (Carie ve Sebt, 2007). Wu ve ark., (1993) çalışmalarında büyüme faktörü stimülasyonuna bağlı ERK1/2 aktivasyonunun cAMP tarafından inhibe olduğunu göstermiş ve bu yollar arasında bir etkileşimin olabileceğini vurgulamışlardır.  $\beta_2$ -AR uyarının hücre proliferasyonuna olan etkilerini gösteren birçok çalışma literatürde mevcuttur. Beta adrenerjik uyarı nöron, kalp, böbrek ve akciğer doku hücrelerinin büyümesinde, çoğalmasında ve diferansiyasyonunda rol oynamaktadır (Vernadakis ve ark., 1974; Slotkin ve ark., 1987). Madden ve ark. (2011)  $\beta_2$ -AR uyarının hücre proliferasyonunu etkilemediğini göstermiştir. Bazı araştırmacılar ise bu uyarının proliferasyon üzerinde pozitif etkisi olduğunu göstermiştir. Hemanjiom-kaynaklı endotel hücrelerinin proliferasyonu,  $\beta_2$ -AR/cAMP tarafından indüklenmiştir (Ji ve ark., 2013). Ayrıca  $\beta_2$ -AR uyarısı meme kanser hücrelerinin proliferasyonunda pozitif etki göstermiştir (Yang ve ark., 1980). Diğer yandan  $\beta_2$ -AR, cAMP aracılığı ile akciğer kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve meme kanser hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir (Ally ve ark., 1989; Slotkin ve ark., 2000; Carie ve Sebt, 2007). cAMP'nin antiproliferatif etkisinin, büyük ölçüde ERK1/2'yi inhibe etmesi ile bağlantılı olabileceği ileri sürülmektedir. Bazı çalışmalar hücre proliferasyonu için cAMP'den başka efektörlerin rolü olabileceğini ve bu etkinin sadece ERK1/2 inhibisyonu ile açıklanamayacağını savunmuştur (Dumaz ve ark., 2002; McKenzie ve Pouyssegur, 1996).

Literatür bilgileri  $\beta_2$ -AR uyarısı ile ERK1/2 arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir. Ayrıca ERK1/2 aktivitesi DUSP1/6 ve PP1, PP2A gibi çeşitli

fosfatazlarla düzenlenmektedir. Bu proteinler hücre içi sinyallere farklı noktalarda müdahale etmekte ve hücrenin akıbetini belirlemekte rol oynamaktadır. MDA-MB231 kanser hücresinde bahsi geçen enzimlerin aktivitesi, etkisi ve birbiriyle ilişkisi net değildir. Ayrıca bu hücrelerin mevcut tedavi protokollerine gösterdikleri direnci göz önünde bulundurduğumuzda yolak mekanizmalarını aydınlatma zorunluluğu doğmaktadır.

Bu tez çalışmasında  $\beta_2$ -AR uyarı ile meydana gelen proliferasyon inhibisyonunun ERK1/2 inhibisyonu ile paralellik gösterip göstermediği araştırılmıştır. Ayrıca  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 inhibisyon mekanizmasını aydınlatmaya yönelik DUSP1/6 ve PP1, PP2A fosfatazların rolü araştırılmıştır. Bu amaçla yönelik DUSP1/6 inhibitörü ve PP1, PP2A inhibitörleri ile söz konusu fosfatazların aktivitesi inhibe edilmiş, akabinde ERK1/2 fosforilasyonu saptanmıştır. Ayrıca  $\beta_2$ -AR uyarısı ile bu fosfatazların ifadenme düzeylerinin değişip değişmediği saptanmıştır. Bu araştırmadan elde edilen bulgularla, incelenen proteinler ve ilgili mekanizmaların tedaviye dirençli kanser hücreleri için olası terapötik hedefler olabileceği düşünülmüştür.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.3.1. Hücre kültürü**

Bu çalışmada MDA-MB-231 hücre serisi kullanılmıştır. Hücreler % 10 fetal siğir serumu (FSS), 100 U/ml Penisilin, 100 µg/ml Streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içinde, 37 °C sıcaklık ve % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda çoğaltılmıştır.

##### **3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler**

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitler, temin edildikleri firma adları ve katalog numaraları ile birlikte EK 1'de verilmiştir. Ligandların ve enzim inhibitörlerin derişimleri EC<sub>50</sub> ve IC<sub>50</sub> değerlerin 10 katı olacak şekilde belirlendi.

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. Proteinlerin ekspresyonunun değerlendirilmesi**

### 3.2.1.1. Konfluent hücrelerde yapılan deneyler

Yetmiş beş cm<sup>2</sup>'lik kültür ortamında büyütülen hücreler, deneyden 72 saat önce 6 kuyulu kültür plaklarına 10<sup>5</sup> olarak dağıtılmıştır. Kuyulara dağıtılan hücreler 48 saat boyunca 37 °C sıcaklık ve % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda bekletilmiştir. Bu süre içinde hücreler % 80- % 90 konfluense ulaşmış ardından serumsuz besiyeri ile yıkanmış ve gece boyunca serumsuz besiyeri içinde 37 °C sıcaklık ve % 5 CO<sub>2</sub>'li ortamda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler uygun  $\beta_2$ -AR ligandları ile, inhibitörlerin varlığında veya yokluğunda stimüle edilmiştir. Deneyde kullanılan  $\beta_2$ -AR ligandların final derişim değerleri şu şekildedir: terbutalin ve clenbuterol 1  $\mu$ M, izoproterenol ve epinefrin 10  $\mu$ M, formoterol 100 nM. İnhibitörlerin final derişim değerleri şu şekildedir: ICI118,551 100 nM, BCI 1-10  $\mu$ M, Calyculin A 10 nM ve H89 10  $\mu$ M. cAMP aktivatörü forskolin final derişim değeri 1  $\mu$ M'dır. Deneylerin uyarılma sürelerinin sonunda 6'lık plaklar buz üstüne alınmış ve besiyeri vakum aracılığı ile uzaklaştırılarak deney sonlandırılmıştır. Her kuyu 500  $\mu$ l *Phosphate buffer saline* (PBS) ile yıkadıktan sonra, 100  $\mu$ l lizis buffer (PBS içinde % 1 nonidet, 0.2 mM Na ortho-vanadat ve proteaz inhibitor karışımı) eklenmiştir. Hücreler kazıyıcı aracılığıyla kaldırıldıktan sonra tüplere aktarılmış ve 15 dakika buz üstünde bekletilmiştir. Tüplere aktarılan hücre lizatları 4°C ortam sıcaklığında, 5.000 x g'de 5 dakika santrifuj edilmiştir. Örnekler tüplere aktarılmış ve -80 °C'de bekletilmiştir.

### 3.2.1.2. Protein Elektroforezi ve İmmünoblot

Deneyde elde edilen hücre lizatları soğuk ortamda çözündürüldükten sonra % 10  $\beta$ -merkaptoetanol içeren *sample buffer* ile 3:1 oranında karıştırılmış ve 3 dakika süre ile 95 °C'de kaynatılmıştır. Örnekler % 8 poliakrilamid jelde elektroforez ile yürütülmüş ardından elektro-transfer yöntem ile *polyvinyliden difluoride* (PVDF)

membrana protein transferi sağlanmıştır. Membranlar % 5 yağsız süt tozu ve % 0.2 (v/v) tween-20 içeren *Tris-Buffered Saline* (TBS) içinde oda ısısında 1 saat bekletilmiş ardından uygun birincil antikor ile 16 saat +4 °C'de muamele edilmiştir. Membranlar ertesi gün HRP (*horse radish peroxidase*) ile konjuge edilmiş uygun ikincil antikor ile oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. İlgili protein bantları HRP substratı kullanılarak Biorad görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir ve bantların yoğunluğu İmagemax yazılım programı kullanılarak sayısal veri şeklinde elde edilmiştir. İlgili proteinin bant yoğunluğu *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH),  $\beta$  actin veya tERK bant yoğunluğu ile normalize edilerek analiz edilmiştir.

#### 3.2.1.3. Protein mRNA düzeyi

DUSP1 protein mRNA düzeyleri Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ile saptanmıştır. RNA ekstraksiyonu üreticinin önerdiği protokole göre (RNeasy, Qiagen, Hilden, Germany) elde edilmiştir. İzole RNA derişimi spektrofotometre ile 260 ile 280 nM dalga boyunda ölçülmüştür. cDNA sentezi için Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak ve bu kitin standart protokolü takip edilerek 1  $\mu$ g total RNA'dan cDNA sentez edilmiştir. cDNA 1:10 oranda dilüe edildikten sonra -20 °C'de bekletilmiştir. qRT-PCR ile olgun mRNA elde edilmiştir. qRT-PCR, Roche LightCycler 480 ile yapılmıştır. Deneyde kullanılan primerler (DUSP1, Forward primer: GCTCAGCCTTCCCCTGAGTA, Reverse primer: 'GATACGCACTGCCCAGGTACA). Amplifiye karışımları 1.0 1:10 dilüe cDNA, 5.0  $\mu$ l SYBR Green PCR Master Mix, 1.0  $\mu$ l miScript Universal Primer (reverse primer tüm miRNA için), 1.0  $\mu$ l miScript Primer Assay (primere spesifik mRNA) ve 2  $\mu$ l RNase-free su, total hacim 10  $\mu$ l. Siklusların düzenlenmesi: Başlangıç aktivasyonu için 15 dakika 95 °C, ardından amplifikasyon için 40 siklus 94 °C için 15 saniye, 55 °C için 30 saniye ve 70 °C için 30 saniye olarak ayarlanmıştır. Analiz için  $\Delta\Delta C_t$  yöntemi kullanılmıştır. Normalizasyon için  $\beta$  actin

kullanılmıştır (Forward primer: 'CCAACCGCGAGAAGATGACC' Reverse primer: 'GGAGTCCATC-ACGATGCCAG').

### **3.2.2. Hücre proliferasyonu deneyi**

#### **3.2.2.1. WST-1 proliferasyon deneyi**

Deneylerde yer alan canlı hücre proliferasyonunun belirlenmesinde spektrofotometrik yöntem olan WST-1 yöntemi kullanılmıştır. 96'lık kuyulara 5000 hücre ekilmiş, sonra her 24 saatte bir besiyeri değiştirilmiş ve uygun agonistle inkübe edilmiştir. Hücre proliferasyonları 24, 48 ve 72 saat sonra farklı zamanlarda saptanmıştır. WST-1 solüsyonu üretici firmanın protokolü doğrultusunda uygun miktarda her kuyuya eklenmiş ve 4 saat sonra (450 nm ve 600 nm) iki farklı dalga boyutunda spektrofotometre cihaz aracılı ölçüm yapılmıştır.

#### **3.2.2.2. iCelligence system proliferasyon deneyi**

Hücre proliferasyonunun devamlı olarak izlenebildiği iCelligence sistemi (ACEA Biosciences, Inc) kullanılarak hücre büyümesi izlenmiştir. Ayrıca bu yöntemle hücre sayısının ikiye katlanma zamanı (doubling time) tespit edilmiştir. Öncelikle 200 µl besiyeri 8 kuyulu elektronik microtiter flaska (E-plate) eklenmiş ve akabinde "background" ölçümü yapılmıştır. Final hacim 600 µl olacak şekilde her kuyuya 15.000 hücre ekilmiştir. E-plate 37°C, % 5 CO<sub>2</sub> inkübatör ortamında cihaza yerleştirilmiştir. Besiyeri ve ligandlar her 24 saatte bir yenilenmiştir. 96 saat boyunca 1-15 dakika aralıklar ile Hücre proliferasyonu ölçümüştür. Elde edilen veriler iCelligence system programı ile sayısal verilere dönüştürülmüş ve analiz edilmiştir.

### 3.2.3. İstatistiksel değerlendirme

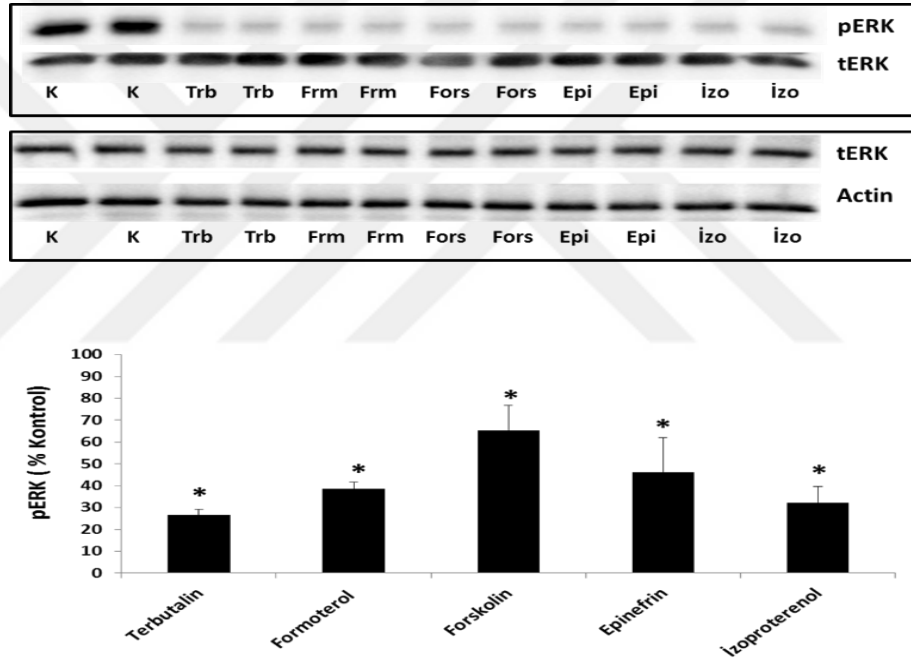
Ortalamalar arası istatistiksel fark “*Student’s t-test*” kullanılarak değerlendirilmiştir.  $p<0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Analizler SPSS 17.0 Windows software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ile yapılmıştır.



## 4.BULGULAR

### 4.1. Adrenerjik Reseptör Agonistleri Aracılı pERK1/2 Defosforilasyonu

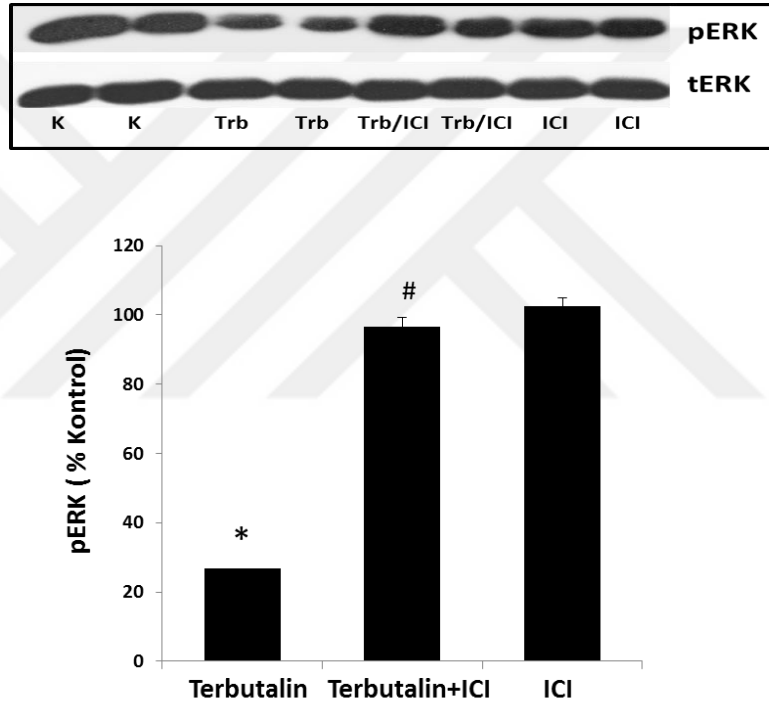
$\beta_2$ -AR ile etkileşen ligandların etkileri şekil 4.1’de gösterilmektedir. Spesifik  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ve formoterol,  $\alpha$ -AR ve  $\beta$ -AR agonisti epinefrin, non spesifik  $\beta$ -AR agonisti izoproterenol ve cAMP aktivatörü forskolin, ERK1/2 fosforilasyonunu inhibe etmektedir (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** MDA-MB231 kanser hücrelerinde,  $\beta_2$ -AR ligandları ve cAMP aktivatörü forskolin ile uyarıldıktan sonra fosforile ERK1/2 düzeyi. MDA-MB231 hücreleri 10 dk süre ile  $\beta_2$ -AR agonistler: terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M), formoterol (Frm, 100 nM), izoproterenol (İzo, 10  $\mu$ M), epinefrin (Epi, 10  $\mu$ M) veya cAMP aktivatörü forskolin (Fors, 1  $\mu$ M) ile uyarılmıştır. Fosforillenmiş ERK1/2 bantlarının yoğunluğu total ERK bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmıştır ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark ( $P<0.05$ ), (n=7).

#### 4.2 $\beta_2$ -AR Aracılı pERK1/2 Defosforilasyonu

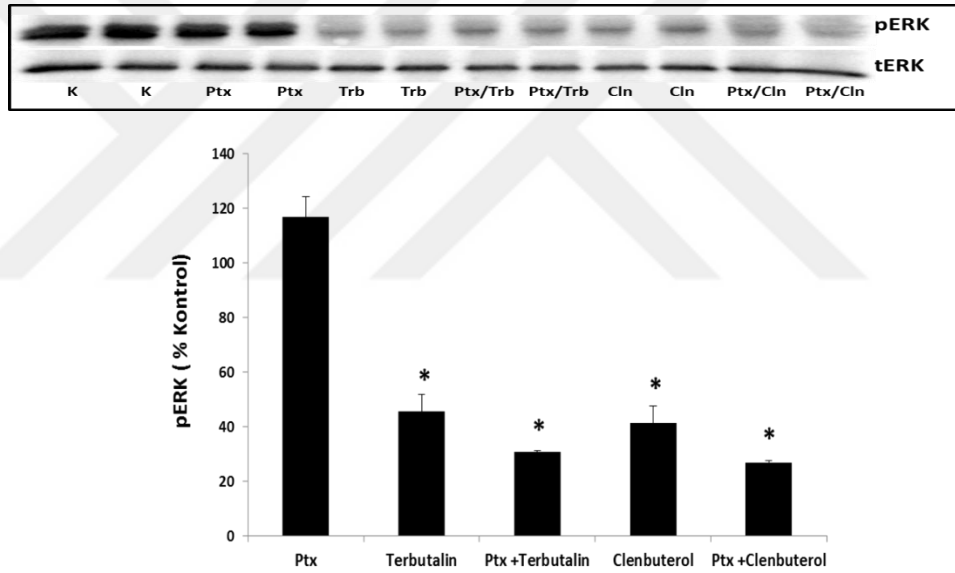
ERK1/2 defosforilasyonu hangi reseptör üzerinde olduğunu görmek için MDA-MB231 hücreleri spesifik  $\beta_2$ -AR antagonisti ICI118,551 (100 nM) ile 20 dakika muamele edildikten sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile uyarıldı. Antagonist varlığında terbutalin pERK1/2'i defosforile edemedi. Bu bulgular ERK1/2 defosforilasyonunun  $\beta_2$ -AR aracılığı ile olduğunu göstermektedir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.**  $\beta_2$ -AR antagonisti ICI118,551 ile inkübasyondan sonra terbutalin ile uyarılmış MDA-MB231 kanser hücrelerinde fosforile ERK1/2 düzeyi. MDA-MB 231 hücreleri  $\beta_2$ -AR antagonisti ICI118,551 (100 nM) ile 20 dk inkübe edildikten sonra terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarılmıştır. Fosforillenmiş ERK1/2 bantlarının yoğunluğu total ERK bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmıştır ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı, (#) terbutaline göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P<0.05$ ), (n=3).

#### 4.3. $\beta_2$ -AR Aracılı pERK1/2 Defosforilasyonu ve $G_{i/o}$ .

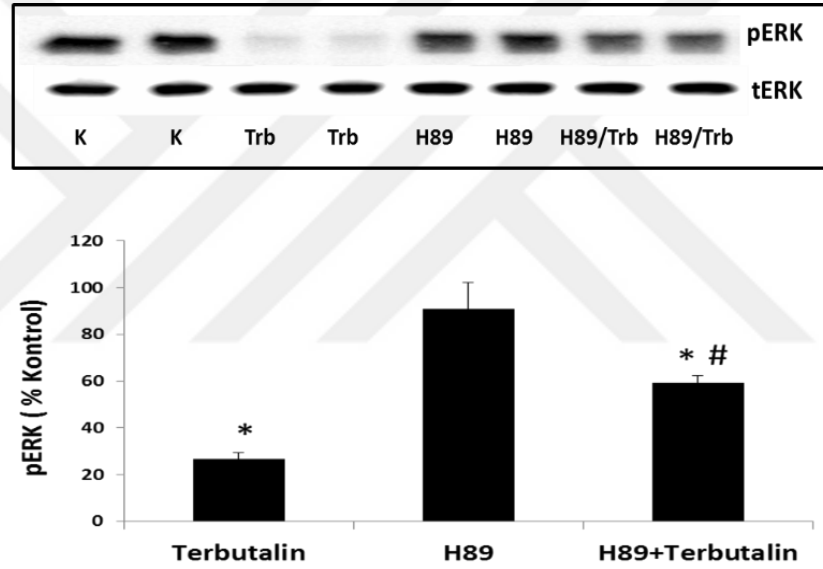
$\beta_2$ -AR'ler hem  $G_{s\alpha}$  ( $G_\alpha$  stimulatory) hem  $G_{i\alpha}$  ( $G_\alpha$  inhibitory) protein ile kenetlenebilir ve farklı sinyal yollarının aktive olmasına neden olabilirler. ERK1/2 defosforilasyonunda hangi  $G_\alpha$  proteinin rol aldığını görmek için MDA-MB231 hücreleri *pertusis toxin* (PTX) ile 18 saat inkübasyondan sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ve clenbuterol ile stimüle edildi.  $G_{i\alpha}$  inhibitörü pertusis toksini terbutalin ve clenbuterol ile meydana gelen ERK1/2 defosforilasyonunu inhibe edemedi. Bu bulgular  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 defosforilasyonunda  $G_i$  proteinin rolünün olmadığını düşündürmektedir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.**  $G_{i\alpha}$  inhibitörü *pertusis toxin*i (PTX) ile inkübe edildikten sonra  $\beta_2$ -AR ligandları terbutalin ve clenbuterol ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi. MDA-MB 231 hücreleri  $G_{i/o\alpha}$  inhibitörü *pertusis toxin*i (PTX, 150 ng/ml) ile 18 saat inkübasyondan sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ve clenbuterol (Cln, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarılmıştır. Fosforillenmiş ERK1/2 bantlarının yoğunluğu total ERK bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmıştır ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrolle göre istatistiksel farkı göstermektedir ( $P < 0.05$ ), (n=3).

#### 4.4. $\beta_2$ -AR Aracılı pERK1/2 Defosforilasyonu ve Protein Kinaz A ile İlişkisi

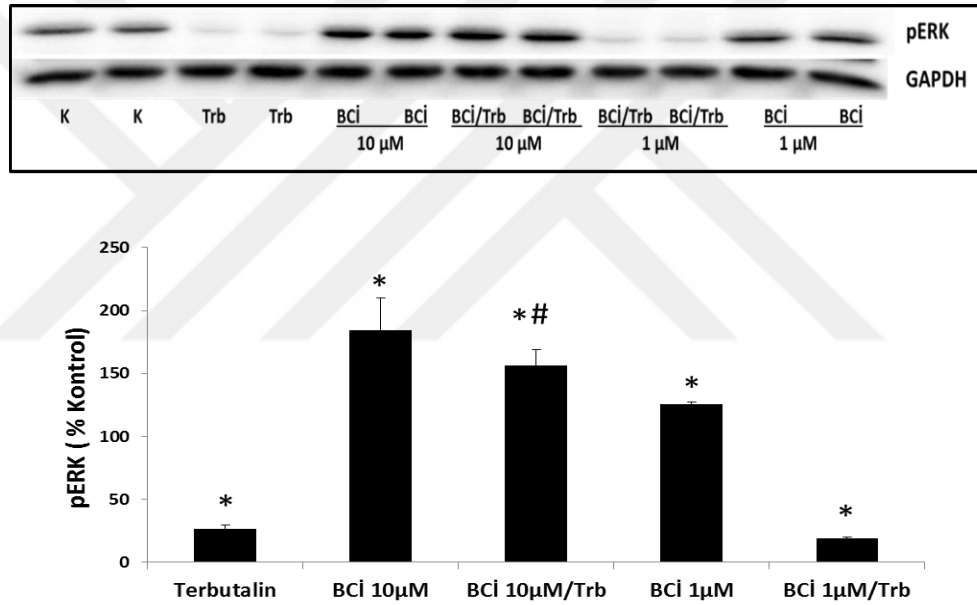
PKA,  $\beta_2$ -AR sinyal yolağında aktive olan önemli bir protein kinazdır. ERK1/2 defosforilasyonunda PKA'nın rolünü anlamak amacı ile MDA-MB231 hücreleri PKA inhibitörü (H89, 10  $\mu$ M) varlığında terbutalin ile 10 dakika uyarıldı. Deney sonuçları fosforillenmiş ERK1/2 inhibisyonunun kısmen ortadan kalktığını göstermektedir. Bu sonuca göre  $\beta_2$ -AR aracılı pERK1/2 defosforilasyonunda cAMP-PKA yolağının rol oynadığı görülmektedir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** PKA inhibitörü H89 ile inkübe edildikten sonra  $\beta_2$ -AR ligandı terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi. MDA-MB 231 hücreleri PKA inhibitörü (H89, 10  $\mu$ M) ile 30 dk inkübe edildikten sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarılmıştır. Fosforillenmiş ERK1/2 bantlarının yoğunluğu tERK bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmış ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı, (#) terbutaline göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P<0.05$ ) (n=3).

#### 4.5. $\beta_2$ -AR Aracılı pERK1/2 Defosforilasyonunda DUSP1 ve DUSP6 Enzimlerinin Rolü

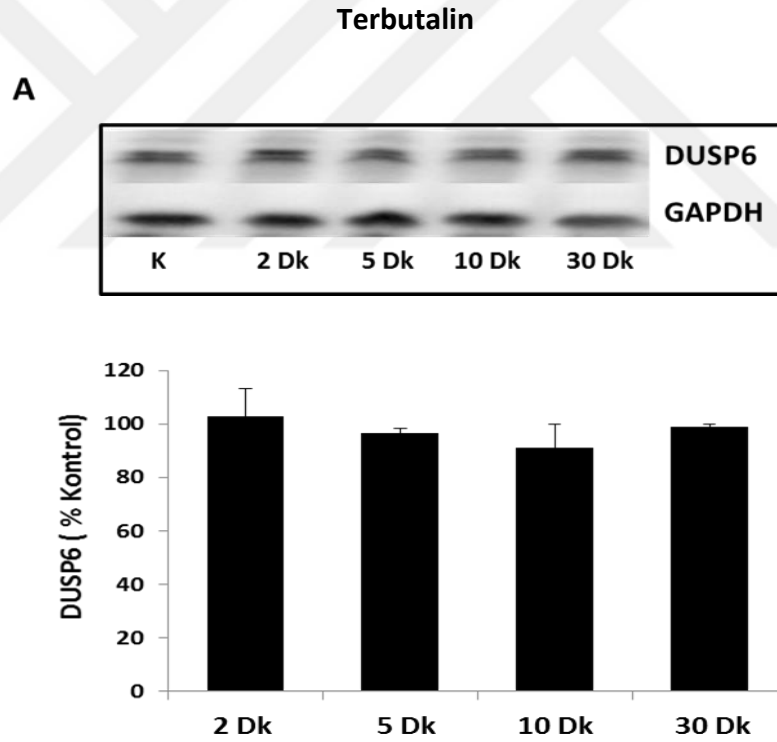
DUSP1 ve DUSP6 enzimlerinin  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 defosforilasyonunda oynadığı rolü saptamak için MDA-MB231 hücreleri DUSP1/6 inhibitörü olan BCI (1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M) ile 30 dk inkübe edildikten sonra terbutalin ile uyarıldı. BCI 1  $\mu$ M derişimde bir etki göstermezken, 10  $\mu$ M derişimde  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 defosforilasyonunu inhibe etti (Şekil 4.5).



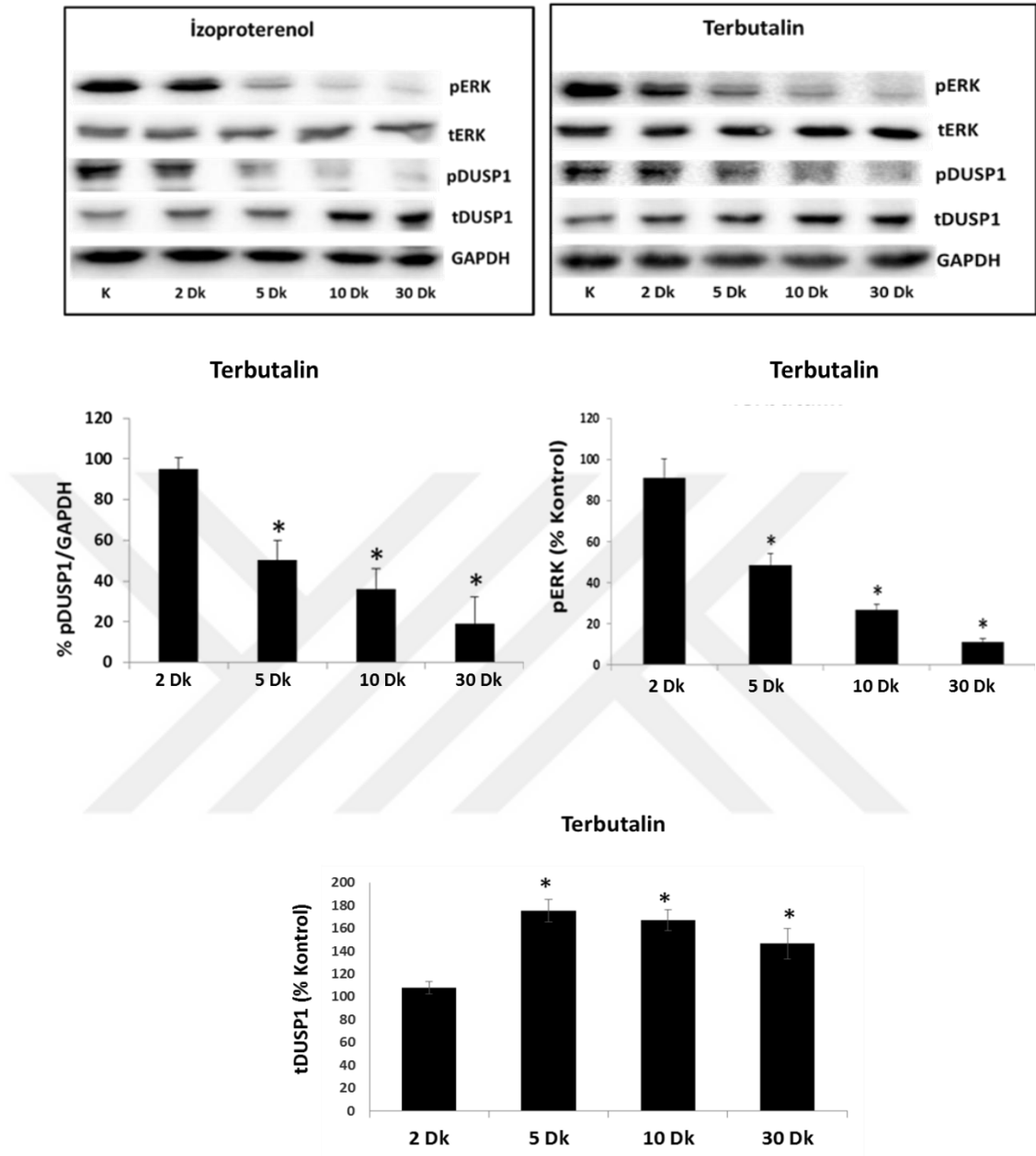
**Şekil 4.5.** DUSP1/6 inhibitörü BCI ile inkübasyon sonrası  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi. MDA-MB231 hücreleri DUSP1/6 inhibitörü BCI (1  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M) ile 30 dk inkübasyondan sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarılmıştır. Fosforillenmiş ERK1/2 bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmış ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı, (#) terbutaline göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P < 0.05$ ) (n=4).

#### 4.6. $\beta_2$ -AR Uyarısı ile DUSP1/ DUSP6 Protein Seviyeleri

Literatürde ERK1/2 aktivitesinin düzenlenmesinde DUSP'ların rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle bu fosfatazlar aktive olduklarında pERK1/2'i defosforile etmektedirler. Terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 hücrelerde DUSP6 protein seviyesinde 2, 5, 10 ve 30 dakikalık uyarıdan sonra herhangi bir değişiklik gözlemlenmemektedir (Şekil 4.6A). Terbutalin ve izoproterenol ile uyarılan MDA-MB231 hücrelerde DUSP1 fosforilasyonu 5. dakika'dan itibaren inhibe olmaktadır ve total DUSP1 seviyesinde artış saptanmaktadır (Şekil 4.6B).



Dipnot: Bu şeklin açıklaması bir sonraki sayfada yapılmaktadır.

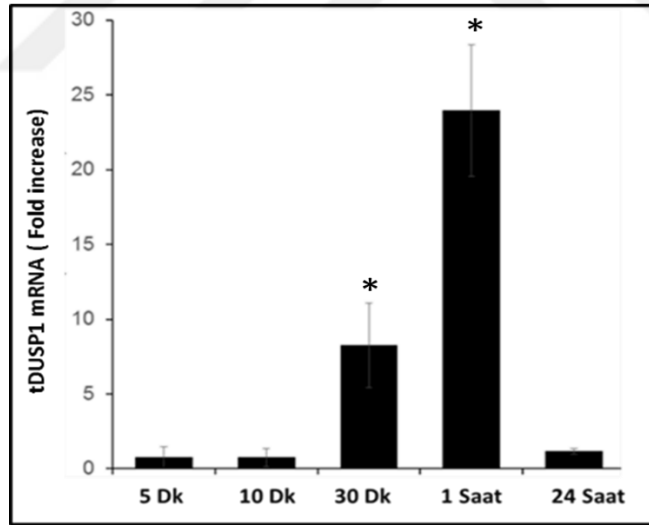
**B**

**Şekil 4.6.**  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücrelerinde fosforillenmiş DUSP1, total DUSP1 ve total DUSP6 düzeyleri. A) MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile farklı sürelerde 2 dk, 5 dk, 10 dk ve 30 dk uyarıldı ve total DUSP6 (DUSP6) saptandı. B) MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ve izoproterenol (İzo 10  $\mu$ M) ile farklı sürelerde 2 dk, 5 dk, 10 dk ve 30 dk uyarıldı ve fosforillenmiş DUSP1 (pDUSP1) ile total DUSP1

(tDUSP1) saptandı. Terbutalin ile uyarılan hücrelerde fosforillenmiş DUSP1, total DUSP1 ve total DUSP6 bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmıştır ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P<0.05$ ), (n=5).

#### 4.7. $\beta_2$ -AR Uyarısı ile Total DUSP1 mRNA Seviyeleri

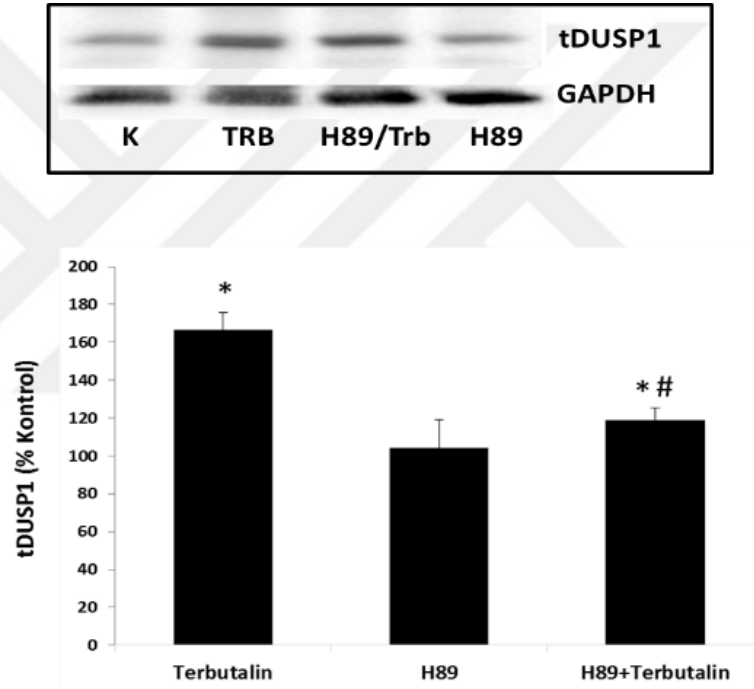
Deneylerimizde gözlemlediğimiz tDUSP1 proteinlerin seviyesindeki artışın nedeninin transkripsiyon düzeyinde olup olmadığını saptamak için terbutalin uyarısından sonra, farklı sürelerde mRNA düzeyleri saptandı. Terbutalin ile MDA-MB231 hücrelerinin 30 dakika ve 1 saat süre ile uyarılmasından sonra mRNA seviyelerinde artış saptandı (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.**  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde total DUSP1 mRNA düzeyleri. MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile farklı sürelerde 5 dk, 10 dk, 30 dk, 1 saat ve 24 saat uyarıldı, ardından total DUSP1 (tDUSP1) mRNA düzeyleri saptandı. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P<0.05$ ), (n=5).

#### 4.8. $\beta_2$ -AR Uyarısı ile Total DUSP1 ve PKA İlişkisi

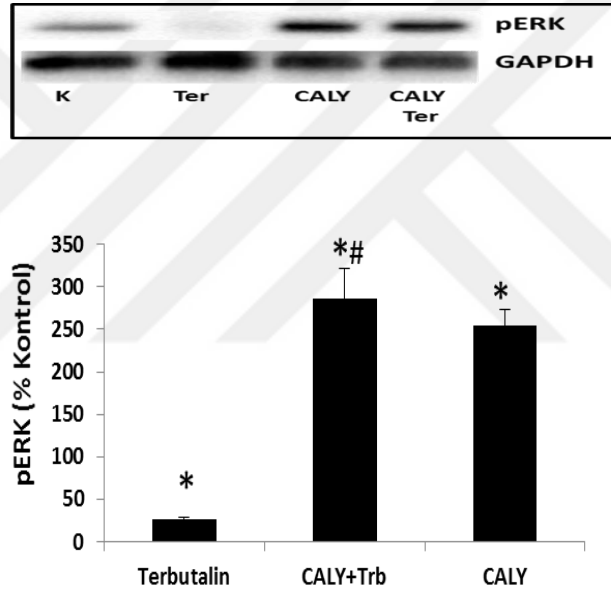
Deneylerimizde  $\beta_2$ -AR uyarı ile gözlemlediğimiz tDUSP1 artışının PKA ile ilişkili olup olmadığını anlamak için MDA-MB231 hücreleri PKA inhibitörü H89 (10  $\mu$ M) ile 30 dakika inkübe edildikten sonra 10 dakika terbutalin (1  $\mu$ M) ile uyardık. Deneylerimizin sonucuna göre PKA inhibitörü H89, terbutalin ile artan tDUSP1 seviyesini kısmen inhibe etmiştir (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** PKA inhibitörü H89 ile inkübe edildikten sonra  $\beta_2$ -AR ligandı terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücrelerinde total DUSP1 düzeyi. MDA-MB 231 hücreleri PKA inhibitörü (H89, 10  $\mu$ M) ile 30 dk inkübasyondan sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarılmıştır. Total DUSP1 bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmış ve grafikte kontrol yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı, (#) terbutaline göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P<0.05$ ), (n=3).

#### 4.9. $\beta_2$ -AR Aracılı pERK1/2 Defosforilasyonunda PP1 ve PP2A'nin Rolü

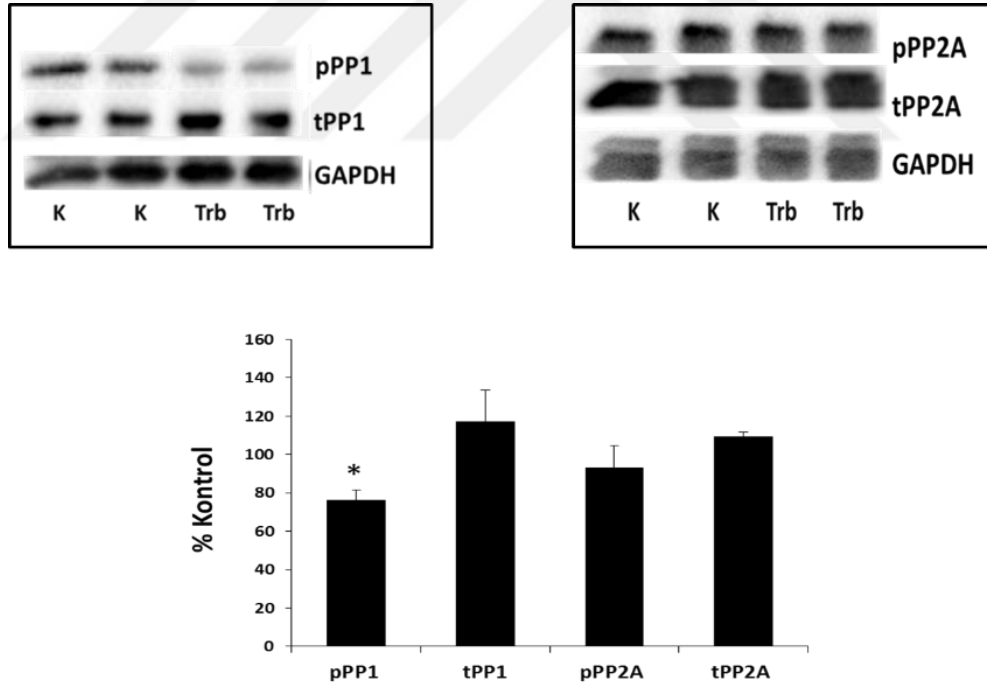
$\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 defosforilasyonunda PP1 ve PP2A'nın rolünü anlamak için MDA-MB231 hücreler PP1/PP2A inhibitörü Calyculin A (10 nM) ile 30 dk inkübe edildikten sonra pERK1/2 düzeyleri saptandı. Calyculin A ile inkübe edilen hücrelerde  $\beta_2$ -AR uyarısı ile gözlemlenen ERK1/2 defosforilasyonu tamamen ortadan kalktı. Bu bulgu  $\beta_2$ -AR uyarı ile oluşan ERK1/2 defosforilasyonunda PP1 ve PP2A enziminin rolünün önemli olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** MDA-MB231 hücreleri PP1/PP2A inhibitörü Calyculin A ile inkübe edildikten sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin uyarısından sonra fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi. MDA-MB231 hücrelerinin PP1/PP2A inhibitörü Calyculin A (Caly, 10 nM) ile 30 dk inkübasyondan sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarıldı. Fosforillenmiş ERK1/2 bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmış ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı, (#) terbutaline göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P < 0.05$ ), (n=3).

#### 4.10. $\beta_2$ -AR Uyarısı ve PP1/ PP2A Aktivitesi

$\beta_2$ -AR uyarısının PP1 ve PP2A enzimlerinin ekspresyonuna olan etkisini görmek için MDA-MB231 hücreleri terbutalin ile 10 dk uyarıldı. Deney sonucuna göre total PP1 (tPP1), total PP2A (tPP2A) ve PP2A'nın (tirozin 307) fosforile olmuş formunun (pPP2A) düzeylerinin terbutalin uyarısı ile değişmediği, fakat PP1'in (treonin 320) fosforile formunun (pPP1) terbutalin uyarısı ile azaldığı gözlemlendi. PP1 ve PP2A enzimlerinin söz konusu olan bu fosforilasyonları onların inaktif formlarının bir göstergesidir. Bu fosforile formların artışı inaktif PP1 ve PP2A'nın artışını göstermektedir. Sonuç olarak  $\beta_2$ -AR uyarısı ile pPP1 (treonin 320) azalmakta, dolayısı ile bu enzimin aktif formu artmaktadır (Şekil 4.10).



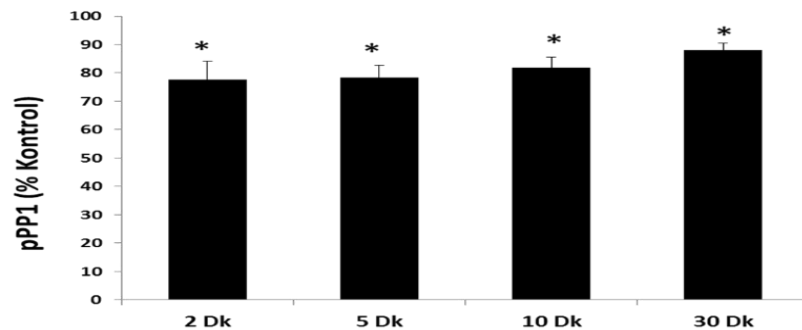
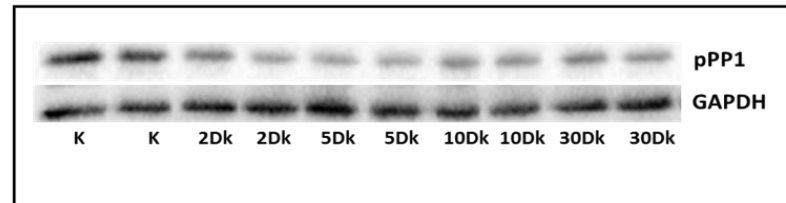
**Şekil 4.10.** MDA-MB231 kanser hücresinde,  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin uyarısı ile fosforillenmiş PP1, total PP1, fosforillenmiş PP2A, total PP2A düzeyleri. MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarıldıktan sonra

fosforillenmiş PP1 (pPP1) ile total PP1 (tPP1) görüntüsü. MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarıldıktan sonra fosforillenmiş PP2A (pPP2A) ile total PP2A (tPP2A) görüntüsü. Fosforillenmiş PP1, total PP1, fosforillenmiş PP2A ve total PP2A bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmış ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P<0.05$ ), (n=3).

#### 4.11. Farklı Sürelerde $\beta_2$ -AR Uyarısı ile PP1 ve PP2A Protein Seviyeleri

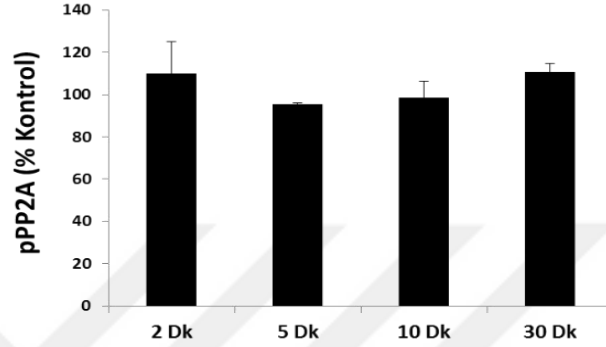
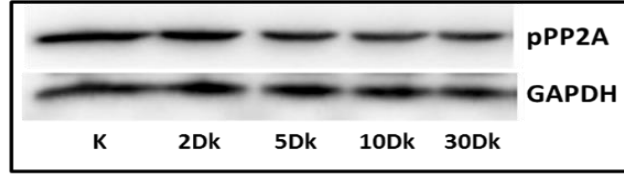
PP1 ve PP2A fosfatazlar aktive olduklarında pERK1/2'i defosforile etmektedirler. Terbutalin ile 2, 5, 10 ve 30 dakika uyarılan MDA-MB231 hücrelerinde 2. dakikadan itibaren pPP1 (treonin 320) fosforilasyonu inhibe olmuş, pPP2A ( tirozin 307) seviyesinde ise değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.11).

A



Dipnot: Bu şeklin açıklaması bir sonraki sayfada yapılmaktadır.

**B**

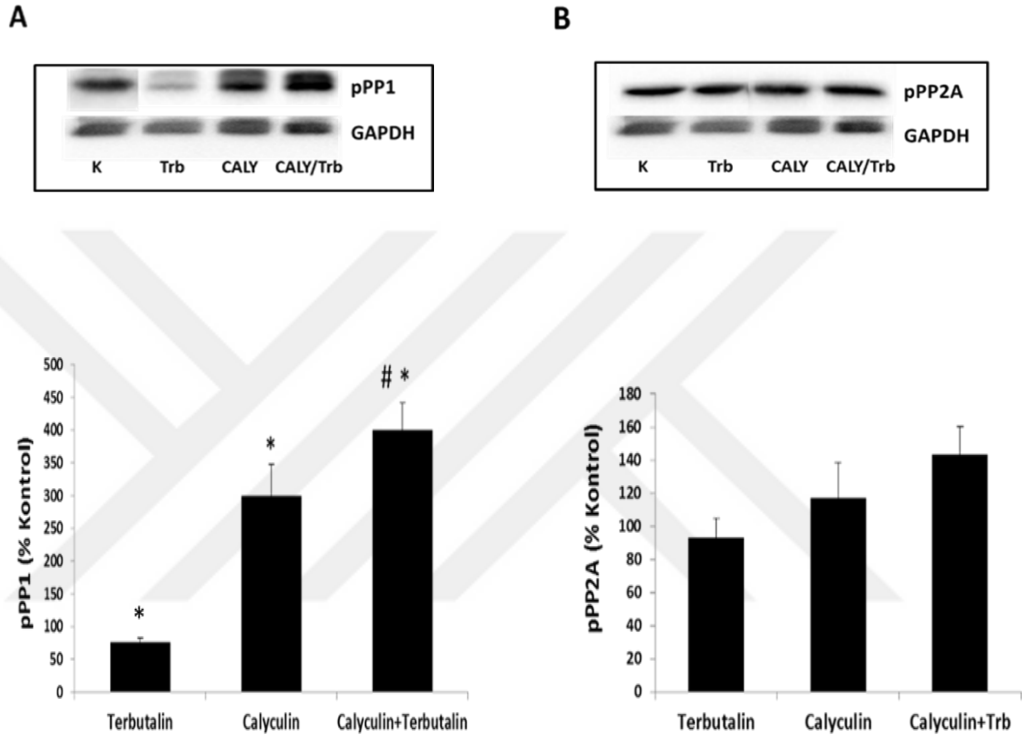


**Şekil 4.11.**  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücrelerinde fosforillenmiş PP1 ve fosforillenmiş PP2A düzeyleri. A) MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile farklı sürelerde (2 dk, 5 dk, 10 dk ve 30 dk) uyarıldı ve fosforillenmiş PP1 (pPP1) saptandı. B) MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile farklı sürelerde (2 dk, 5 dk, 10 dk ve 30 dk) uyarıldı ve fosforillenmiş PP2A (pPP2A) saptandı. Fosforillenmiş PP1 (pPP1) ve fosforillenmiş PP2A (pPP2A) bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmıştır ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P<0.05$ ), (n=3).

#### **4.12. PP1 ve PP2A İnhibitörlerinin Varlığında $\beta_2$ -AR Uyarısı ile pPP1 ve pPP2A Protein Seviyeleri**

PP1 ve PP2A enzim inhibitörü Calyculin A ile inkübe edilen MDA-MB231 hücrelerde pPP1 ve pPP2A enzimlerinin seviyelerini saptamak için öncelikle hücreler Calyculin

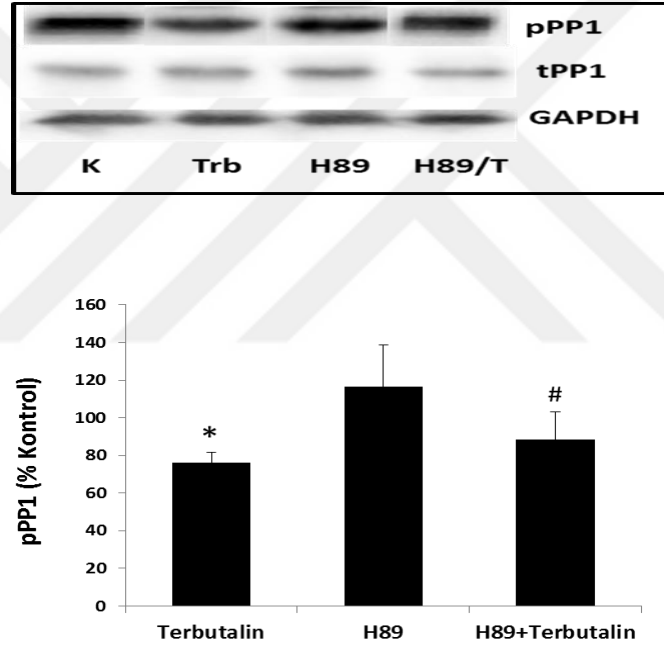
A (10 nM) ile 30 dakika inkübe edildi. Ardından hücreler 1  $\mu$ M terbutalin ile 10 dakika uyarıldı. Calyculin A tek başına ve terbutalin ile birlikte inaktif form olan pPP1 (treonin 320) enzim seviyesini artırmadı dolayısı ile PP1 enzimin aktivitesi inhibe olmadı. Fosforillenmiş PP2A enziminin seviyesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmedi (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** PP1/PP2A inhibitörü Calyculin A ile inkübasyon sonrası  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş PP1 ve fosforillenmiş PP2A protein seviyeleri. MDA-MB231 hücreleri PP1/PP2A inhibitörü Calyculin A (Caly, 10 nM) ile 30 dk inkübasyondan sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarılmıştır. (A) Fosforillenmiş PP1 ve (B) fosforillenmiş PP2A bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmış ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı, (#) terbutaline göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P<0.05$ ), (n=3).

#### 4.13. $\beta_2$ -AR Uyarısı ile pPP1 Enzim seviyesinde PKA'nın Rolü

Terbutalin uyarısı ile gözlemlenen pPP1 (treonin 320) düzeyindeki azalma ile PKA arasında bağlantı olup olmadığını anlamak için MDA-MB231 hücreleri PKA inhibitörü (H89) (10  $\mu$ M) ile 30 dakika inkübe edildikten sonra terbutalin (1  $\mu$ M) ile 10 dakika uyarıldı, ardından total PP1 ile fosforile PP1 (treonin 320) protein seviyeleri saptandı. İnaktif form olan pPP1 (treonin 320)'nin terbutalin aracılı inhibisyonu PKA inhibitörü tarafından ortadan kaldırıldı. Dolayısı ile PKA aktivitesi, PP1 enzim aktivitesini artırmaktadır (Şekil 4.13).

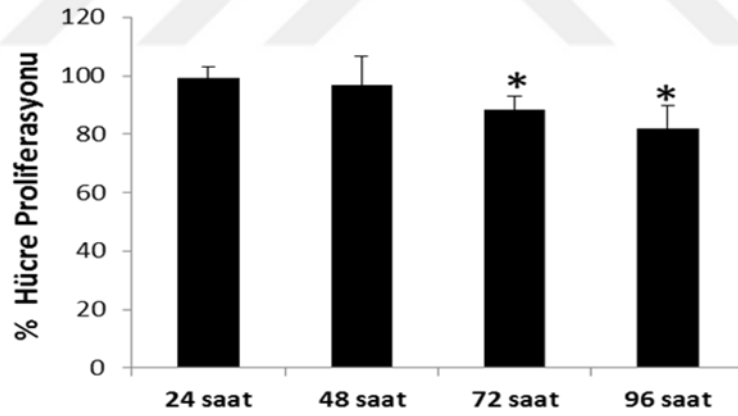


**Şekil 4.13.** PKA inhibitörü (H89) ile inkübe edildikten sonra  $\beta_2$ -AR ligandı terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş PP1 düzeyi. MDA-MB 231 hücreleri PKA inhibitörü (H89, 10  $\mu$ M) ile 30 dk inkübasyondan sonra  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 10 dk uyarılmıştır. Fosforillenmiş PP1 bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak saptanmış ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrolle göre istatistiksel olarak anlamlı farkı, (#) terbutaline göre istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir ( $P<0.05$ ), ( $n=4$ ).

#### 4.14. $\beta_2$ -AR Uyarı ve Hücre Proliferasyonu

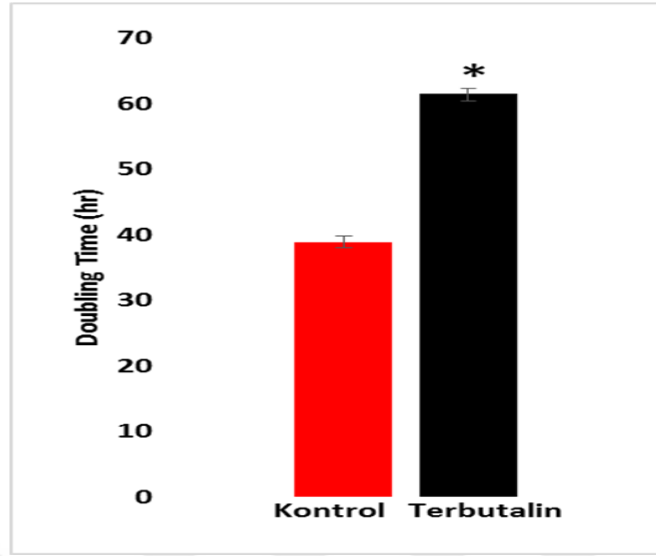
$\beta_2$  adrenerjik uyarının hücre proliferasyonuna olan etkisi WST-1 ve ACEA iCellegince sistemi ölçüldü. Aynı zamanda hücre çoğalmasının anlık izlenmesini sağlayan iCellegence cihazı ile hücre çoğalma hızı (doubling time) saptandı. Hücreleri ektikten 24 saat sonra terbutalin 1  $\mu$ M, besiyerine eklendi. Hücrelerin bulunduğu besiyeri ve terbutalin her 24 saatte bir yenilendi. Hücre proliferasyonları terbutalin ile 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 96 saat'lik inkübasyonlardan sonra değerlendirildi. Elde ettiğimiz verilere göre  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile 72 ve 96 saatlik uyarıdan sonra MDA-MB231 hücrelerinde anlamlı inhibisyon gözlemlendi (Şekil 4.14A) ve hücrelerin ikiye katlanma süresi (doubling time) uzadı (Şekil 4.14B).

**A**



Dipnot: Bu şeklin açıklaması bir sonraki sayfada yapılmaktadır.

**B**

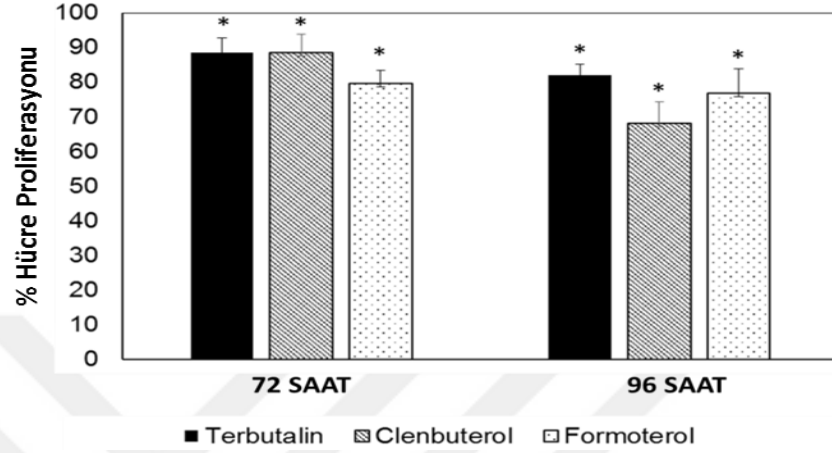


**Şekil 4.14.**  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücrelerinde WST-1 yöntemi ve iCelligence sistemi ile saptanan hücre proliferasyonu ve hücre çoğalma hızı. A) MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile farklı sürelerde (24 saat, 48 saat, 72 saat ve 96 saat) uyarıldı. B) iCelligence sistemi ile hücrelerin çoğalma hızı (doubling time). Proliferasyon ve “doubling time” verileri grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ( $P<0.05$ ), ( $n=4$ ).

#### 4.15. Farklı Agonistlerle $\beta_2$ -AR Uyarısı ve MDA-MB231 Hücre Proliferasyonu

Çeşitli  $\beta_2$ -AR liganların MDA-MB231 hücre serisinde proliferasyona etkilerini saptamak amacı ile hücreleri ektikten 24 saat sonra terbutalin 1  $\mu$ M, clenbuterol 1  $\mu$ M ve formoterol 100 nM besiyerine eklendi. Hücre besiyeri ve ligandlar her 24 saatte bir yenilendi. Hücre proliferasyonları 72 saat ve 96 saat’lik inkübasyonlardan sonra değerlendirildi. Elde ettiğimiz verilere göre  $\beta_2$ -AR agonistlerle 72 ve 96 saatlik

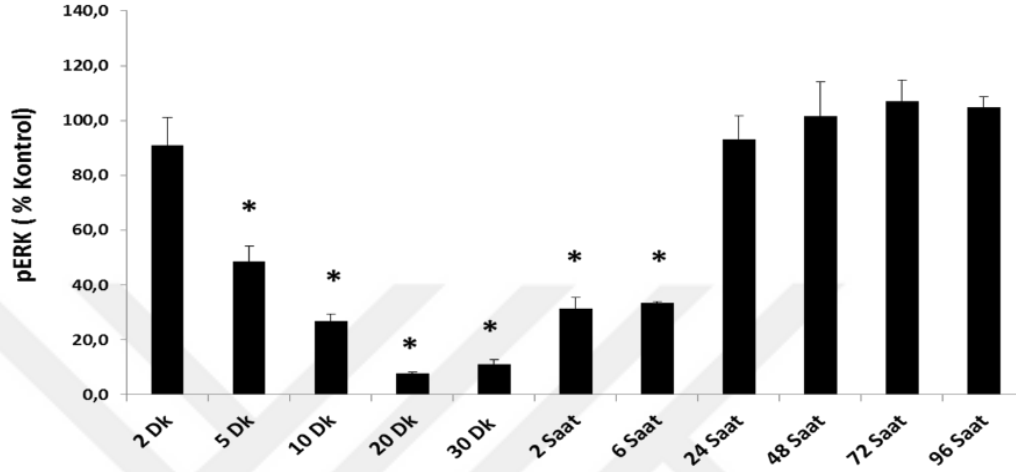
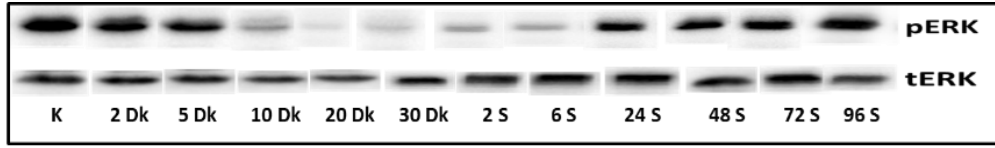
uyarıdan sonra MDA-MB231 hücrelerinde anlamlı proliferasyon inhibisyonu meydana gelmektedir (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.**  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin, formoterol ve clenbuterol ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücrelerinde WST-1 yöntemi ile saptanan proliferasyon düzeyleri. MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M), formoterol (Frm, 100 nM) ve clenbuterol (Cln, 1  $\mu$ M) ile farklı sürelerde (72 saat ve 96 saat) uyarıldı. Proliferasyon verileri grafikte kontrol yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir (P<0.05), (n=7).

#### 4.16. $\beta_2$ -AR Agonistler Aracılı pERK1/2 Defosforilasyonun Süresi

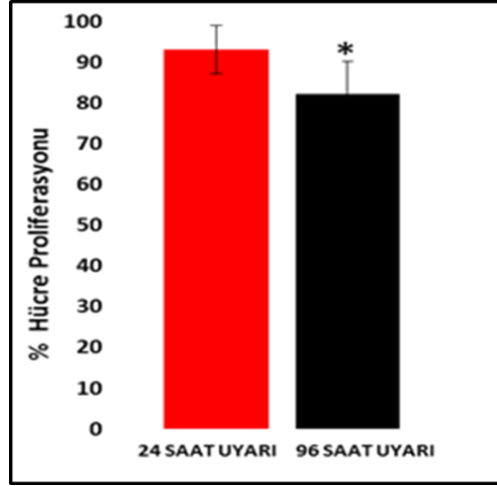
Uzun süreli  $\beta_2$  adrenerjik uyarının, fosforillenmiş ERK1/2 inhibisyonunu nasıl değiştirdiğini görmek amacı ile MDA-MB231 hücreleri 24, 48, 72 ve 96 saat terbutalin ile uyarıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar fosforillenmiş ERK1/2 inhibisyonunun terbutalin uyarısından sonra 24. saatte ortadan kalktığını göstermektedir (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.**  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile farklı sürelerde uyarılan MDA-MB231 kanser hücresinde fosforillenmiş ERK1/2 düzeyi. MDA-MB 231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile farklı sürelerde uyarıldı (2 dk, 5 dk, 10 dk, 20 dk, 30 dk, 2 S, 6 S, 24 S, 48 S, 72 S, 96 S). Fosforillenmiş ERK1/2 bantlarının yoğunluğu total ERK ile oranlanarak saptanmıştır ve grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ( $P<0.05$ ), (n=4).

#### 4.17. Hücre Proliferasyonu ve $\beta_2$ -AR Uyarısının Sürekliliği

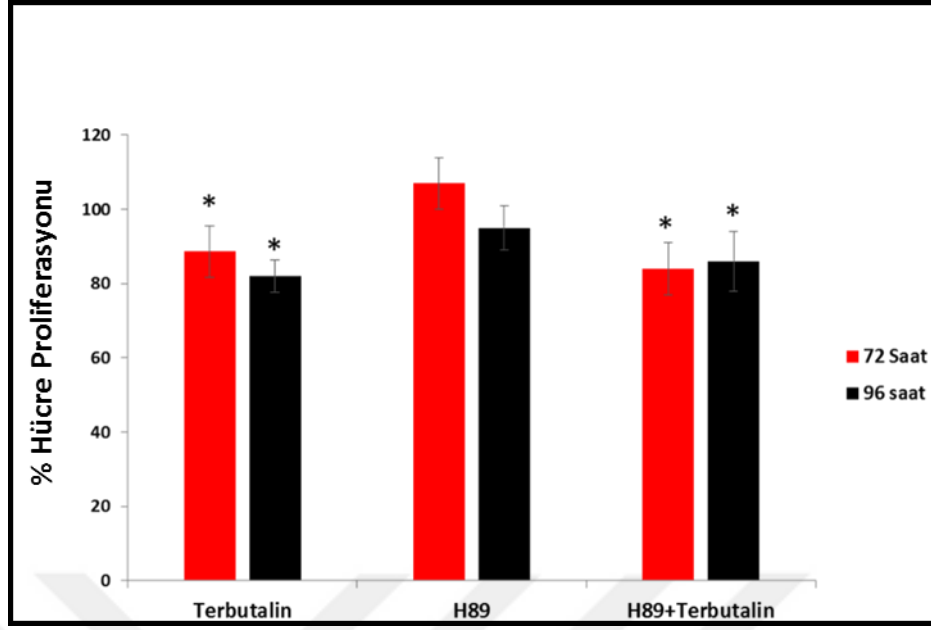
Daha önceki çalışmalarda MDA-MB231 hücrelerinin  $\beta_2$ -AR agonistleri ile uzun süreli uyarılması sonucu desensitizasyon geliştiği ve hücre zarında  $\beta_2$ -AR sayısının azaldığı bildirilmiştir (Slotkin ve ark., 2000). Bizim çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında  $\beta_2$ -AR agonistler aracılı gözlemlenen pERK1/2 defosforilasyonunun 24. saatte ortadan kalktığını göstermiştir. Bu sonuç literatür bilgisi ile uyumlu olarak uzun süreli  $\beta_2$ -AR uyarısı ile gözlemlenen ERK1/2 inhibisyon yanıtına desensitizasyon geliştiğini göstermektedir.  $\beta_2$ -AR uyarının ERK üzerindeki etkisi 24. saatte ortadan kalkmasına rağmen, anti proliferatif etki 72. ve 96. saatlerde görülmektedir. Bu bulgular doğrultusunda  $\beta_2$ -AR aracılı antiproliferatif etkinin gözlemlenebilmesi için 24 saatlik  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 inhibisyonunun yeterli olup olmadığı ve özellikle 24 saati aşan uzun süreli  $\beta_2$ -AR uyarının gerekli olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla iki farklı deney protokolü uygulandı ve hücre proliferasyonu saptandı. MDA-MB231 hücreleri terbutalin ile 24 saat inkübe edildikten sonra besiyeri değiştirildi ve terbutalin ortamdan uzaklaştırıldı. Her 24 saatte bir hücrelerin besiyeri terbutalin içermeyen besiyeri ile değiştirildi ve hücre proliferasyonu 96 saat boyunca izlendi. Sonuçlara göre, 96 saatin sonunda ilk 24 saat terbutalin ile uyarılan hücrelerde proliferasyonun kontrolden farklı olmadığını ve proliferasyondaki inhibisyonun meydana gelmediğini gözlemledik (Şekil 4.17).



**Şekil 4.17.**  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile 24 saat'lik uyarıdan sonra 96. saatte ve 96 saat'lik uyarıdan sonra WST-1 yöntemi ile saptanan MDA-MB231 kanser hücre proliferasyonları. MDA-MB 231 hücreleri  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile 24 saat ve 96 saat uyarıldı. 96. saatin sonunda hücre proliferasyonları saptandı. Proliferasyon verileri grafikte kontrol yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ( $P<0.05$ ), (n=4).

#### 4.18. PKA'nın Hücre Proliferasyonuna Etkisi

$\beta_2$ -AR uyarının antiproliferatif etkisinin PKA aracılığı ile olup olmadığını saptamak için MDA-MB231 hücreleri PKA inhibitörü (H89) varlığında, terbutalin 1  $\mu$ M ile 72 ve 96 saat uyarıldı, ardından WST-1 yöntemi ile hücre proliferasyonu saptandı. Deneylerimizin bulgularına göre terbutalin ile uyarılan hücrelerin proliferasyon inhibisyonu H89 varlığında devam etmektedir ve PKA etkisinden bağımsız görünmektedir (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** PKA inhibitörü varlığında  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile 72 ve 96 saat'lik uyarıdan sonra WST-1 yöntemi ile saptanan MDA-MB231 kanser hücre proliferasyonları. MDA-MB 231 hücreleri PKA inhibitörü (H89, 10  $\mu$ M) ile tek başına ya da  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin (Trb, 1  $\mu$ M) ile birlikte 72 saat ve 96 saat inkübe edildi ardından hücre proliferasyonları saptandı. Proliferasyon verileri grafikte kontrolün yüzdesi olarak sunulmuştur. (\*) Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir ( $P<0.05$ ), (n=6).

## 5. TARTIŞMA

Literatürde birçok çalışmada  $\beta_2$ -AR uyarısı ile ERK1/2 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Kortikal nöronlarda ve melanositlerde cAMP'nin artışına bağlı Ras aktive olmakta ve ERK1/2 fosforilasyonunu arttırmaktadır (Ambrosini ve ark., 2000; Busca ve ark., 2000). Bu tez çalışmasında AR'leri uyaran çeşitli ligandlarla MDA-MB231 hücrelerinde pERK1/2 inhibisyonu meydana geldiği gözlemlendi. Ligandlar arasında izoproterenol ve epinefrin gibi nonspesifik  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -AR agonistlerinin yanında, terbutalin, clenbuterol ve formoterol gibi spesifik  $\beta_2$ -AR agonistleri yer almaktadır. Spesifik agonistlerle uyarmadan önce MDA-MB231 hücreleri  $\beta_2$ -AR antagonisti ICI118,551 ile inkübe edildi ve pERK1/2 inhibisyonunun meydana gelmediğini gözlemlendi. Elde edilen bu bulgular göstermektedir ki  $\beta_2$ -AR'ün uyarılması pERK1/2 inhibisyonuna neden olmaktadır.

Ayrıca AR'den bağımsız olarak, hücre içinde cAMP aktivitesini arttıran forskolin ile pERK1/2 düzeyinde inhibisyon saptandı. Elde edilen bu bulgular literatürde MDA-MB231 hücre serisi ile yapılan benzer çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir (Slotkin ve ark., 2000; Carie ve Sebt., 2007; Pinero ve ark., 2012).

$\beta_2$ -AR'ler hem  $G_{s\alpha}$  hem  $G_{i\alpha}$  protein ile kenetlenebilir ve farklı sinyal yollarının aktive olmasına neden olabilirler. MDA-MB231 hücreleri  $G_{i\alpha}$  inhibitörü pertusis toksini ile inkübe edildikten sonra spesifik agonistlerle uyarıldı ve daha önce agonislerin varlığında gözlemlenen pERK1/2 inhibisyonun pertusis toksini varlığında da devam ettiği gözlemlendi. Bu bulgular ışığında terbutalin ve clenbuterol gibi spesifik  $\beta_2$ -AR agonistlerinin  $G_{s\alpha}$  aracılığı ile ERK1/2 aktivitesini düzenlediğini düşünmekteyiz.

PKA,  $\beta_2$ -AR sinyal yolağında aktive olan önemli bir kinazdır. Hücre içi cAMP'nin artışı önemli bir efektör protein olan PKA'yı aktive etmektedir. Polikistik böbrek hastalığı olan hastalardan alınan epitelyal hücrelerde cAMP artışı ERK1/2 aktivasyonuna neden olmuş ve PKA inhibitörü (H89) bu ERK1/2 aktivitesini inhibe etmiştir (Yamaguchi ve ark., 2003). Yenidoğan sıçan kardiyomiyositlerinde nonselektif  $\beta$ -AR

agonisti izoproterenol Raf-1/PKA aktivitesini artırarak ERK1/2 aktivasyonuna neden olmuştur (Yamazaki ve ark., 1997). Bunun tersine, izoproterenol ile uyarılan sıçan adiposit hücrelerinde cAMP artışı, insüline bağlı ERK1/2 aktivitesini inhibe ederken tek başına kullanıldığında (insülin olmadığında) inhibisyona neden olmamıştır (Sevetson ve ark., 1993). PKA ile ERK1/2 aktivasyonu ile ilgili literatürde çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar PKA aracılı RAS aktivitesinin arttığını ve dolayısı ile ERK1/2 aktivitesinde artış meydana geldiğini savunurken (Ambrosini ve ark., 2000; Busca ve ark., 2000) bazı araştırmacılar da PKA'nın c-Raf'ı inhibe ettiğini ve böylece ERK1/2 aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğunu savunmuştur (Schmitt ve Stork, 2001; Schmitt ve Stork, 2002). Hewer ve ark. (2011) çalışmalarında, damar düz kas hücresinde cAMP'nin efektörleri olan PKA ve Epac arasında bir sinerjizma olduğunu ve bunun ERK1/2 inhibisyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Carie ve Sebt (2007) MDA-MB231 hücresi ile yapılan çalışmalarında  $\beta_2$ -AR uyarı ile aktive olan cAMP/Epac yolağının, pERK1/2 inhibisyonuna etkisinin olmadığını bildirmiştir.  $\beta_2$ -AR uyarısı ile  $G_{sa}$ /cAMP/PKA yolağı aktive olmaktadır. Gözlemlediğimiz pERK1/2 inhibisyonunun cAMP aracılığı ile olduğu yönünde bulgular vardır. Forskolin uyarısı ile inhibisyonun meydana gelmesi bu yaklaşımı desteklemektedir. Carie ve Sebt (2007) MDA-MB231 hücreler ile çalışmalarında,  $\beta_2$ -AR uyarısının cAMP/PKA aracılı ERK1/2 inhibisyonu yaptığını göstermiştir. Bizim bulgularımıza göre PKA inhibitörü H89,  $\beta_2$ -AR uyarılması ile meydana gelen ERK1/2 inhibisyonunu kısmen engellemektedir. Sonuçlara göre  $\beta_2$ -AR uyarısı cAMP/PKA aracılı ERK1/2 aktivitesi üzerinde düzenleyici bir kontrol sağlamak ve MDA-MB231 hücrelerinde bu yolağın dışında başka mekanizmalar ERK1/2 fosforilasyonunun düzenlenmesinde rol almaktadır.

ERK1/2 aktivitesinin düzenlenmesinde kinazlar yanında çeşitli fosfatazlar da yer almaktadır. Fosfataz ailesi çok geniş olmasına rağmen bazı fosfatazlar ERK1/2'e olan yüksek affiniteleri nedeniyle ön plana çıkmaktadırlar. Bu fosfatazlar arasında treonin fosfataz ailesi üyeleri DUSP1 ile DUSP6 ve fosfo protein fosfataz ailesi üyeleri PP1 ile PP2A yer almaktadır. MDA-MB231 hücrelerinde bu fosfatazların rolü çok iyi bilinmemektedir.

Çalışmamızda terbutalin ile uyarılan MDA-MB231 hücrelerde kısa sürede (5. dakika itibaren) total DUSP1 protein seviyesinde artış ve pDUSP1 (ser359) inhibisyon gözlemlendi. DUSP1 çok hızlı indüklenebilen bir proteindir. Terbutalin uyarısı ile gözlemlenen tDUSP1 seviyesinde artış, bu enzimin *de novo* transkripsiyon düzeyinde sentezinin artışı ya da stabilitesindeki artışa bağlı olarak yıkımındaki azalış ile ilişkili olabilir. DUSP1 proteini hızlı sentezlenir ve yaklaşık 40 dakika ile 1 saat arasında yarılanma ömrü vardır (Charles ve ark., 1992). Burgun ve ark. (2000) PC12 hücre serisinde yaptıkları çalışmalarında MKP-1 geninin cAMP tarafından MAPK aktivitesinden bağımsız olarak indüklendiğini ve DUSP1 protein ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. DUSP1 transkripsiyonu hızlı başlamakta ve dakikalar içinde (10-20 dk) en üst seviyeye ulaşmakta ve 1 saat sonra düzeyinde azalma meydana gelmektedir (Lau ve Nathans, 1987). Çalışmamızda 30. dakikada DUSP1 mRNA ekspresyonunun arttığını gözlemledik. Bu artış 1 saate kadar devam etmekte fakat 24. saatte ortadan kaybolmaktadır. Bu bulgular DUSP1 proteinin transkripsiyon düzeyinde arttığını göstermektedir. Fakat DUSP1'in seviyesindeki artış 5. dakikadan itibaren ve mRNA'nın indüksiyonundan önce olması DUSP1 proteinin post-translasyon düzeyinde regüle olma ihtimalini düşündürmektedir. Birçok çalışmada, çeşitli uyaranlar varlığında DUSP1 protein seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Schliess ve ark., 2000; Wu ve ark., 2005b; Fürst ve ark., 2005) . Bu artışın nedeni *de novo* sentez mi yoksa protein stabilitesinin artması mı olduğu netlik kazanmamıştır. Yaglom ve ark. (2003) insan akciğer fibroblast hücrelerinde yaptıkları çalışmalarında HSP72 ile uyarı sonucu DUSP1 protein denatürasyonunun azaldığını ve aktivitesinin korunduğunu göstermiştir. Benzer şekilde Kassel ve ark. (2001) glukokortikoidlerin DUSP1 mRNA'nın indüksiyonuna ve bu proteinin proteozom tarafından degradasyonunun azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Hücrelerin uyarılması ile DUSP1'in doğrudan hedef olarak alınıp alınmadığı veya dolaylı olarak çeşitli efektörlerin etkileşmesi sonucu DUSP1 seviyelerindeki değişikliklerin bir adaptasyon mekanizması olup olmadığı aydınlatılmamıştır. DUSP1 protein düzeyindeki artış, mRNA'sının ekspresyonunun artması ya da yıkımı azaltacak protein stabilitesinin artışı ile olabilir. Bu husus net değildir. DUSP1'in en önemli

fonksiyonu, ERK1/2'yi defosforile ederek onun aktivitesini inhibe etmesidir (Camps ve ark., 2000). Çalışmamızda saptadığımız DUSP1 seviyesindeki artış ERK1/2 defosforilasyonuna neden olmaktadır. Bugün bilinmektedir ki DUSP1, ERK1/2 defosforilasyonuna neden olmakla birlikte aynı zamanda ERK1/2 için bir substrat olup ERK1/2 tarafından fosforillenmektedir (Brondello ve ark., 1999). DUSP1 enzimi serin 359 ve serin 364 bölgelerinden fosforillendiği zaman daha stabil ve aktif hale gelmektedir (Brondella ve ark., 1999; Wu ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda MDA-MB231 hücreler terbutalin ile uyarıldıktan sonra DUSP1 defosforilasyonu ile ERK1/2 defosforilasyonu arasında benzer bir korelasyon görülmektedir. ERK1/2 aktivitesinde inhibisyon, DUSP1 fosforilasyonunun inhibisyonuna neden olmaktadır. Aslında bu beklenen bir sonuçtur. ERK1/2 fosforilasyonunda azalma ERK1/2 bağımlı DUSP1 enziminin fosforilasyonunda azalmaya neden olmaktadır. Fosforile DUSP1 proteinin katalitik aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığı fakat stabilitesinin arttığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda fosforile ERK1/2 inhibisyonuna bağlı fosforile DUSP1'in azalması bir *feedback* mekanizmayı göstermektedir ve ERK1/2 ile DUSP1'in birbirinin aktivitesinin regülasyonunda rol aldıkları görülmektedir. Deneylerimizde gözlemlediğimiz bir diğer bulgu DUSP6 protein ekspresyon düzeyinde değişikliğin meydana gelmemesidir. Aynı sonuç DUSP6 mRNA düzeylerinde tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar PC12 hücre serisi ile yaptıkları çalışmalarında NGF ve bFGF ile uyarı sonucu mRNA ve DUSP6 protein seviyesinde artış gözlemlemişlerdir. Ayrıca ERK1/2 aktivitesi ile DUSP6 ekspresyonunun yakın ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Buna rağmen araştırmacılar aynı hücre serisi ile deneylerinde EGF, IGF-II, *dibutyryl cyclic AMP* ile uyarı sonucu DUSP6 ekspresyonunun değişmediğini göstermişler ve DUSP6 ekspresyon düzeylerinin hücreye ve uygulanan stimulusa spesifik bir yanıt olabileceği sonucuna ulaşmışlardır (Camps ve ark., 1998b). Literatürde DUSP6'nın ERK1/2 defosforilasyonunda rolü olduğu bilinmektedir (Groom ve ark., 1996; Muda ve ark., 1996). DUSP6 proteinin, NH<sub>2</sub>-terminali "noncatalytic" bölgesinin pERK1/2'e sıkıca bağlandığı bildirilmiştir (Muda ve ark., 1998). pERK1/2'e bağlanan DUSP6 proteinin COOH- terminali katalitik bölgesinin aktivitesi yaklaşık 35 kat artmaktadır (Camps ve ark., 1998a).

Deneylerimizde DUSP6 proteinin ekspresyon ve mRNA düzeyinde değişiklik görmememize rağmen bu proteinin katalitik aktivite düzeyinde bir değişikliğin olması ihtimaller çerçevesinde değerlendirilmelidir.

DUSP1 ve DUSP6 fosfatazların etkisini araştırmak amacı ile çalışmamızda DUSP1/6 inhibitörü olan BCI kullanıldı. Molina ve ark. (2009) DUSP1 ve DUSP6 inhibitörü olan BCI molekülünü sentezleyerek bu maddenin IC<sub>50</sub> değerlerinin, DUSP6 için 12.3 ± 4.0 µM, DUSP1 için ise 11.5 ± 2.8 µM olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda BCI (10µM) varlığında terbutalin ile oluşan ERK1/2 defosforilasyonunda inhibisyon meydana geldi. Bu bulgular hem DUSP1 hem DUSP6 fosfatazın ERK1/2 aktivitesinin düzenlenmesinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Her iki fosfatazın ayrı ayrı rolünü belirlemek için bu enzimlerin aktivitesinin doğrudan ölçüleceği ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır. β<sub>2</sub>-AR uyarı ile meydana gelen tDUSP1 seviye artışının PKA ile ilişkili olup olmadığı görmek için MDA-MB231 hücreleri PKA inhibitörü H89 ile uyarıldı. İnhibitör varlığında tDUSP1 seviyelerinde kısmen inhibisyon meydana geldi. Bu sonuç PKA'nın, DUSP1 enzimin regülasyonunda rol oynadığını düşündürmektedir.

Daha önce de belirttiğimiz gibi ERK1/2 aktivitesini düzenleyen bir diğer fosfataz grubu PP1 ve PP2A enzimlerin üyesi olduğu fosfo protein fosfatazlardır. Çalışmamızda β<sub>2</sub>-AR uyarısı ile PP1 ve PP2A aktivitesinin nasıl değiştiiğini ve bu proteinlerin ERK1/2'e etkilerini araştırdık. Terbutalin ile uyardığımız MDA-MB231 hücrelerde western blot yöntemi ile PP1 proteinin ve PP2A proteinin total ve fosforillenmiş seviyelerini tespit ettik. Deneylerimizin sonucuna göre PP1 ve PP2A proteinlerin total seviyesinde değişiklik meydana gelmemiştir. Ayrıca pPP2A protein seviyesinde de kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Fakat terbutalin uyarısı ile pPP1 protein seviyelerinde inhibisyon gözlemledik. Saptamış olduğumuz pPP1 treonin 320 amino asidi fosforillenmiştir. Bu amino asidin fosforillenmesi PP1 enziminin katalitik aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak β<sub>2</sub>-AR uyarısı ile PP1 enzimin katalitik aktivitesi artmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre β<sub>2</sub>-AR uyarısı PP1 enzim aktivitesini arttırmakta fakat PP2A enzim aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Calyculin A, PP1 enzimi

İC<sub>50</sub> değeri 2 nM ve PP2A enzimi IC<sub>50</sub> değeri 0.5 -1.0 nM ile inhibe etmektedir. Çalışmalarımız Calyculin A varlığında PP1 enziminin aktivitesinde azalma meydana geldiğini, ERK1/2 defosforilasyonun ise ortadan kalktığını göstermektedir. MDA-MB231 hücre serisinde PP1 enzimi, ERK1/2 aktivitesinin regülasyonunda rol almaktadır. Literatürde PP1 enziminin aktivitesinin PKA tarafından regülasyonu ile çeşitli bildirimler vardır (Wu ve ark. 2009; Liu ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda edindiğimiz sonuçlar PKA inhibitörü H89'un terbutalinin arttırdığı PP1 aktivitesini geri çevirdiğini göstermiştir. Bu sonuç  $\beta_2$ -AR uyarısı ile artan PP1 aktivitesinde PKA'nın rolünün olduğunu göstermektedir. PP1 ve PP2A enzimlerinin aktivitesi çeşitli regülatör proteinlerle etkileşerek düzenlenmektedir. Regülatör proteinler farklı uyarılar tarafından fosforillenerek ya da defosforillenerek söz konusu fosfatazlarla etkileşmekte, enzim aktivitesinin etkilemekte ve aktivatör ya da inhibitör rol oynayabilmektedirler. MDA-MB231 hücrelerinde  $\beta_2$ -AR ve PKA uyarısı ile hangi regülatör proteinlerin PP1 proteinin aktivitesinde rol oynadığı ileriye yönelik araştırmalar ile aydınlatılmalıdır.

GPCR'lerin sinyali birçok mekanizma tarafından düzenlenebilmektedir. Bu mekanizmalar reseptör sayısının ya da aktivitesinin değişmesine neden olmaktadır. Tekrarlanmış veya uzun süreli uyarılar reseptör sayısında ve aktivitesinde azalma ile sonuçlanmakta ve agonist bağımlı reseptör desensitizasyonu olarak tanımlanmaktadır (Lohse ve ark., 1996). Spesifik  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile gözlemlediğimiz pERK1/2 inhibisyonu çok hızlı başlamakta 5. dakikadan itibaren gözlemlenmekte ve yanıt 24. saatte ortadan kalkmaktadır. pERK1/2 inhibisyonun ortadan kalkması muhtemelen desensitizasyon mekanizmasına bağlıdır. Bugün literatürde  $\beta$ -AR'lerin aktivitesini düzenleyen mekanizmalar arasında desensitizasyon ve reseptör downregülasyon mekanizması önemli rol almaktadır (Liggett ve Lefkowitz, 1993). Uzun süreli agonist uyarı ile karşı karşıya kalan  $\beta$ -AR'ler G protein ile kenetli reseptör kinaz (GRK) diye adlandırılan spesifik kinazlar tarafından fosforile edilir. Ardından arrestinler reseptöre bağlanır ve reseptörün G proteinden ayrılmasına ve aktivasyonun sonlanmasına neden olur. Sonuç olarak ligand reseptöre bağlansa da reseptör hücre içine sinyal gönderememektedir (Lohse

ve ark., 1996). Aynı mekanizma reseptörün endositozu indükleyerek sayıca azalmasına neden olmaktadır. Slotkin ve ark. (2000), MDA-MB231 hücrelerinde uzun süreli izoproterenol uyarısı sonucu  $\beta$ -AR'de desensitizasyon ve downregülasyonun geliştiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla bizim sonuçlarımız literatür bilgisine paralel olarak  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 inhibisyonunun 24 saatten sonra kalktığını göstermektedir.

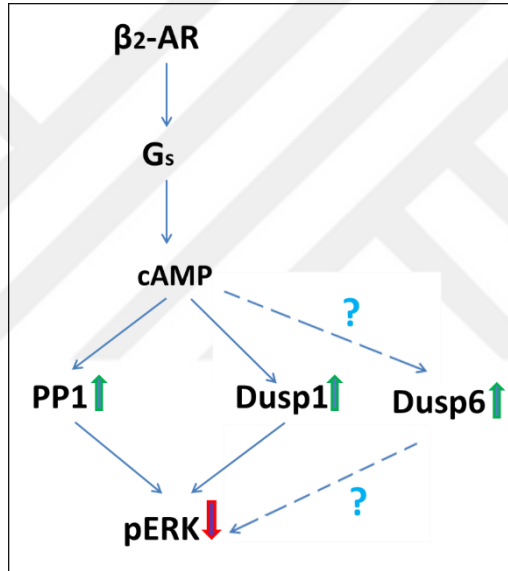
Çalışmamızda gözlemlediğimiz bir diğer bulgu ise MDA-MB231 hücrelerinin  $\beta_2$ -AR agonistleri ile (terbutalin, clenbuterol ve formoterol) 72 ve 96 saat inkübasyonu sonucunda hücre proliferasyonunda inhibisyon ve hücrelerin ikiye bölünme süresinde uzama meydana gelmektedir. Slotkin ve ark. (2000), MDA-MB231 hücrelerini 72 saat izoproterenol ile uyardıklarında proliferasyonun inhibe olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sonuç bizim bulgularımızla benzerdir. Ayrıca Pinero ve ark. (2012) nonspesifik  $\beta$ -AR agonisti izoproterenol ve spesifik  $\beta_2$ -AR agonisti salbutamol'un *in vivo* farelerde tümör kitlesinin küçülmesine neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaların sonuçları doğrultusunda  $\beta_2$ -AR agonistleri aracılı gözlemlenen antiproliferatif ve antitümöral etkinliğin,  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 inhibisyonu ile bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür. MEK1 inhibitörü ve dolaylı olarak ERK1/2 inhibitörü PD98059 ile 72 saat inkübe edilen MDA-MB231 hücrelerde proliferasyon inhibisyonu meydana gelmiştir (Seddighzadeh ve ark., 1999).  $\beta_2$ -AR agonistleri ile 72 saat inkübasyon ile gözlemlenmeye başlanan hücre proliferasyonundaki inhibisyonun ilk bakışta cAMP/ERK aracılı olabileceği düşünülebilir. Schmit ve ark. (2001), Hek293 ve NIH 3T3 hücre serisi ile yaptıkları çalışmalarının sonunda, hücre içi cAMP artışının MAPK yolağını ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında forskolin ile cAMP'nin artışını sağlamış ve 96 saatlik hücre proliferasyonunda saptadıkları inhibisyonun, azalan RAS/ERK1/2 aktivitesine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bizim bulgularımız literatür sonuçlarına paralellik göstermektedir fakat sonuca götüren mekanizma açısından bizim çalışma sonuçlarımız farklılıklar sergilemektedir. Bulgularımıza göre ERK1/2 aktivitesinin inhibisyonu 24. saatte ortadan kalkmaktadır.

Oysa  $\beta_2$ -AR uyarısı ile proliferasyonun inhibisyonu 72 saatte meydana gelmektedir. Bu durumda aklımıza gelen soru, ilk 24 saatte terbutalin uyarısı ile gördüğümüz pERK1/2 inhibisyonunun, 72 saatten sonra gözlemlenen hücre proliferasyonunun inhibisyonu için yeterli olup olmadığıdır. Bu konuyu aydınlatmak için MDA-MB231 hücreleri ilk 24 saat  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile inkübe edildi, sonra ortamdan terbutalin çekildi ve normal büyüme besiyeri ile değiştirildi ve 72 saat sonra hücre proliferasyonu ölçüldü. Deneyimizin sonucuna göre sadece ilk 24 saat boyunca  $\beta_2$ -AR agonisti terbutalin ile uyarılan hücrelerde 96. saatte proliferasyonda inhibisyon görülmedi. Bu bulgular doğrultusunda MDA-MB231 hücrelerinde proliferasyonun inhibisyonu için  $\beta_2$ -AR agonistlerin uzun süreli varlığının ve etkisinin gerekli olduğu görülmektedir.

Bazı literatür bulguları cAMP/PKA aracılı hücre proliferasyonunun inhibisyonunu göstermiştir. Düz kas hücrelerinde cAMP/PKA sinyali hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir (Indolfi ve ark., 1997). K562 kanser hücre serisinde tehranolide PKA aktivitesini artırarak hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Bizim çalışmalarımız PKA inhibitörü (H89) varlığında terbutalinin antiproliferatif etkisinin 72 ve 96 saatte devam ettiğini ve engellenmediğini göstermiştir. Bu bulgular  $\beta_2$ -AR agonisti ile uyarılan MDA-MB231 kanser hücrelerin proliferasyonunun inhibisyonu için PKA'nın aktivitesinin rolünün olmadığını düşündürmektedir. PKA aktivitesi ile ilgili literatür bilgileri farklılık göstermektedir. Fizyolojik ya da patolojik durumlarda aktif PKA'nın hücre içinde lokalizasyonu farklılık gösterebilir, bu da PKA'nın farklı fizyolojik etkiler meydana getirmesine neden olabilmektedir (Rich ve ark., 2001). Steinberg ve Brunton (2001), çalışmalarında aynı hücrede çeşitli agonistlerin farklı cAMP ve PKA aktivitesine ve dolayısı ile farklı fizyolojik etkilere neden olduğunu göstermiştir. Bu farklılıkların nedeni muhtemelen hücrede değişik bölgelere dağılmış PKA Anchoring Proteinler (AKAP)'den kaynaklanabilir. Bu proteinler PKA'yı bağlayarak onun hedef molekülüne yakın olmasını sağlamakta, böylece geniş bir substrat yelpazesi olmasına karşın aktif PKA sadece hedef molekülün fosforilasyonuna neden olmaktadır (Beene ve ark., 2007).

Özet olarak çalışmalarımızın sonuçları,  $\beta_2$ -AR uyarısı ile ERK1/2 aktivitesinin inhibe olduğunu, bu inhibisyonda DUSP1/DUSP6 ve PP1 fosfatazların rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca  $\beta_2$ -AR uyarı ile artan PKA aktivitesinin, gözlemlenen pERK1/2 inhibisyonunda, artan tDUSP1 seviyesinde ve artan PP1 aktivitesinde önemli olduğu görülmektedir. Diğer taraftan PKA,  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 inhibisyonunda rol almasına rağmen  $\beta_2$ -AR aracılı MDA-MB231 hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonunu etkilememektedir.  $\beta_2$ -AR aracılı antiproliferatif etkinlikte PKA dışında sinyal yollarının araştırılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.



**Şekil 5.1.**  $\beta_2$ -AR uyarı ile ERK1/2 defosforilasyon mekanizmasının şematik gösterilmesi.

## 6. SONUÇLAR

- 1) MDA-MB231 hücre serisinde  $\beta_2$ -AR uyarılması ERK1/2 defosforilasyonu ile sonuçlanmaktadır.
- 2) MDA-MB231 hücre serisinde  $\beta_2$ -AR ligandlar aracılı ERK1/2 defosforilasyonu  $G_{i/o\alpha}$  aracılı değildir.
- 3) MDA-MB231 hücre serisinde gözlemlenen ERK1/2 defosforilasyonu kısmen cAMP/PKA tarafından regüle edilmektedir.
- 4) DUSP1 enzimi,  $\beta_2$ -AR uyarısı ile meydana gelen ERK1/2 defosforilasyonunda rol oynamaktadır.
- 5) MDA-MB231 hücre serisinde PP1 enzimi, ERK1/2 aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır, fakat PP2A enziminin ERK1/2 aktivitesinin regülasyonunda rolü yoktur.
- 6)  $\beta_2$ -AR aracılı gözlemlenen DUSP1 protein seviyesi ve PP1 enzim aktivitesinin düzenlenmesinde PKA'nın rolü vardır.
- 7)  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 defosforilasyonu 24 saatte ortadan kalkmaktadır.
- 8) MDA-MB231 kanser hücrelerinde  $\beta_2$ -AR uyarı proliferasyonun inhibisyonuna neden olmaktadır fakat bu etki için 72, 96 saat gibi uzun süreli uyarı gerekmektedir.
- 9) PKA aktivitesi,  $\beta_2$ -AR aracılı hücre proliferasyonunun inhibisyonunu etkilememektedir.

## ÖZET

### **Beta-Adrenerjik Reseptör Ligandlarının Meme Kanseri Hücrelerinin Regülasyonuna Etkisi**

MDA-MB231 kanser hücresinde  $\beta_2$ -AR (beta 2 adrenerjik reseptör) uyarısı bazal fosforile ERK1/2'i (extracellular signal regulated kinases 1/2) ve hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Bu çalışmada  $\beta_2$ -AR aracılı, ERK1/2 defosforilasyonunun mekanizmasının aydınlatılması ve bu yanıtın  $\beta_2$ -AR aracılı antiproliferatif etkideki rolünün araştırılması amaçlandı. Bu amaçla öncelikle ERK1/2 fosforilasyonun regülasyonunda rolü olduğu bilinen PKA (protein kinaz A), DUSP1/6 (dual specificity fosfataz 1 ve 6), ve PP1/PP2A (serine/threonine fosfataz 1 ve 2) rolü araştırıldı. Bunun için DUSP1/6 inhibitörü, (E)-2-benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (BCI), PP1/PP2A inhibitörü Calyculin A ve PKA inhibitörü H89'un  $\beta_2$ -AR uyarısı ile gözlemlenen, pERK1/2 defosforilasyonuna etkisi, DUSP1, DUSP6, pDUSP1, PP1, PP2A, pPP1 ve pPP2A protein düzeyleri saptandı. Total DUSP1 mRNA düzeyi ölçüldü.

Çalışılan tüm proteinlerin göreceli mikterları Western blot analizi ile ölçüldü. Hücre proliferasyon deneyi WST-1 kiti ve iCellegence sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. mRNA düzeyi ise Real Time PCR ile saptandı.

$\beta_2$ -AR uyarısı ile bazal pERK1/2, pDUSP1 (ser359) ve pPP1 (PP1'in inhibitör formu, treonin 320 fosforilasyonu) düzeyinde azalma, tDUSP1 düzeyinde ise artış meydana geldi, ayrıca MDA-MB231 hücre proliferasyonunda inhibisyon gözlemlendi. BCI ve Calyculin A,  $\beta_2$ -AR uyarısı ile gözlemlenen pERK1/2 defosforilasyonunu tamamen inhibe ederken H89 ise kısmi fakat önemli düzeyde bir inhibisyona neden oldu. Terbutalin ile stimülasyon, total DUSP1 ekspresyonunu ve PP1 aktivitesini arttırdı. PKA inhibitörü (H89) varlığında,  $\beta_2$ -AR uyarısı ile artan tDUSP1 seviyelerinde kısmen inhibisyon meydana geldi, azalmış pPP1 seviyelerinde ise inhibisyonun ortadan kalktığı gözlemlendi. Ayrıca bu bulgulara ek olarak,  $\beta_2$ -AR uyarısı ile oluşan ERK1/2 inhibisyonu ile hücre proliferasyonunun inhibisyonu arasındaki bağlantıyı araştırmaya yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. Bu çalışmalarda  $\beta_2$ -AR agonistlerin ERK1/2

aktivitesini inhibe edici etkisinin 24 saatlik uyarı sonunda ortadan kalkmasına rağmen, MDA-MB231 hücre proliferasyonunun inhibisyonu için agonistlerle 72 ve 96 saatlik  $\beta_2$ -AR uyarısının gerektiği gözlemlenmiştir. PKA inhibitörü H89  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 inhibisyonunu engellemesine rağmen hücre proliferasyonunu ve  $\beta_2$ -AR uyarısı ile gözlemlenen antiproliferatif etkiyi değiştirmedir.

Bu sonuçlar DUSP1/6 ve PP1 enzimlerinin,  $\beta_2$ -AR uyarısı ile oluşan ERK1/2 defosforilasyonunda rolü olabileceğini göstermektedir. PKA'nın,  $\beta_2$ -AR uyarısı ile azalan ERK1/2 aktivitesinde, artan PP1 aktivitesinde ve artan tDUSP1 seviyelerinde rolü olduğu görülmektedir. Bir diğer taraftan PKA inhibisyonunun,  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 inhibisyonunu engellemesine rağmen  $\beta_2$ -AR aracılı antiproliferatif etki üzerinde rolü yoktur. Ayrıca  $\beta_2$ -AR aracılı ERK1/2 aktivitesindeki inhibisyonun hızla ortadan kalkmasına rağmen MDA-MB231 hücre proliferasyonunun inhibisyonu için uzun süreli  $\beta_2$ -AR uyarısı gerekmektedir. Bu sonuçlar  $\beta_2$ -AR aracılı antiproliferatif etkinin ERK1/2 inhibisyonu ile açıklanamayacağını ve ek çalışmalar ile bu yolağın aydınlatılması gerektiğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** MDA-MB231, Beta-2 Adrenerjik Reseptör, ERK1/2, Proliferasyon, Protein Fosfataz.

## SUMMARY

### The Effect of Beta-Adrenergic Ligands on Breast Cancer Cell Regulation

Activation of  $\beta_2$ -AR (beta<sub>2</sub>-Adrenoceptor) can reduce basal pERK1/2 (phosphorylated extracellular signal regulated kinases 1/2) level and inhibit proliferation of MDA-MB231 breast cancer cells. In the present study we aimed to understand the mechanism of  $\beta_2$ -AR mediated ERK1/2 de-phosphorylation. Firstly we examined the role of PKA (protein kinase A), DUSP1/6 (dual specificity phosphatase 1 and 6), and PP1/PP2A (serine/threonine phosphatase 1 and 2), which are known to be regulators of ERK1/2 phosphorylation. We investigated the effect of DUSP1/6 inhibitor, (E)-2-benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (BCI), PP1/ PP2A inhibitor Calyculin A and PKA inhibitor (H89) on  $\beta_2$ -AR mediated de-phosphorylation of pERK1/2 and determined the expression of DUSP1, DUSP6, pDUSP1, PP1, PP2A, pPP1 and pPP2A proteins. We also determined total DUSP1 mRNA levels.

Relative levels of proteins were measured by Western blotting. Cell proliferation was assessed by WST-1 kit and iCellegence system. mRNA levels were determined by Real Time PCR.

$\beta_2$ -AR stimulation by agonists lead to de-phosphorylation of basal pERK1/2, pDUSP1 (ser359) and pPP1 (Threonine 320, inhibitor form of PP1), increased total DUSP1 levels and also inhibited MDA-MB231 cell proliferation. BCI and Calyculin A completely, H89 partially antagonized the  $\beta_2$ -AR mediated de-phosphorylation of ERK1/2. Terbutaline stimulation increased the expression of total DUSP1 protein and enhanced the active form of PP1. PKA inhibitor (H89) partially antagonized  $\beta_2$ -AR mediated tDUSP1 increase and inhibited  $\beta_2$ -AR mediated de-phosphorylation of pPP1. We also performed experiments in order to explore the relationship between  $\beta_2$ -AR mediated ERK1/2 de-phosphorylation and inhibition of the cell proliferation. In the present study although  $\beta_2$ -AR mediated ERK1/2 de-phosphorylation diminished after 24 hours, we observed that at least 72 or 96 hour of  $\beta_2$ -AR stimulation is required in order to get access to inhibition of MDA-MB231 cell

proliferation. PKA inhibitor H89 did not inhibit cell proliferation and did not change the antiproliferative effect of  $\beta_2$ -AR stimulation.

These results showed that  $\beta_2$ -AR mediated de-phosphorylation of ERK1/2 is related to the activity of DUSP1/6 and PP1. Although PKA takes part in the regulation of  $\beta_2$ -AR mediated ERK1/2 dephosphorylation and increased PP1 activity and total DUSP1 protein expression, it has no effect on  $\beta_2$ -AR mediated cell proliferation inhibition. Our data showed that despite the fast desensitization of ERK1/2 response, long time  $\beta_2$ -AR stimulation is required in order to inhibit MDA-MB231 cell proliferation.  $\beta_2$ -AR mediated pERK1/2 de-phosphorylation cannot explain inhibition of MDA-MB231 cell proliferation so further studies are required to clarify it.

**Keywords:** MDA-MB231, Beta-2 Adrenergic Receptor, ERK1/2, Proliferation, Protein Phosphatase.

## KAYNAKLAR

Alessi, D.R., Smythe, C., Keyse, S.M. (1993). The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene* 8: 2015-2020.

Alessi, D.R., Gomez, N., Moorhead, G., Lewis, T., Keyse, S.M., Cohen, P. (1995). Inactivation of p42 MAP kinase by protein phosphatase 2A and a protein tyrosine phosphatase, but not CL100, in various cell lines. *Current Biology* 5: 283–295.

Ally, S., Clair, T., Katsaros, D., Tortora, G., Yokozaki, H., Finch, R.A., Avery, T.L., Cho-Chung, Y.S. (1989). Inhibition of growth and modulation of gene expression in human lung carcinoma in athymic mice by site-selective 8-Cl-cyclic adenosine monophosphate. *Cancer Research* 49: 5650–5655.

Ambrosini, A., Tininini, S., Barassi, A., Racagni, G., Sturani, E., Zippel, R. (2000). cAMP cascade leads to Ras activation in cortical neurons. *Molecular Brain Research* 75: 54–60.

Axton, J.M., Dombrádi, V., Cohen, P.T., Glover, D.M. (1990). One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell* 63: 33-46.

Balmano, K., Cook, S.J. (2009). Tumour cell survival signalling by the ERK1/ 2 pathway. *Cell Death Differentiation* 16: 368–377.

Bang, Y.J., Kwon, J.H., Kang, S.H., Kim, J.W., Yang, Y.C. (1998). Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 250: 43–47.

Barron, T.I., Sharp, L., Visvanathan, K. (2012). Beta-adrenergic blocking drugs in breast cancer: a perspective review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 4: 113–125.

Beene, D.L., Scott, J.D. (2007). A-kinase anchoring proteins take shape. *Current Opinion in Cell Biology* 19: 192–198.

Blagosklonny, M.V., Schulte, T., Nguyen, P., Trepel, J., Neckers, L.M. (1996). Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Research* 56: 1851–1854.

Bokemeyer, D., Sorokin, A., Yan, M., Ahn, N.G., Templeton, D.J., Dunn, M.J. (1996). Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress activated protein kinase signalling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 271: 639–642.

Brenton, J.D., Carey, L.A., Ahmed, A.A., Caldas, C. (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of Clinical Oncology* 23: 7350–7360.

Brondello, J.M., Brunet, A., Pouyssegur, J., McKenzie, F.R. (1997). The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44 MAPK cascade. *Journal of Biological Chemistry* 272: 1368–1376.

Brondello, J.M., Pouyssegur, J., McKenzie, F.R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* 286: 2514-7.

Burgun, C., Esteve, L., Humblot, N., Aunis, D., Zwiller, J. (2000). Cyclic AMP-elevating agents induce the expression of MAP kinase phosphatase-1 in PC12 cells. *FEBS Letters* 484:189-193.

Busca, R., Abbe, P., Mantoux, F., Aberdam, E., Peyssonnaud, C., Eychene, A., Ortonne, J.P., Ballotti, R. (2000). Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO Journal* 19: 2900–2910.

Cailleau, R., Young, R., Olive, M., Reeves, W.J.Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *The Journal of the National Cancer Institute* 53: 661–674.

Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., Arkinstall, S. (1998a). Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 280: 1262-1265.

Camps, M., Chabert, C., Muda, M., Boschert, U., Gillieron, C., Arkinstall, S. (1998b). Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12. *FEBS Letters* 425: 271–276.

Camps, M., Nichols, A., Arkinstall, S. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *The FASEB Journal* 14: 6-16.

Carie, A.E., Sebt, S.M. (2007). A chemical biology approach identifies a beta-2 adrenergic receptor agonist that causes human tumor regression by blocking the Raf-1/Mek-1/Erk1/2 pathway. *Oncogene* 26: 3777–3788.

Ceulemans, H., Stalmans, W., Bollen, M. (2002). Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution. *Bioessays* 24: 371–381.

Ceulemans, H., Bollen, M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiological Reviews* 84: 1–39.

Chang, L., Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37–40.

Charles, C.H., Abler, A.S., Lau, L.F. (1992). cDNA sequence of a growth factor inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene* 7: 187–190.

Chavez, K.J., Garimella, S.V., Lipkowitz, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Disease* 32: 35–48.

Chen, J., Martin, B.L., Brautigan, D.L. (1992). Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science* 257: 1261-1264.

Chen, J., Fujii, K., Zhang, L., Roberts, T., Chen, H.F. (2001). Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK–ERK independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 7783–7788.

Chen, R.H., Sarnecki, C., Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk and rsk-encoded protein kinases. *Molecular and Cellular Biology* 12: 915–927.

Cho-Chung, Y.S., Nesterova, M., Becker, K.G., Srivastava, R., Park, Y.G., Lee, Y.N., Cho, Y.S., Kim, M.K., Neary, C., Cheadle, C. (2002). Dissecting the circuitry of protein kinase A and cAMP signaling in cancer genesis: antisense, microarray, gene overexpression, and transcription factor decoy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 968: 22–36.

Cobb, M.H., Goldsmith, E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *The Journal of Biological Chemistry* 270:14843–14846.

Cohen, P.T. (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 245-251.

Cohen, P.T. (2002). Protein phosphatase 1–targeted in many directions. *The Journal of Cell Science* 115: 241–256.

Cook, S.J., Beltman, J., Cadwallader, K.A., McMahon, M., McCormick, F. (1997). Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-regulated kinase-dependent and Ca<sup>2+</sup>-dependent signal pathway in Rat-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 13309–13319.

Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239–252.

Denkert, C., Schmitt, W.D., Berger, S., Reles, A., Pest, S., Siegert, A., Lichtenegger, W., Dietel, M., Hauptmann, S. (2002). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *International Journal of Cancer* 102: 507–513.

Dickinson, R.J., Eblaghie, M.C., Keyse, S.M., Morriss-Kay, G.M. (2002). Expression of the ERK-specific MAP kinase phosphatase PYST1/MKP3 in mouse embryos during morphogenesis and early organogenesis. *Mechanisms of Development* 113: 193–196.

Dowd, S., Sneddon, A.A., Keyse, S.M. (1998). Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *The Journal of Cell Science* 111: 3389–3399.

Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J., Saltiel, A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 7686–7689.

Duff, J.L., Monia, B.P., Berk, B.C. (1995). Mitogen-activated protein kinase is regulated by the MAP kinase phosphatase (MKP-1) in vascular smooth muscle cells. Effect of actinomycin D and antisense oligonucleotides. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 7161–7166.

Dumaz, N., Light, Y., Marais, R. (2002). Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Journal of Molecular Cell Biology* 22: 3717–3728.

Eisenmann, K.M., VanBrocklin, M.W., Staffend, N.A., Kitchen, S.M., Koo, H.M. (2003). Mitogen-activated protein kinase pathway-dependent tumor-specific

survival signaling in melanoma cells through inactivation of the proapoptotic protein bad. *Cancer Research* 63: 8330–8337.

Eto, M., Senba, S., Morita, F., Yazawa, M. (1997). Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Letters* 410: 356–360.

Evan, G., Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281: 1317–1322.

Foulkes, J.G., Cohen, P. (1980). The regulation of glycogen metabolism. Purification and properties of protein phosphatase inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry* 105: 195–203.

Fürst, R., Brueckl, C., Kuebler, W.M., Zahler, S., Krötz, F., Görlach, A., Vollmar, A.M., Kiemer, A.K. (2005). Atrial natriuretic peptide induces mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human endothelial cells via Rac1 and NAD(P)H oxidase/Nox2-activation. *Circulation Research* 96: 43-53.

Gille, H., Sharrocks, A.D., Shaw, P.E. (1992). Phosphorylation of transcriptional factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358: 414–417.

Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H., Shaw, P.E. (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1 mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO Journal* 14: 951–962.

Gonzalez, F.A., Seth, A., Raden, D.L., Bowman, D.S., Fay, F.S., Davis, R.J. (1993). Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *Journal of Cell Biology* 122: 1089–1101.

Groom, L.A., Sneddon, A.A., Alessi, D.R., Dowd, S., Keyse, S.M. (1996). Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytoplasmic dual-specificity phosphatase. *EMBO Journal* 15: 3621-3632.

Guan, K.L., Butch, E. (1995). Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH2, which selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 270: 7197-203.

Hanahan, D. Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353–364.

Hewer, R.C., Sala-Newby, G.B., Wu, Y.J., Newby, A.C., Bond, M. (2011). PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50: 87-98.

Hill, C.S., Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80: 199–211.

Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Arii, S., Wada, H., Fujimoto, J., Kohno, M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18: 813–822.

Hubbard, M.J., Cohen, P. (1993). On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends in Biochemical Sciences* 18: 172-177.

Indolfi, C., Avvedimento, E.V., Di Lorenzo, E., Esposito, G., Rapacciuolo, A., Giuliano, P., Grieco, D., Cavuto, L., Stingone, A.M., Ciullo, I., Condorelli, G., Chiariello, M. (1997). Activation of cAMP-PKA signaling *in vivo* inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nature Medicine* 3: 775-779.

Ingebritsen, T.S., Cohen, P. (1983). The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *European Journal of Biochemistry* 132: 255–261.

Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., Kornfeld, K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & Development* 13: 163-175.

Janssens, V., Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal* 353: 417–439.

Jaumot, M., Hancock, J.F. (2001) Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20: 3949–3958.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. (2010). Cancer statistics. *A Cancer Journal for Clinicians* 60: 277-300.

Ji, Y., Chen, S., Li, K., Xiao, X., Zheng, S., Xu, T. (2013). The role of  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in the proliferation of hemangioma-derived endothelial cells. *Cell Division* 8: 1-11.

Johnson, G.L., Wolfe, B.B., Harden, T.K., Molinoff, P.B., Perkins, J.P. (1978). Role of beta-adrenergic receptors in catecholamine-induced desensitization of adenylate cyclase in human astrocytoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 253: 1472-1480.

Johnson, J.P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Review* 10: 11–22.

Johnson, G.L. (1997). Signal transduction abnormalities in cancer mitogen-activated protein kinase regulation is altered in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation* 99: 1463–1464.

Kassel, O., Sancono, A., Krätzschar, J., Kreft, B., Stassen, M., Cato, A.C. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO Journal* 20: 7108-7116.

Kawakami, Y., Rodriguez-Leon, J., Koth, C.M., Buscher, D., Itoh, T., Raya, A., Ng, J.K., Esteban, C.R., Takahashi, S., Henrique, D., Schwarz, M.F., Asahara, H., Izpisua, Belmonte, J.C. (2003). MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nature Cell Biology* 5: 513–519.

Keiper, M., Stope, M.B., Szatkowski, D., Böhm, A., Tysack, K., Vom Dorp, F., Saur, O., Oude Weernink, P.A., Evellin, S., Jakobs, K.H., Schmidt, M. (2004). Epac- and Ca<sup>2+</sup> - controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by Gs-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry* 279: 46497-46508.

Keyse, S.M., Emslie, E.A. (1992). Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. *Nature* 359: 644–647.

Kondoh, K., Nishida, E. (2007). Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 1227–1237.

Kwak, S.P., Dixon, J.E. (1995). Multiple dual specificity protein tyrosine phosphatases are expressed and regulated differentially in liver cell lines. *Journal of Biological Chemistry* 270: 1156-60.

Lau, L. F., Nathans, D. (1987). Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: Coordinate regulation with c-fos or c-myc *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 1182-1186.

Lee, S.H., Lee, J.W., Soung, Y.H., Kim, S.Y., Nam, S.W., Park, W.S., Kim, S.H., Yoo, N.J., Lee, J.Y. (2004). Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS* 112: 233–238.

Lefkowitz, R. J., Hamp, M. (1977). Comparison of specificity of agonist and antagonist radioligand binding to beta adrenergic receptors. *Nature* 268:453-454.

Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain Brunet, A., Poussegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases but not of their activator MAP kinase in fibroblast. *Journal of Cell Biology* 122: 1079–1088.

Levitcki, A. (1988). From epinephrine to cyclic AMP. *Science* 241: 800-806.

Li, H., Zhao, L.L., Funder, J.W., Liu, J.P. (1997). Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 272: 16729-16732.

Liao, Q., Guo, J., Kleeff, J., Zimmermann, A., Büchler, M.W., Korc, M., Friess, H. (2003). Down-regulation of the dual-specificity phosphatase MKP-1 suppresses tumorigenicity of pancreatic cancer cells. *Gastroenterology* 124: 1830–1845.

Liggett, S.B., Lefkowitz, R.J. (1993). Adrenergic receptor-coupled adenylyl cyclase systems: regulation of receptor function by phosphorylation, sequestration and downregulation. In *Regulation of Cellular Signal Transduction Pathways by Desensitization and Amplification*; (ed. D. Sibley and M. Houslay), pp. 71–97. John Wiley & Sons: London: UK.

Liu, Q.R., Zhang, P.W., Lin, Z., Li, Q.F., Woods, A.S., Troncoso, J., Uhl, G.R. (2004). GBPI, a novel gastrointestinal- and brain-specific PP1-inhibitory protein, is activated by PKC and inactivated by PKA. *Biochemical Journal* 377: 171-181.

Loda, M., Capodici, P., Mishra, R., Yao, H., Corless, C., Grigioni, W., Wang, Y., Magi-Galluzzi, C., Stork, P.J. (1996). Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the early phases of human epithelial carcinogenesis. *American Journal of Pathology* 149: 1553–1564.

Lohse, M.J., Engelhardt, S., Danner, S., Böhm, M. (1996). Mechanisms of  $\beta$ -adrenergic receptor desensitization: from molecular biology to heart failure. *Basic Research in Cardiology* 91: 29-34.

Lorca, T., Labbé, J.C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J.P., Cavadore, J.C., Le Bouffant, F., Dorée, M. (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *EMBO Journal* 11: 2381-2390.

Madden, K.S., Szpunar, M.J., Brown, E.B. (2011).  $\beta$ -Adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high  $\beta$ -AR-expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment* 130: 747-758.

Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80: 179–185.

McKenzie, F.R., Pouyssegur, J. (1996). cAMP-mediated growth inhibition in fibroblasts is not mediated via mitogen-activated protein (MAP) kinase (ERK) inhibition. cAMP-dependent protein kinase induces a temporal shift in growth factor-stimulated MAP kinases. *Journal of Biological Chemistry* 271: 13476–13483.

Molina, G., Vogt, A., Bakan, A., Dai, W., Queiroz de Oliveira, P., Znosko, W., Smithgall, T.E., Bahar, I., Lazo, J.S., Day, B.W., Tsang, M. (2009). Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages. *Nature Chemical Biology* 5: 680-687.

Muda, M., Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., Davies, K., Ashworth, A., Arkinstall, S. (1996). The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* 271: 27205–27208.

Muda, M., Boschert, U., Smith, A., Antonsson, B., Gillieron, C., Chabert, C., Camps, M., Martinou, I., Ashworth, A., Arkinstall, S. (1997). Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *Journal of Biological Chemistry* 272: 5141-5151.

Muda, M., Theodosiou, A., Gillieron, C., Smith, A., Chabert, C., Camps, M., Boschert, U., Rodrigues, N., Davies, K., Ashworth, A., Arkinstall, S. (1998). The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity. *Journal of Biological Chemistry* 273: 9323–9329.

Murphy, L.O., Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences* 31: 268–275.

Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kinoshita, T., Akira, S. (1993). Phosphorylation of threonine-235 by a *ras*-dependent mitogen activated protein cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 2207–2211.

Neve, R., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P.T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N.J., Kuo, W.L., Stilwell, J.L., Pinke, D., Albertson, D.G., Waldman, F.M., McCormick, F., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lippman, M., Ethier, S., Gazdar, A., Gray, J.W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10: 515–527.

Nimmo, G.A., Cohen, P. (1978). The regulation of glycogen metabolism. Phosphorylation of inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle, and its interaction with protein phosphatases-III and -II. *European journal of biochemistry* 87: 353–365.

Nishida, E., Gotoh, Y. (1993). The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends in Biochemical Sciences* 18: 128–131.

Peti, W., Nairn, A.C., Page, R. (2013). Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *FEBS Journal* 280: 596–611.

Pinero, P., Bruzzone, A., Sarappa, M.G., Castillo, L.F., Lüthy, I.A. (2012). Involvement of  $\alpha 2$ - and  $\beta 2$ -adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. *British Journal of Pharmacology* 166: 721–736.

Plummer, R. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: a new direction for BRCA and triple-negative breast cancer? *Breast Cancer Research* 13: 218.

Pouyssegur, J., Lenormand, P. (2003). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *European Journal of Biochemistry* 270: 3291–3299.

- Rauhala, H.E., Porkka, K.P., Tolonen, T.T., Martikainen, P.M., Tammela, T.L., Visakorpi, T. (2005). Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer. *International Journal of Cancer* 117: 738–745.
- Re, G., Badino, P., Girardi, C., Di Carlo, F. (1992). Effects of a  $\beta_2$ -agonist, clenbuterol, on cultured human (CG-5) breast cancer cells. *Pharmacological Research* 26: 377–384.
- Rich, T.C., Fagan, K.A., Tse, T.E., Schaack, J., Cooper, D.M., Karpen, J.W. (2001). A uniform extracellular stimulus triggers distinct cAMP signals in different compartments of a simple cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 13049–13054.
- Rigas, J.D., Hoff, R.H., Rice, A.E., Hengge, A.C., Denu, J.M. (2001). Transition state analysis and requirement of Asp-262 general acid/base catalyst for full activation of dualspecificity phosphatase MKP3 by extracellular regulated kinase. *Biochemistry* 40: 4398–4406.
- Robinson, M.J., Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Cell Biology* 9: 180–186.
- Rohan, P.J., Davis, P., Moskaluk, C.A., Kearns, M., Krutzsch, H., Siebenlist, U., Kelly, K. (1993). PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science* 259: 1763-1766.
- Schliess, F., Kurz, A.K., Häussinger, D. (2000). Glucagon-induced expression of the MAP kinase phosphatase MKP-1 in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 118: 929-936.
- Schmitt, J.M., Stork, P.J. (2001). Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. *Molecular Cell Biology* 21: 3671–3683.
- Schmitt, J.M., Stork, P.J. (2002). PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Molecular Cell* 9: 85–94.

Sebolt-Leopold, J.S., Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Cancer Reviews* 4: 937-947.

Seddighzadeh, M., Zhou, J.N., Kronenwett, U., Shoshan, M.C., Auer, G., Sten-Linder, M., Wiman, B., Linder, S. (1999). ERK signalling in metastatic human MDA-MB-231 breast carcinoma cells is adapted to obtain high urokinase expression and rapid cell proliferation. *Clinical & Experimental Metastasis* 17: 649-654.

Sevetson, B.R., Kong, X., Lawrence, J.C.Jr. (1993). Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 10305–10309.

Shi, Y. (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139: 468-484.

Slack, D.N., Seternes, O.M., Gabrielsen, M., Keyse, S.M. (2001). Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *Journal of Biological Chemistry* 276: 16491–16500.

Slotkin, T.A., Whitmore, W.L., Orband-Miller, L., Queen, K.L., Haim, K. (1987). Beta adrenergic control of macromolecule synthesis in neonatal rat heart, kidney and lung: relationship to sympathetic neuronal development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 243:101–109.

Slotkin, T.A., Zhang, J., Dancel, R., Garcia, S.J., Willis, C., Seidler, F.J. (2000). Beta adrenoceptor signaling and its control of cell replication in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 60: 153–166.

Small, G.W., Shi, Y.Y., Edmund, N.A., Somasundaram, S., Moore, D.T., Orlowski, R.Z. (2004). Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Molecular Pharmacology* 66: 1478-90.

- Sontag, E., Fedorov, S., Kamibayashi, C., Robbins, D., Cobb, M., Mumby, M. (1993). The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 75: 887-897.
- Srikanth, S., Franklin, C.C., Duke, R.C., Kraft, A.S. (1999). Human DU145 prostate cancer cells overexpressing mitogenactivated protein kinase phosphatase-1 are resistant to Fas ligandinduced mitochondrial perturbations and cellular apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 199: 169–178.
- Steinberg, S.F., Brunton, L.L. (2001). Compartmentation of G protein-coupled signaling pathways in cardiac myocytes. *The Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41: 751–773.
- Stewart, A.E., Dowd, S., Keyse, S.M., McDonald, N.Q. (1999). Crystal structure of the MAPK phosphatase Pyst1 catalytic domain and implications for regulated activation. *Nature Structural & Molecular Biology* 6: 174–181.
- Strebhardt, K., Ullrich, A. (2006). Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 6: 321-330.
- Sturgill, T.W., Wu, J. (1991). Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochimica et Biophysica Acta* 1092: 350–357.
- Subramaniam, S., Unsicker, K. (2010). ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS Journal* 277: 22-29.
- Sugimoto, T., Stewart, S., Guan, K.L. (1997). The calcium-calmodulin dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 272: 29415–29418.
- Sun, H., Charles, C.H., Lau, L.F., Tonks, N.K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase *in vivo*. *Cell* 75: 487–493.

Sunahara, R.K., Taussig, R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Molecular Interventions* 2: 168–184.

Tan, X., Egami, H., Ishikawa, S., Kurizaki, T., Tamori, Y., Takai, E., Hirota, M., Ogawa, M. (2004). Relationship between the expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and the dissociation of pancreatic cancer cells: involvement of ERK1/2 in the dissociation status of cancer cells. *International Journal of Oncology* 24: 815–820.

Tanoue, T., Moriguchi, T., Nishida, E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *Journal of Biological Chemistry* 274: 19949-19956.

Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* 2: 110–116.

Tanoue, T., Yamamoto, T., Maeda, R., Nishida, E. (2001a). A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *Journal of Biological Chemistry* 276: 26629-26639.

Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., Nishida, E. (2001b). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO Journal* 20: 466–479.

Teixeiro, E., Daniels, M.A. (2010). ERK and cell death: ERK location and T cell selection. *FEBS Journal* 277: 30-38.

Theodosiou, A.M., Rodrigues, N.R., Nesbit, M.A., Ambrose, H.J., Paterson, H., McLellan-Arnold, E., Boyd, Y., Leversha, M.A., Owen, N., Blake, D.J., Ashworth, A., Davies, K.E. (1996). A member of the MAP kinase phosphatase gene family in mouse containing a complex trinucleotide repeat in the coding region. *Human Molecular Genetics* 5: 675-684.

Theodosiou, A., Ashworth, A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biology* 3: 3009-3010.

Tsang, M., Maegawa, S., Kiang, A., Habas, R., Weinberg, E., Dawid, I.B. (2004). A role for MKP3 in axial patterning of the zebrafish embryo. *Development* 131: 2769–2779.

Tsujita, E., Taketomi, A., Gion, T., Kuroda, Y., Endo, K., Watanabe, A., Nakashima, H., Aishima, S., Kohnoe, S., Maehara, Y. (2005). Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 69: 342–347.

Ugi, S., Imamura, T., Ricketts, W., Olefsky, J.M. (2002). Protein phosphatase 2A forms a molecular complex with Shc and regulates Shc tyrosine phosphorylation and downstream mitogenic signaling. *Molecular and Cellular Biology* 22: 2375-2387.

Vandewalle, B., Revillion, F., Lefebvre, J. (1990). Functional beta-adrenergic receptors in breast cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 116: 303-306.

Vernadakis, A., Gibson, D.A. (1974). Role of neurotransmitter substances in neural growth. In: *Perinatal Pharmacology: Problems and Priorities* (ed. J. Dancis and J.C. Hwang), pp 65–76. Raven Press: New York.

Vicent, S., Garayoa, M., Lopez-Picazo, J.M., Lozano, M.D., Toledo, G., Thunnissen, F.B., Manzano, R.G, Montuenga, L.M. (2004). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clinical Cancer Research* 10: 3639–3649.

Walaas, S.I., Greengard, P. (1991). Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacological Reviews* 43: 299–349.

Wang, H.Y., Cheng, Z., Malbon, C.C. (2003). Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer Letters* 191: 229–237.

Waskiewicz, A.J., Cooper, J.A. (1995). Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Cell Biology* 7: 798–805.

Wayne, J., Sielski, J., Rizvi, A., Georges, K., Hutter, D. (2006). ERK regulation upon contact inhibition in fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 28: 181-189.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* 79: 143–180.

Wright, W.E., Pereira-Smith, O.M., Shay, J.W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 9: 3088–3092.

Wu, J.J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M.J., Sturgill, T.W. (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262: 1065–1069.

Wu, J.J., Lau, L.F., Sturgill, T.W. (1994). Rapid deactivation of MAP kinase in PC12 cells occurs independently of induction of phosphatase MKP-1. *FEBS Letters* 353: 9–12.

Wu, J.J., Bennett, A.M. (2005). Essential role for MAP kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *Journal of Biological Chemistry* 280: 16461–16466.

Wu, J.J., Zhang, L., Bennett, A.M. (2005a). The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation. *Molecular and Cellular Biology* 25: 4792–4803.

Wu, W., Pew, T., Zou, M., Pang, D., Conzen, S.D. (2005b). Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated

MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *Journal of Biological Chemistry* 280: 4117-4124.

Wu, J.Q., Guo, J.Y., Tang, W., Yang, C.S., Freel, C.D., Chen, C., Nairn, A.C., Kornbluth, S. (2009). PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation. *Nature Cell Biology* 11: 644-651.

Yaglom, J., O'Callaghan-Sunol, C., Gabai, V., Sherman, M.Y. (2003). Inactivation of dual-specificity phosphatases is involved in the regulation of extracellular signal-regulated kinases by heat shock and hsp72. *Molecular and Cellular Biology* 23: 3813-3824.

Yamaguchi, T., Nagao, S., Wallace, D.P., Belibi, F.A., Cowley, B.D., Pelling, J.C., Grantham, J.J. (2003). Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Kidney International* 63: 1983-1994.

Yamashiro, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G., Goto, H., Kaibuchi, K., Ito, M., Hartshorne, D.J., Matsumura, F. (2008). Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Developmental Cell* 14: 787-797.

Yamazaki, T., Komuro, I., Zou, Y., Kudoh, S., Shiojima, I., Hiroi, Y., Mizuno, T., Aikawa, R., Takano, H., Yazaki, Y. (1997). Norepinephrine induces the raf-1 kinase/mitogen-activated protein kinase cascade through both alpha 1- and beta-adrenoceptors. *Circulation* 95: 1260-1268.

Yang, J., Guzman, R., Richards, J., Imagawa, W., McCormick, K., Nandi, S. (1980). Growth factor- and cyclic nucleotide-induced proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells in primary culture. *Endocrinology* 107: 35-41.

Zayzafoon, M., Abdulkadir, S.A, McDonald, J.M. (2004). Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines. *Journal of Biological Chemistry* 279: 3662–3670

Zheng, C.F., Guan, K.L. (1993). Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 268: 16116–16119.

Zheng, C.F., Guan, K.L. (1994). Cytoplasmic localization of mitogenactivated protein kinase activator MEK. *Journal of Biological Chemistry* 269: 19947–19952.

Zhou, B., Zhang, Z.Y. (1999). Mechanism of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 activation by ERK2. *Journal of Biological Chemistry* 274: 35526–35534.

Zhou, J.Y., Liu, Y., Wu, G.S. (2006). The role of mitogen activated protein kinase phosphatase-1 in oxidative damage induced cell death. *Cancer Research*. 66: 4888–4894.

Zinck, R., Hipskind, R.A., Pingoud, V., Nordheim, A. (1993). c-fos transcriptional activation and repression correlate temporally with the phosphorylation status of TCF. *EMBO Journal* 12: 2377-2387.

## EKLER

### EK1. Çalışmada kullanılan Kimyasal Maddeler

| Madde adı                            | Firma                 | Katalog No |
|--------------------------------------|-----------------------|------------|
| Anti-DUSP1/MKP1 mAb                  | Santa Cruz            | sc-1102    |
| Anti-DUSP6/MKP3 mAb                  | Santa Cruz            | sc-377070  |
| Anti-p-DUSP1/MKP1 Rabbit mAb         | Cell Signaling        | 2857       |
| Anti-ERK 2 rabbit polyclonal İgG     | Santa Cruz            | sc-154     |
| Anti-p-ERK 1/2 rabbit polyclonal İgG | Santa Cruz            | sc-16982   |
| Anti-PP2A-alpha (phospho Y307)       | Abcam                 | ab32104    |
| Anti-PPP1A (phospho T320) antibody   | Abcam                 | ab62334    |
| Anti-PPP1A antibody                  | Abcam                 | ab137512   |
| Anti-PP2A alpha + beta antibody      | Abcam                 | ab32141    |
| BCİ                                  | Sigma                 | 6514       |
| Calyculin A                          | Cell Signaling        | 9902S      |
| DMEM                                 | Sigma                 | D-8437     |
| Donkey anti-mouse IgG-HRP            | Santa Cruz            | sc-2314    |
| Epinefrin                            | Sigma                 | E4375      |
| Forskolin                            | Sigma                 | F6886      |
| Fötal Sığır Serumı                   | Biological Industries | 04-007-1B  |

|                                  |                             |                |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------|
| GAPDH                            | Santa Cruz                  | sc-25778       |
| Goat anti-rabbit İgG-HRP         | Santa Cruz                  | sc-2004        |
| H89                              | Sigma                       | B1427          |
| ICI-118,551                      | Hidroklorid Tocris          | 0821           |
| İzoproterenol Hidroklorür        | Sigma                       | I6504          |
| Clenbuterol                      | Tocris                      | 0688           |
| Pertussis Toxin                  | Sigma                       | sc-2048        |
| Proteaz inhibitör kokteyli       | Roche                       | 11-697-498-001 |
| Revert Aid cDNA Synthesis Kit    | ThermoFisher Scientific Inc | K1621          |
| Terbutalin hemisülfat            | Sigma                       | T2528          |
| Western Blotting Luminol Reagent | Biorad                      | 1705060        |
| WST-1                            | Roche                       | 05015944001    |