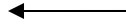


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra eğer basılacak ise yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**AKT1 VE CTNNB1 GEN MUTASYONLARININ TAKSAN
GRUBU İLAÇ DİRENCİ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

GÜLSÜM ALTIPARMAK ÜLBEGİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. PINAR AKSOY SAĞIRLI**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gölsüm ALTIPARMAK ÖLBEGİ

İTHAF

Eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca sabır ve ilgiyle danışmanlığımı yürüten ve üzerimde emeği büyük olan, tüm bilgi birikimini ve tecrübelerini benimle her daim paylaşan, tez süreci boyunca karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımcı olan ve bana yol gösteren sevgili hocam Prof.Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI'ya,

Tez sürecinde bana vakit ayıran ve fikirlerini benimle paylaşan, Tez İzleme Komitesi üyesi değerli hocalarım; Prof.Dr. Semra Doğru ABBASOĞLU'na, Doç.Dr. Özlem KURT ŞİRİN'e ve eski Tez İzleme Komitesi Üyesi emekli hocam Prof.Dr. Nuriye AKEV'e,

Gerek Lisansüstü eğitim hayatım gerek ise tez süreci boyunca bilgileri, tecrübeleri ve yardımlarıyla bana katkı sağlayan Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı emekli öğretim üyeleri; Prof. Dr. Ayşe CAN'a ve Prof.Dr. Nurten ÖZSOY'a, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üye ve yardımcıları Prof.Dr. Tuğba YILMAZ ÖZDEN'e, Dr.Öğr. Üyesi Gözde HASBAL'a ve Arş.Gör. Gülşah Gamze ARCAN'a,

Tez sürecindeki yardımlarından dolayı, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Ahmet Olcay SAĞIRLI'ya ve Öğr.Gör.Dr. Aykut KUL'a,

Bugünlere gelmemde payı büyük olan, beni koşulsuz seven ve destekleyen aileme,

Varlığıyla bana her daim güç veren ve attığım her adımda beni destekleyen, beni koşulsuz seven, sevgili eşim Osman Burak ÜLBEGİ'ye,

Doktora öğrenimimde Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından “TÜBİTAK-BİDEB 2228-B Yüksek Lisans Öğrencileri İçin Doktora Burs Programı” kapsamında desteklendiğim için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30153.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	İİ
İTHAF	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Meme Kanseri	4
2.1.1. Meme Kanseri Türleri	5
2.1.2. Meme Kanseri Karsinogenezi	7
2.1.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri.....	10
2.1.4. Meme Kanserinin Belirtileri, Teşhisi ve Evrelemesi	12
2.1.5. Meme Kanserinin Tedavisi.....	14
2.2. Yumurtalık Kanseri	15
2.2.1. Yumurtalık Kanserinin Histolojik Alt Tipleri	16
2.2.2. Epitelyal Yumurtalık Kanseri Karsinogenezi.....	18
2.2.3. Yumurtalık Kanseri Risk Faktörleri.....	19
2.2.4. Yumurtalık Kanseri Belirtileri, Teşhisi ve Evrelemesi	22
2.2.5. Yumurtalık Kanseri Tedavisi.....	23
2.3. Paklitaksel	24
2.3.1. Paklitakselin Yapısı.....	25
2.3.2. Paklitakselin Yan Etkileri.....	27
2.3.3. Paklitakselin Farmakokinetiği	27
2.3.4. Paklitakselin Etki Mekanizması	28
2.3.4.1. Mikrotübül Stabilizasyonu.....	28
2.3.4.2. Apoptozun İndüksiyonu	30

2.3.4.3. Epigenetik Düzenleme.....	33
2.3.4.4. İmmün Sistem Aktivasyonu.....	34
2.4. Kanserde İlaç Direnci	34
2.4.1. Tümör Yüğü ve Büyüme Kinetiğı	36
2.4.2. Tümör Heterojenitesi	36
2.4.3. İlaç Taşınımı ve Metabolizması.....	37
2.4.3.1. İlaç İnaktivasyonu	37
2.4.3.2. İlaç Dışa Atımı	38
2.4.4. DNA Hasar Onarımı	39
2.4.5. İlaç Hedefindeki Değışiklikler.....	39
2.4.6. Akış Aşağı Direnç Mekanizmaları.....	40
2.4.6.1. İlaça Bağlı Apoptozdan Kaçınma	40
2.4.6.2. Otofaji.....	41
2.4.7. Direnci Teşvik Edici Adaptif Cevaplar	41
2.4.7.1. Hayatta Kalma Sinyalinin Aktivasyonu	41
2.4.7.2. Onkojenik “Baypas” ve Sinyal Yolunun Aşırı Aktivasyonu.....	42
2.4.8. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş	42
2.4.9. Tümör Mikro Çevresi.....	43
2.5. Kanserde Paklitaksel Direnci	43
2.5.1. P-Glikoprotein	44
2.5.2. Mikrotübül Elemanları	44
2.5.3. Fosfatidilinositol 3-Kinaz/Protein Kinaz B (PI3K/AKT) Yolu.....	45
2.5.4. B hücreli Lenfoma 2 (BCL-2) Ailesi	45
2.5.5. p53.....	46
2.5.6. Glutasyon Aracılı Detoksifikasyon	46
2.5.7. Otofaji.....	47
2.5.8. Diğer Direnç Mekanizmalarına Örnekler	48
2.6. Kanonikal WNT Sinyal Yolu	48
2.6.1. WNT Sinyali Yokluğunda.....	50
2.6.2. WNT Sinyali Varlığında	51
2.6.3. Kanserde Anormal WNT/ β -katenin Sinyal Yolu.....	53
2.7. PI3K/AKT Sinyal Yolu.....	55
2.7.1. AKT1 Tarafından Düzenlenen Hücresel Süreçler	58

2.7.2. Kanserde PI3K/AKT Sinyal Yolu	60
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	61
3.1. Kullanılan Kimyasallar	61
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	63
3.3. Kullanılan Yöntemler	64
3.3.1. Alan Hedefli Mutajenez	64
3.3.1.1. Primelerin Tasarlanması	65
3.3.1.2. Mutant Zincir Sentez Reaksiyonları.....	66
3.3.1.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Dpn I Enzimi ile Kesimi	66
3.3.2. pCMV6 Vektörlerinin <i>Escherichia coli</i> Hücrelerine Tranformasyonu	67
3.3.3. Mini Kit ile Plazmid DNA İzolasyonu.....	68
3.3.4. Dizi Analizi.....	70
3.3.5. Maxi Kit ile Plazmid DNA İzolasyonu	70
3.3.6. Hücre Kültürü	71
3.3.6.1. Hücrelerin Çoğaltılması.....	72
3.3.6.2. Hücrelerin Pasajlanması	73
3.3.6.3. Hücrelerin Stoklanması	73
3.3.7. Transfeksiyon	74
3.3.8. MTS Hücre Canlılık Deneyi.....	75
3.3.9. Western Blot Analizi.....	78
3.3.9.1. Hücre Lizatı Elde Edilmesi.....	78
3.3.9.2. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Miktar Tayini.....	79
3.3.9.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	80
3.3.9.4. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi (Blotlama)	80
3.3.9.5. Membranın Bloklanması	81
3.3.9.6. Membrana Birincil Antikörün Bağlanması	81
3.3.9.7. Membrana Sekonder Antikörün Bağlanması.....	82
3.3.9.8. Kemilüminesans Substrat ile İnkübasyon ve Görüntüleme	82
3.3.9.9. Antikorların Membrandan Ayrılması.....	82
3.3.10. İstatistiksel Analiz.....	84
4. BULGULAR	85
4.1. Mini Kit ile İzole Edilen Plazmid DNA'lar	85
4.2. Dizi Analizi	85

4.3. Maxi Kit ile İzole Edilen Plazmid DNA'lar	86
4.4. Western Blot Analizi	86
4.5. MCF-7 Hücrelerinde <i>AKT1</i> ve <i>CTTNB1</i> Mutasyonlarının Paklitaksel Direnci Üzerine Etkisi.....	90
4.5.1. MCF-7 Hücrelerinde <i>AKT1</i> WT ve Mutasyonlarının Paklitaksel Direnci Üzerine Etkisi	90
4.5.2. MCF-7 Hücrelerinde <i>CTNNB1</i> Mutasyonları ve Paklitaksel Direnci.....	93
4.6. MDA-MB-231 Hücrelerinde <i>AKT1</i> ve <i>CTTNB1</i> Mutasyonlarının İlaç Direncine Etkisi.....	99
4.6.1. MDA-MB-231 Hücrelerinde <i>AKT1</i> Mutasyonları ve Paklitaksel Direnci.....	99
4.6.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde <i>CTNNB1</i> Mutasyonları ve Paklitaksel Direnci	105
4.7. SKOV-3 Hücrelerinde <i>AKT1</i> ve <i>CTTNB1</i> Mutasyonlarının İlaç Direncine Etkisi	112
4.7.1. SKOV-3 Hücrelerinde <i>AKT1</i> Mutasyonları ve İlaç Direnci.....	112
4.7.2. SKOV-3 Hücrelerinde <i>CTNNB1</i> Mutasyonları ve İlaç Direnci	118
5. TARTIŞMA	124
KAYNAKLAR	136
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	177

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Meme kanserinin üç ana alt tipi-Waks ve Winer, 2019'dan	6
Tablo 2-2: Meme kanseri riski ile ilişkili genler ve fonksiyonları.....	12
Tablo 2-3: Meme kanseri evreleri-Feng ve ark., 2018'den	13
Tablo 2-4: Meme kanserinin sistematik tedavisi-Waks ve Winer, 2019'dan.....	15
Tablo 2-5: Yumurtalık kanserinin histolojik sınıflaması-Stewart ve ark., 2019'dan.....	17
Tablo 2-6: Epitelyal yumurtalık kanseri ile ilişkili genler-Jayson ve ark., 2014'den	19
Tablo 2-7: Yumurtalık kanserinde yaygın olarak mutasyona uğrayan genler-Matulongis ve ark., 2016'dan.....	21
Tablo 2-8: Yumurtalık kanseri evreleri (FIGO)-Heintz ve ark., 2006'dan	23
Tablo 2-9: Yumurtalık kanserinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlar-Stewart ve ark., 2019'dan	24
Tablo 2-10: Bazı <i>CTNNB1</i> mutasyonları ve bu mutasyonların etkileri	54
Tablo 2-11: AKT tarafından düzenlenen hücresel süreçler-Vara ve ark, 2004'den	59
Tablo 2-12: AKT1 aktivasyon artışına neden olan bazı yanlış anlamalı mutasyonlar	60
Tablo 3-1: <i>AKT1</i> ve <i>CTNNB1</i> gen mutasyonları için alan hedefli mutajenez primerleri	65
Tablo 3-2: PZR koşulları	66
Tablo 3-3: Hücre serilerinin karakteristik özellikleri	72
Tablo 4-1: Plazmid DNA konsantrasyonları ve saflıkları (Mini kit)	85
Tablo 4-2: Plazmid DNA konsantrasyonları ve saflıkları (Maxi kit).....	86
Tablo 4-3: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat)	91
Tablo 4-4: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat).....	93
Tablo 4-5: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat).....	95
Tablo 4-6: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat).....	97
Tablo 4-7: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat).....	99
Tablo 4-8: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat).....	101
Tablo 4-9: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat).....	103
Tablo 4-10: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat).....	106
Tablo 4-11: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat).....	108
Tablo 4-12: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat).....	110
Tablo 4-13: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat).....	112
Tablo 4-14: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat).....	114
Tablo 4-15: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat).....	116

Tablo 4-16: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat).....	118
Tablo 4-17: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat).....	120
Tablo 4-18: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat).....	122



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Memenin anatomisi-Bazira ve ark., 2022'den.	4
Şekil 2-2: Meme karsinogenezi teorileri. (A) kök hücre teorisi; (B) stokastik teori-Sun ve ark., 2017'den.	8
Şekil 2-3: ER sinyali-Tokunaga ve ark., 2014'den.	9
Şekil 2-4: HER2 sinyali-Feng ve ark., 2018'den.	10
Şekil 2-5: Yumurtalıkların vücuttaki yerleşimi	16
Şekil 2-6: Epitelyal yumurtalık kanserinin histolojik alt tipleri-Cho ve Shih, 2019'dan.	17
Şekil 2-7: Yumurtalık kanserinin patajenez yolları-Hirst ve ark. 2018'den	18
Şekil 2-8: Paklitakselin yapısı.	25
Şekil 2-9: Paklitaksel ve türevlerinin yapı-aktivite ilişkisi-Cao ve ark., 2018'den.	26
Şekil 2-10: Paklitakselin metabolizması- Johnson ve ark., 2023'ten.	28
Şekil 2-11: Mikrotübül yapısı ve dinamikleri-Wang ve ark., 2023'den.	29
Şekil 2-12: Paklitakselin mikrotübül oluşumu üzerine etkisi-Škubník ve ark., 2021'dan	30
Şekil 2-13: Paklitakselin etki mekanizması-Abu Samaan ve ark., 2019'dan.	31
Şekil 2-14: Paklitakselin P13K/AKT yolu üzerinden apoptozu indüklemesi-Zhao ve ark., 2022'den.	33
Şekil 2-15: İlaç direncinin genel prensipleri- Holohan ve ark., 2013'ten.	35
Şekil 2-16: İlaç direncini etkileyen alt faktörlerin özeti- Holohan ve ark., 2013'ten.	35
Şekil 2-17: Paklitaksel direnci ile ilişkili mekanizmalar-Ortiz ve ark., 2022'den.	44
Şekil 2-18: Paklitakselin iki farklı yolla otofajiyi inhibe etmesi- Veldhoen ve ark., 2013'den.	47
Şekil 2-19: β -kateninin primer yapısı ve bağlanma bölgeleri-Gao ve ark., 2018'den	50
Şekil 2-20: WNT/ β -katenin sinyal yolunun inaktivasyonu-Gao ve ark., 2018'den.	51
Şekil 2-21: WNT/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonu-Gao ve ark., 2018'den.	52
Şekil 2-22: WNT/ β -katenin sinyalinin kanser patofizyolojizinde etkilediği temel alanlar-Lecarpentier ve ark., 2019'dan.	53
Şekil 2-23: PI3K aktivasyonu-Asproni ve ark., 2021'den.	56
Şekil 2-24: AKT izoformlarının yapısı-Chautard ve ark., 2014'den.	57
Şekil 2-25: AKT'nin aktivasyonu ve hücreSEL süreçlerdeki rolü- Vidal ve ark., 2022'den.	58
Şekil 3-1: Boş pCMV6 vektörü, <i>AKT1</i> ve <i>CTNNB1</i> genlerini taşıyan pCMV6 vektörleri	65
Şekil 3-2: Alan hedefli mutajenez (Walquist ve El-Gewely, 2018).	67
Şekil 3-3: Hücre serilerinin yüksek yoğunluktaki mikroskop görüntüleri	72
Şekil 3-4: Nükleik asitin hücreye geçici transfeksiyonu-Fus Kujawa ve ark., 2021'den.	74
Şekil 3-5: MTS'in formazana indirgenmesi	76
Şekil 3-6: İndirekt Western blot.	78
Şekil 3-7: Sığır serum albumini (BSA) standart eğrisi.	80
Şekil 3-8: Yarı-kuru transfer	81
Şekil 4-1: <i>AKT1</i> E17K, E49K ve L52R mutasyonlarına ait kromatogramlar.	85
Şekil 4-2: <i>CTNNB1</i> S33P, S45F ve T41A mutasyonlarına ait kromatogramlar.	86
Şekil 4-3: MCF-7, MDA-MB-231 ve SKOV-3 hücrelerinde boş vektör ve <i>AKT1</i> WT'ye ait immünoreaktif protein bantları.	87

Şekil 4-4: MCF-7, MDA-MB-231 ve SKOV-3 hücrelerinde boş vektör ve β -katenin WT'ye ait immünoreaktif protein bantları.	87
Şekil 4-5: MCF-7 hücrelerinde AKT1 ve beta-aktin immünoreaktif protein bantları (A) ve AKT1 WT, E17K, E49K ve L52R immünoreaktif protein düzeyleri (B).	88
Şekil 4-6: MCF-7 hücrelerinde β -katenin ve beta-aktin immünoreaktif protein bantları (A) ve β -katenin WT, S33P, S45F ve T41A immünoreaktif protein düzeyleri (B).	88
Şekil 4-7: MDA-MB-231 hücrelerinde AKT1 ve beta-aktin immünoreaktif protein bantları (A) ve AKT1 WT, E17K, E49K ve L52R immünoreaktif protein düzeyleri (B).	89
Şekil 4-8: MDA-MB-231 hücrelerinde β -katenin ve beta-aktin immünoreaktif protein bantları (A) ve β -katenin WT, S33P, S45F ve T41A immünoreaktif protein düzeyleri (B).	89
Şekil 4-9: SKOV-3 hücrelerinde AKT1 ve beta-aktin immünoreaktif protein bantları (A) ve AKT1 WT, E17K, E49K ve L52R immünoreaktif protein düzeyleri (B).	90
Şekil 4-10: SKOV-3 hücrelerinde β -katenin ve beta-aktin immünoreaktif protein bantları (A) ve β -katenin WT, S33P, S45F ve T41A immünoreaktif protein düzeyleri (B).	90
Şekil 4-11: MCF-7 hücrelerinde <i>AKT1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).	92
Şekil 4-12: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).	92
Şekil 4-13: MCF-7 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).	94
Şekil 4-14: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).	94
Şekil 4-15: MCF-7 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).	96
Şekil 4-16: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).	96
Şekil 4-17: MCF-7 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).	98
Şekil 4-18: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).	98
Şekil 4-19: MDA-MB-231 hücrelerinde <i>AKT1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).	100
Şekil 4-20: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).	101
Şekil 4-21: MDA-MB-231 hücrelerinde <i>AKT1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).	102
Şekil 4-22: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).	103
Şekil 4-23: MDA-MB-231 hücrelerinde <i>AKT1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).	104
Şekil 4-24: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).	105
Şekil 4-25: MDA-MB-231 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).	107
Şekil 4-26: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).	107

Şekil 4-27: MDA-MB-231 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).	109
Şekil 4-28: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).	109
Şekil 4-29: MDA-MB-231 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).	111
Şekil 4-30: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).	111
Şekil 4-31: SKOV-3 hücrelerinde <i>AKT1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).	113
Şekil 4-32: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).	113
Şekil 4-33: SKOV-3 hücrelerinde <i>AKT1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).	115
Şekil 4-34: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).	115
Şekil 4-35: SKOV-3 hücrelerinde <i>AKT1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).	117
Şekil 4-36: <i>AKT1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).	117
Şekil 4-37: SKOV-3 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).	119
Şekil 4-38: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).	119
Şekil 4-39: SKOV-3 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).	121
Şekil 4-40: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).	121
Şekil 4-41: SKOV-3 hücrelerinde <i>CTNNB1</i> WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).	123
Şekil 4-42: <i>CTNNB1</i> WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).	123

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABC	: ATP bağlayıcı kaset
AKT1	: V-Akt murin timoma viral onkogen homolog 1
AP-1	: Aktivatör protein 1
APC	: Adenomatosis poliposis koli
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BRCA1/2	: Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini, meme kanseri 1/2
CK1	: Kazein kinaz 1
CTNNB1	: Katenin beta 1
DPBS	: “Dulbecco” fosfatla tamponlanmış tuzlu su
DVL	: “Disheveled” proteini
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörünü
EMEM	: “Eagle's Minimum Essential Medium”
ER	: Östrojen reseptörü
ERE	: Östrojen yanıt elemanları
FBS	: Fetal sıgır serumu
Fz/Fzd	: “Frizzled” reseptörü
GSK-3 β	: Glikojen sentaz kinaz-3 β
HGSC	: Yüksek dereceli seröz karsinomlar
HR	: Hormon reseptörü
HER2	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IC50	: Hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör konsantrasyonu
IGF1-R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü
KD	: Kinaz bölgesi
KRAS	: “Kristen” sıçan sarkoma viral onkogen homolog
LGSC	: Düşük dereceli seröz karsinomlar
LRP5/6	: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüyle ilişkili protein 6/5
MAPK	: Mitojenle aktifleşen protein kinaz
MDR1	: Çoklu ilaç direnç proteini 1
mTOR	: Rapamisinin memeli hedef geni
mTORC1	: Rapamisinin memeli hedef kompleks 1
mTORC2	: Rapamisinin memeli hedef kompleks 2
MTS	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksi fenil)-2-(4-sülfofenil)-2H tetrazolyum
NFB	: Nükleer faktör-B
PCOS	: Polikistik over sendromu
Pgp	: P-glikoproteini
PH	: Plekstrin homoloji
PIP3	: Fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfat

PIP2	: Fosfatidilinozitol 4,5 bisfosfat
PI3-K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PR	: Progesteron reseptörü
PTEN	: Fosfotaz ve tensin homologu
PVDF	: Poliviniliden diflorür
RPMI	: “Roswell Park Memorial Institute”
SP-1	: Özgüllük proteini 1
STAT	: Sinyal dönüştürücüleri ve transkripsiyon aktivatörleri
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
TBS-T	: (Tris Buffered Saline with Tween 20)
TCF/LEF	: T hücresi faktörü/Lenfoid güçlendirici faktör
TNM	: Tümör, nod ve metastaz
WNT	: “Wingless” tip MMTV integrasyon alan ailesi
WT	: Yabani tip (Wild type)

ÖZET

Altıparmak-Ülbeği, G. (2023). AKT1 ve CTNNB1 Gen Mutasyonlarının Taksan Grubu İlaç Direnci ile İlişkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kanser tedavisinde başlıca sınırlayıcı faktör ilaç direncidir. Günümüzde, kanser tedavisinde ilaç direncini ortadan kaldırmak için tek ajanlı tedavi yerine, farklı etki mekanizmalarına sahip ajanlar kombine edilerek kullanılmaktadır. Buna rağmen yine de ilaç direnci gelişebilmektedir. Bunun altında yatan nedenlerden birisi de tedavinin etkinliğini değiştirebilecek spesifik genlerdeki mutasyonlardır. Tedavinin seyri açısından bu spesifik mutasyonların belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Paklitaksel, meme ve yumurtalık kanseri gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan taksan grubu bir kemoterapi ilacıdır ve mutasyonların da dahil olduğu pek çok moleküler değişikliğin paklitaksel direnci ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. PI3K/AKT ve WNT/ β -katenin, hayatta kalma, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, apoptoz, hücre homeostazın sağlanması gibi önemli hücresel süreçlerde rol alan, kanserle ilişkili iki önemli sinyal yoludur ve pek çok kanser türünde bu yolların anormal aktivasyonları görülmektedir. Bu tez projesi kapsamında, PI3K/AKT ve WNT/ β -katenin sinyal yollarının iki önemli bileşeni olan AKT1 ve CTNNB1 genlerinde meydana gelen bazı yanlış anlamlı mutasyonların, meme ve yumurtalık kanserlerinde paklitaksel direncine olan etkileri, *in vitro* olarak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksi fenil)-2-(4-sülfenil)-2H-tetrazolyum (MTS) ve Western Blot yöntemleri kullanılarak ilk kez incelendi. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, AKT1 E17K ve E49K ile CTNNB1 S45F ve T41A mutasyonlarının paklitaksel direncine neden olduğu saptandı. Yine, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde, AKT1 E17K, E49K ve L52R mutasyonlarının paklitaksel direnci ile ilişkili olduğu görülürken, aynı hücre serilerinde CTNNB1 mutasyonlarının paklitaksel direnci ile ilişki olmadığı gözlemlendi. SKOV-3 yumurtalık kanseri hücrelerinde ise, AKT1 ve CTNNB1 mutasyonlarının, paklitaksel cevabında herhangi bir farklılığa neden olmadığı saptandı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, meme kanseri tedavisinde paklitaksel direncine neden olan AKT1 ve CTNNB1 mutasyonlarının, bireye özgü kanser tedavi protokolünün belirlenmesinde birer biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: AKT1, CTNNB1, İlaç Direnci, Meme kanseri, Paklitaksel.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30153.

ABSTRACT

Altıparmak-Ülbeği, G. (2023). Investigation of the Relationship Between AKT1 and CTNNB1 Gene Mutations with Taxane Group Drug Resistance. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biochemistry. Doctorate Thesis. İstanbul.

The main limiting factor in cancer treatment is drug resistance. Today, the agents with different mechanisms of action are used in combination to eliminate drug resistance in cancer treatment, instead of single-agent therapy. Despite this, drug resistance can still develop. One of the underlying reasons for this is mutations in specific genes that can change the effectiveness of treatment. Identifying these specific mutations is of great importance in terms of treatment. Paclitaxel is a taxane group chemotherapy drug used in the treatment of various cancers such as breast and ovarian cancer, and it is known that many molecular changes, including mutations, are closely related to paclitaxel resistance. PI3K/AKT and WNT/ β -catenin signaling pathways are two important cancer-related signaling pathways that are involved in important cellular processes such as survival, cell proliferation, cell cycle, apoptosis, and maintenance of cellular homeostasis, and abnormal activations of these pathways are observed in many types of cancer. Within the scope of this thesis project, the effects of some missense mutations in the AKT1 and CTNNB1 genes, which are two important components of the PI3K/AKT and WNT/ β -catenin signaling pathways, on paclitaxel resistance in breast and ovarian cancers, were investigated using dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium (MTS) and Western Blot methods in vitro for the first time. In MCF-7 breast cancer cells, AKT1 E17K and E49K; CTNNB1 S45F and T41A mutations were found to cause paclitaxel resistance. Similarly, in MDA-MB-231 breast cancer cells, AKT1 E17K, E49K and L52R mutations led to paclitaxel resistance, whereas CTNNB1 mutations in the same cell lines did not lead to any paclitaxel resistance. Conversely, in SKOV-3 ovarian cancer cells, AKT1 and CTNNB1 mutations did not cause any difference in the response to paclitaxel. According to the findings, AKT1 and CTNNB1 mutations that cause paclitaxel resistance in breast cancer treatment may be used as biomarkers in choosing an individualized cancer treatment protocol.

Key Words: AKT1, CTNNB1, Cancer, Drug Resistance, Paclitaxel.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2018-30153.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

2020 yılında dünya çapında yaklaşık 19,3 milyon kişiye kanser teşhisi konulmuş ve aynı yıl 10 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Sung ve ark., 2021). Kanser tedavisi oldukça karmaşık bir süreçtir ve tedavisinde kullanılan antikanser ilaçların verimlilikleri kısıtlıdır. Bu tedaviyi kısıtlayan en önemli faktör ilaçlara karşı hali hazırda var olan direnç ya da tedavi sırasında sonradan kazanılan dirençtir. İlaç direnci, mutasyon veya epigenetik değişiklikler nedeniyle hücresel büyüme ile ilgili sinyal yolların aşırı aktivasyonu, ilaç dışı atımının artması veya ilaç içe alımının azalması gibi çeşitli spesifik direnç mekanizmaları aracılığıyla gelişebilir (Gottesman ve ark., 2016).

İlaç direncinde rol oynayan iki önemli moleküler mekanizma, AKT1 (V-akt murin timoma viral onkogen homolog) ve β -kateninin dahil olduğu Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT ve Kanonikal WNT sinyal yollarıdır. Büyüme faktörleri gibi ligandların, reseptör tirozin kinazlara (RTK) bağlanması veya G-proteinlerine bağlı reseptörler aracılığı ile PI3K aktive olur. Bu aktivasyon sonucunda membranda fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) oluşarak, AKT1 membrana lokalize olur ve fosforilasyonu gerçekleşir. Bu fosforilasyon, hücre büyümesi, hayatta kalma, angiogenez ve migrasyon (invazyon) gibi süreçlerin aktivasyonuna neden olur. AKT1, bu sinyal yolundaki kilit bileşenlerden biridir (Mahadevan ve ark., 2008; Davies, 2012; Basu ve Lambring, 2021).

AKT1'in aktivasyonu, plekstrin homoloji (PH) alanının PIP3'e bağlanması sonucu membran lokalizasyonu ile başlar ve ardından serin 473 ve treonin 308'in fosforilasyonu ile bu aktivasyon tamamlanır (Vivanco ve Sawyers, 2002). Bu nedenle PH alanındaki mutasyonlar proteinin aktivasyonu açısından son derece önemlidir. PH alanında meydana gelen ve AKT1'in aktivasyonuna neden olan mutasyonlardan bazıları, AKT1 E17K (49G>A), E49K (145G>A) ve L52R (155T>G) mutasyonlarıdır. Yapılan çalışmalar bu mutasyonların, AKT1 aktivasyonunu arttırdığını göstermektedir (Carpten ve ark., 2007; Askham ve ark., 2010; Parikh ve ark., 2012). AKT1'in aşırı aktivasyonuna neden olan bu mutasyonların, hücresel büyüme süreçlerinde aktivasyonuna neden olarak kanserli hücrelerin ilaca karşı direnç göstermesine yol açabileceği düşünülmektedir.

CTNNB1 geni tarafından kodlanan β -katenin proteini Kanonikal WNT sinyal yolunun önemli bir bileşenidir. WNT/ β -katenin yolu, WNT ligandının transmembran proteini Frizzled (Fz/Fzd) reseptörü ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüyle ilişkili protein 6/5 (LRP6/LRP5) koreseptörüne bağlanarak aktive olur. WNT-FZD-LRP6/LRP5 kompleksinin oluşumu, yıkım kompleksinin reseptör etrafında toplanmasına aracılık eder (Gordon ve Nusse, 2006; Bilic ve ark., 2007; Wu ve Pan, 2010) ve yıkım kompleksi aracılı β -katenin fosforilasyonunun inhibisyonuna ve dolayısıyla sitozolde β -katenin birikimine neden olur (Tamai ve ark., 2004; Davidson ve ark., 2005; Zeng ve ark., 2005). Sitozolde biriken β -katenin ise nükleusa göç ederek, WNT hedef genlerinin aktivasyonuna neden olur (Xu ve Kimelaman, 2007). Bu hedef genler, hücre çoğalması, hücre döngüsü kontrolü ve pluripotensinin kontrolü, doku homeostazının sağlanması gibi çok sayıda hayati süreci yönetir. Bu nedenle, anormal WNT/ β -katenin sinyal yolu, kanser oluşumu ile birçok yönden sıkı bir ilişki içerisinde (MacDonald ve ark., 2009).

β -kateninin aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan kritik fosforilasyon alanları proteinin N-terminal bölgesinde yer alır. N-terminal bölgesi *CTNNB1* geninin üçüncü ekzonu tarafından kodlanır ve bu nedenle, bu bölgede meydana gelen mutasyonlar ekzon 3 mutasyonları olarak adlandırılır (Kim ve Jeong, 2019). β -kateninin N-terminal bölgesinde meydana gelen yanlış anlamli mutasyonlardan bazıları S33P (97T>C), S45F (134C>T) ve T41A (121A>G) mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar, β -kateninin sitoplazmik ve nükleer birikiminin artmasına ve dolayısıyla hücresel proliferasyonun artışına yol açar. (Van Nhieu ve ark., 1999; Tanaka ve ark., 2001; Machin ve ark., 2002; Lévy ve ark., 2002; Austinat ve ark., 2008; Hamada ve ark., 2014; An ve ark., 2021; Oulès ve ark., 2022). Bu mutasyonlar nedeniyle oluşan aşırı aktivasyonun, ilaç direncinin gelişmesine neden olabileceği düşünülmektedir.

Paklitaksel, yumurtalık ve meme kanserlerinin tedavisinde kombine şekilde kullanılan taksan sınıfı bir kemoterapötiktir (Zhao ve ark., 2022). Paklitakselin kanser tedavisinde kullanımını sınırlayan ve çözülmesi gereken önemli sorunlardan biri de paklitaksele karşı gelişen kazanılmış veya içsel ilaç direncidir (Yusuf ve ark., 2003). Paklitaksel tedavisinde dirençten sorumlu mutasyonları ve tedaviye duyarlı hastaların seçimini kolaylaştırabilecek yeni biyobelirteçleri belirlemek, meme ve yumurtalık

kanserlerinin tedavisi için oldukça önemlidir. Meme ve yumurtalık kanseri tedavisinde, paklitaksel direncini öngören, kabul görmüş bir biyobelirteç henüz bulunmamaktadır.

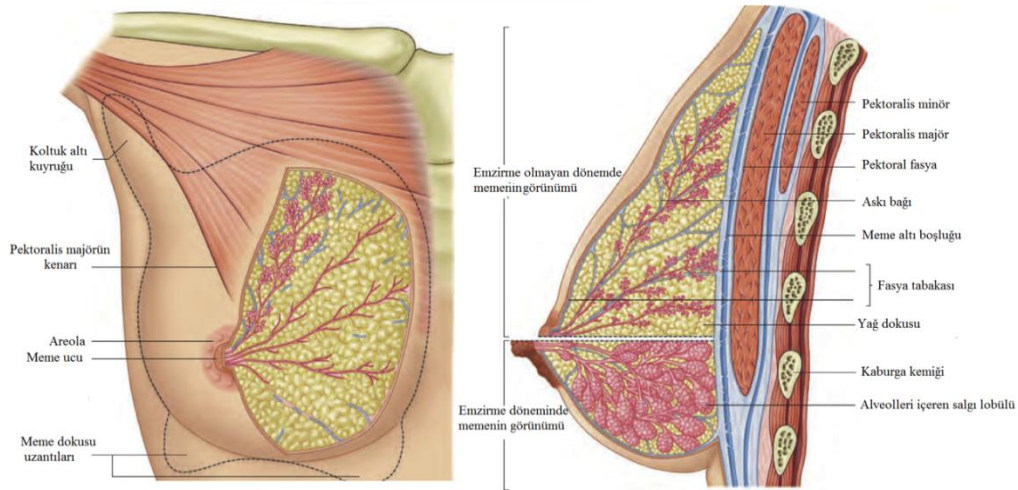
Çalışmamızda ilk kez, AKT1 ve β -kateninin proteinlerinde aktivite artışına neden olan *AKT1* E17K, E49K ve L52R ile *CTNNB1* S33P, S45F ve T41A mutasyonlarının meme (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve yumurtalık (SKOV-3) kanseri hücre serilerinde, paklitaksel direnci üzerine olası etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Bu çalışmada, *AKT1* E17K, E49K ve L52R ile *CTNNB1* S33P, S45F ve T41A mutasyonlarının meme ve yumurtalık kanserinin paklitaksel ile tedavisinde kullanılabilecek önemli prediktif biyobelirteçler olarak tanımlanmaları, böylece paklitaksel tedavisinin bireyselleştirilmesi amaçlanmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme, göğüs kafesinin ön kısmına yerleşmiş, üstte ikinci kaburgaya, altta altıncı kosta kırıkdağına, medialde sternuma ve lateralde orta aksiller hatta kadar uzanan bir çift organdır. İnsanda hem kadınlarda hem de erkeklerde bulunmakla birlikte yalnızca doğum sonrası kadınlarda işlevseldir. Şekli ve büyüklüğü genetik, ırksal ve diyetel faktörlere, bireyin yaşına, doğum sayısına ve menopoiz durumuna bağılı olarak değışir, bununla birlikte genel olarak, yarım küre şeklinde, konik (genellikle 10-12 cm taban ve 5-7 cm kalınlık), çeşitli şekillerde ve derecede sarkık, piriform veya ince ve basık olabilir (Şekil 2-1). Meme, sütün sentezi, salgılanması ve atılması işlevlerini gerçekleştiren, laktasyon için özelleşmiş bir organdır. Salgı birimleri süt kanallarıyla devamlılık gösteren, küçük kesecikler şeklindeki alveollerdir. Bu salgı birimlerinde, sütün üretimi, hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. Hamilelik ve menstrual döngü sırasında bu hormonların dalgalanması, memede önemli histolojik değışikliklere yol açar (Bistoni ve Farhadi 2015 pp. 477-485).



Şekil 2-1: Memenin anatomisi-Bazira ve ark., 2022'den.

Kadınları en çok etkileyen kanser türleri arasında yer alan meme kanseri, 2020 yılı verilerine göre, yaklaşık 2,3 milyon yeni vakayla (%11,7) tüm kanser vakaları içerisinde en sık teşhis edilen kanser türü olmuştur. Meme kanserini, sırasıyla akciğer

(%11,4), kolorektal (%10,0), prostat (%7,3) ve mide (%5,6) kanserleri izlemektedir. Yine aynı yıl içerisinde 684,996 kadın, meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiş ve meme kanseri en ölümcül kanser türleri arasında 5. sırayı almıştır. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri görülme sıklığı daha yüksek olmakla birlikte, meme kanserine bağlı ölüm oranı daha düşüktür (Sung ve ark., 2021).

Metastatik bir kanser türü olan meme kanserinde, akciğer, karaciğer, kemik ve beyin gibi uzak organlara metastaz görülür ve bu durum tedaviyi zorlaştıran temel nedendir. Erken teşhis hayati rol oynamaktadır ve erken teşhis, iyi prognozla ve yüksek hayatta kalma oranı ile ilişkilidir. Kuzey Amerika'da meme kanseri hastalarının 5 yıllık göreceli sağkalım oranı, hastalığın erken teşhis edilebilmesi nedeniyle %80'in üzerindedir. Yine Amerika'da meme kanserinin görülme sıklığı her geçen yıl artmasına rağmen, erken taramaların yaygınlaşması ve ileri tıbbi tedaviler sayesinde ölüm oranı giderek azalmaktadır (Sun ve ark., 2017).

2.1.1. Meme Kanseri Türleri

Meme kanseri, yalnızca farklı biyolojik özelliklere değil aynı zamanda farklı klinik davranışlara da sahip heterojen bir hastalıktır. Meme kanserleri, histolojik derece ve histolojik tipe göre biyolojik ve klinik olarak alt gruplara ayrılabilir. Derece, bir tümörün farklılaşma derecesinin ve proliferatif aktivitesinin değerlendirilmesidir ve tümörün agresifliğini yansıtır. Histolojik tip ise tümörlerin büyüme şeklini ifade eder. En sık görülen meme kanseri histolojisi invaziv duktal karsinomdur (%50-75'i), bunu invaziv lobüler karsinom (%5-15) takip eder, karışık duktal/lobüler karsinomlar ve diğer daha nadir histolojiler ise geri kalan kısmı oluşturur. Duktal ve lobüler karsinom terimlerinin köken alınan bölgeleri ifade etmedikleri, farklı sitolojik özellikleri ve immünohistokimyasal profilleri ifade ettikleri unutulmamalıdır. Meme kanserinin biyolojik özelliklerinin moleküler temelini çözmek, prognoz ve tedaviye yanıtla ilişkili moleküler durumları tanımlamak için yapılan genetik ve moleküler analizler sonucunda, farklı bir sınıflamaya gidilmiş ve meme kanserinin farklı moleküler alt tipleri tanımlanmıştır (Weigelt ve ark., 2010; Corben, 2013).

Meme Kanserinin Moleküler alt tipleri:

Hormon reseptörü (HR) (östrojen reseptör alfa (ER α) ve/veya progesteron reseptör (PR)) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (ERBB2/HER2) olmak üzere iki ana moleküler hedef belirlenerek, meme kanseri genel olarak üç ana moleküler alt

tipe ayrılmıştır: hormon reseptörü pozitif/HER2 negatif [HR(+)/HER2(-)], HER2 pozitif [HER2(+)] ve üçlü negatif [ER(-)/PR(-)/HER2(-)] (Tablo 2-1) (Waks ve Winer, 2019).

Tablo 2-1: Meme kanserinin üç ana alt tipi-Waks ve Winer, 2019'dan

	HR(+) / HER2(-)	HER2(+) [HR(+)/(-)]	Üçlü Negatif
Patolojik Tanım	Yüksek ER ve PR ekspresyonu	Yüksek HER2 ekspresyonu ve amplifikasyonu, HER2(+) tümörlerin yaklaşık yarısı HR(+).	ER, PR veya HER2 pozitifliği için herhangi bir patolojik kriteri karşılamıyor.
Moleküler Patojeniz	ER aracılı onkojenik büyüme yollarının aktivasyonu	Aşırı HER2 aktivasyonuna bağlı onkojenik büyüme yollarının aktivasyonu	Bilinmiyor.
Görülme Sıklığı (%)	70	15-20	15
Evre I (5 Yıllık Sağkalım (%))	≥99	≥94	≥85
Metastaz (Ortalama Genel Sağkalım)	4-5 yıl	5 yıl	10-13 ay

ER α , östrojen tarafından aktive edildiğinde meme kanseri hücrelerinde onkojenik büyüme sinyal yollarını aktive eden bir reseptör ve transkripsiyon faktörüdür. ER α , invaziv meme kanserlerinin yaklaşık %70'inde eksprese edilmektedir. Bu reseptör ile yakından ilişkili bir diğer reseptör, PR'dir ve bu reseptörün ifadesi aynı zamanda ER α sinyallemesinin bir belirteçidir. ER veya PR ekspresyonu olan tümörler, HR(+) olarak tanımlanır. HR(+) meme kanserlerinde, ER sinyalini azaltmak amacıyla endokrin tedavisi, birincil sistematik tedavi seçeneğidir (Hammond ve ark., 2010; Joshi ve Press 2018 pp. 282-307).

HER2, epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinde yer alan bir transmembran reseptör tirozin kinazdır. HER2, meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sinde aşırı eksprese edilmektedir ve bu tümörler HER2(+) olarak sınıflandırılmaktadır. HER2(+) meme kanserine sahip hastalar, anti-HER2 antikorları (trastuzumab ve pertuzumab gibi) ve küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri (lapatinib ve neratinib gibi) dahil olmak üzere HER2 hedefli yöntemlerle tedavi edilir (Piccart-Gebhart ve ark., 2005; Wolff ve ark., 2014).

Üçlü negatif meme kanseri, tüm meme kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. Meme kanserinin bu alt tipi, ER, PR ve HER2 moleküler hedeflerinin ekspresyonunun eksikliği ile karakterizedir. Bu hastalarda, ilk 3 ila 5 yıl içinde uzak metastaz yapma riski yüksektir ve spesifik moleküler patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır (Foulkes ve ark., 2010; Denkert ve ark., 2017).

Bu üç ana tipin farklı alt tiplere ayrılması ile luminal A, luminal B, HER2(+)/ER(-), bazal benzeri ve normal meme benzeri olmak üzere 5 farklı alt tip sınıflaması da yapılabilir (Polyak, 2007).

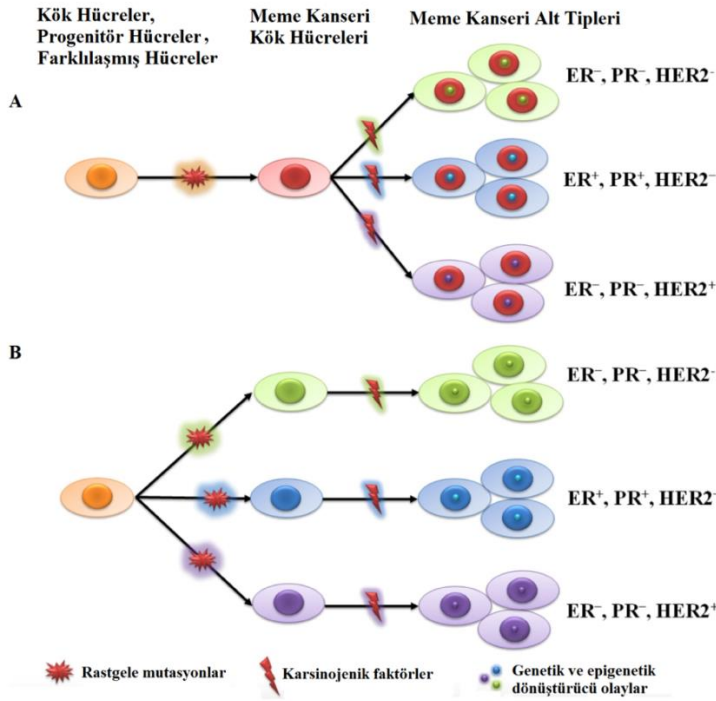
2.1.2. Meme Kanseri Karsinogenezi

Meme kanseri, genellikle duktal hiperproliferasyon ile başlayan, çeşitli karsinojenik faktörlerin sürekli etkisi altında kalarak iyi huylu tümörlere ve ardından karsinomlara dönüşen bir neoplazmdır. Tümör mikro-çevresindeki değişikliklerin, çeşitli genetik değişikliklerin ve buna bağlı ortaya çıkan sinyal yolu farklılıklarının, kanser kök hücrelerinin varlığının, meme kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde hayati bir rol oynadığı görülür (Sun ve ark., 2017).

Kanser kök hücre ve stokastik teori olmak üzere, meme kanserinin başlaması ve ilerlemesi için iki varsayımsal teori öne sürülmüştür. Kanser kök hücre teorisine göre, tüm tümör alt tipleri aynı kök hücrelerden veya progenitör hücrelerden türemiştir, edinilmiş genetik ve epigenetik mutasyonlar ise farklı tümör fenotiplerini ortaya çıkarmıştır. Stokastik teoriye göre ise, her bir tümör alt tipi, farklı bir hücre tipinden köken almıştır. Rastgele mutasyonlar, meme hücresinde birikir ve yeterli mutasyonlar biriktiğinde tümör hücrelerine dönüşüm gerçekleşir (Şekil 2-2) (Polyak, 2007; Sgroi, 2010).

Meme kanserinin başlaması, ilerlemesi ve metastazının ER, HER2, mitojenle aktiveleşen protein kinaz (MAPK), PI3K/AKT, WNT/ β -katenin gibi çeşitli sinyal yolları ile ilişkili olduğu bilinmektedir. ER'ler, membran östrojen reseptörleri (çoğunlukla G proteinine bağlı reseptörler) ve nükleer östrojen reseptörlerinden (ER α ve ER β) oluşur. ER, östrojenin indüklediği mitojenik sinyallemeden sorumludur ve meme kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. ER α ve ER β 'nın her ikisi de çeşitli benzerlik derecelerine sahip altı fonksiyonel alan içerir ve heterodimer oluşturma yetenekleri korunmuştur. Ayrıca, iki reseptör türü için de, hedef genlerin "östrojen yanıt

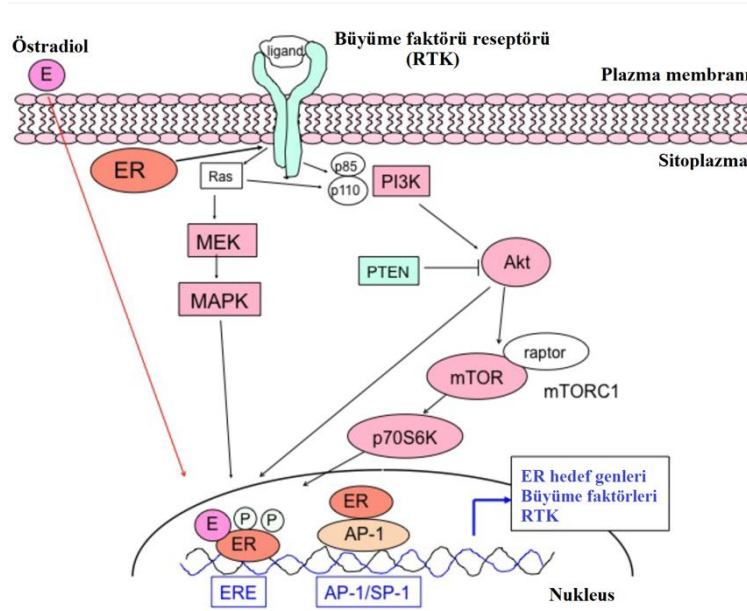
elemanları” (ERE’ler) ile etkileşimlerine aracılık eden DNA bağlama alanları %96 özdeşliğe sahiptir (Feng ve ark., 2018). ER α , meme kanserlerinin patojenezinde önemli bir rol oynar çünkü meme kanserlerinin yaklaşık %75’i ER ekspresyonu açısından pozitifdir (Nadji ve ark., 2005).



Şekil 2-2: Meme karsinogenezi teorileri. (A) kök hücre teorisi; (B) stokastik teori-Sun ve ark., 2017’den.

Estradiol, ER’ye bağlandığında, ER konformasyonel değişikliklere uğrar ve dimerler oluşturur. ER dimerleri, hedef genlerin promoterlerinde yer alan ERE dizisine bağlanır ve bir kofaktör kompleksini bölgeye (ko-aktivatörler ve ko-baskılayıcılar) çeker. Bu bağlanma, özellikle kanserle ilgili olan çoğalma, farklılaşma, hayatta kalma, istila, metastaz ve anjiyogenezde rol oynayan yüzlerce genin ifadesini etkiler. ER, aktivatör protein-1 (AP-1) ve özgüllük proteini-1 (SP-1) gibi diğer transkripsiyon faktörlerine DNA üzerindeki spesifik bölgelerden bağlanabilir ve transkripsiyonel aktivite bu bağlanma ile kontrol edilebilir. Ayrıca, ER sinyal yolu, EGFR ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGF1-R) gibi membran reseptör tirozin kinazlar (RTK) tarafından da düzenlenir. Bu membran RTK’ler, PI3K/AKT/mTOR ve MAPK yolu gibi sinyal yollarını aktive eder ve bu aktivasyon ER’nin fosforilasyonuna ve

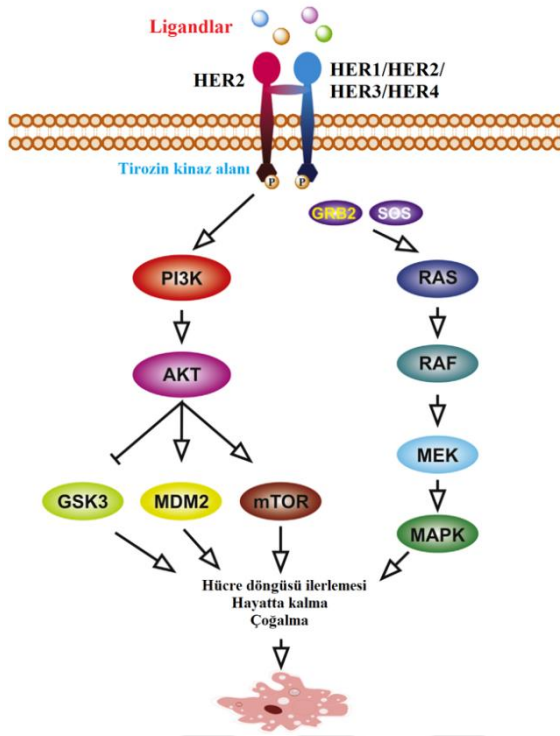
dolayısı ile ER'nin aktivasyonuna yol açar (Şekil 2-3) (Ali ve Coombes, 2000; Osborne ve Schiff, 2011; Renoir ve ark., 2013).



Şekil 2-3: ER sinyali-Tokunaga ve ark., 2014'den.

AKT: Protein kinaz B, AP-1: Aktivatör protein-1, ER: Östrojen reseptörü, ERE: Östrojen yanıt elemanı, MAPK: Mitojenle aktifleşen protein kinaz kinaz, MEK: Mitojenle aktifleşen protein kinaz, mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi, mTORC1: mTOR kompleks 1, PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz, p70S6K: p70 ribozomal S6 kinaz, PTEN: Fosfataz ve tensin homoloğu, p110: Katalitik alt ünite, p85: Düzenleyici alt ünite, RAS: Sıçan sarkoma viral onkogeni, SP-1: Özgüllük proteini-1.

Tirozin kinaz reseptörü HER2'ye, ligandın bağlanması ile dimerizasyon ve ardından HER2'nin hücre içi alanında yer alan tirozin kalıntıların fosforilasyonu uyarılır. Fosforilasyona uğrayan reseptör yapısal olarak aktif hale gelir ve meme tümörü oluşumuyla ilişkili MAPK ve PI3K/AKT gibi bir takım alt sinyal yolları aktiflenir (Şekil 2-4) (Feng ve ark., 2018).



Şekil 2-4: HER2 sinyali-Feng ve ark., 2018'den.

AKT: Protein kinaz B, GRB2: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2, GSK3: Glikojen sentez kinaz 3, HER1/2/3/4: İnsan epidermal reseptörü 1/2/3/4, MAPK: Mitojenle aktifleşen protein kinaz, MDM2: E3 Ubikitin Protein Ligaz Mdm2, MEK: Mitojenle aktifleşen protein kinaz, mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi, PI3K:Fosfatidilinositol 3-kinaz, RAF: Murin lösemi viral onkogeni, RAS: Sıçan sarkoma viral onkogeni, SOS: Guanozin nükleotid değişim faktörleri.

HER2, çeşitli insan meme kanseri hücre serilerinde aşırı ekprese edilir. HER2'nin bu aşırı ekspresyonu, tümör hücresinin çoğalmasına ve kanserin ilerlemesine neden olur. HER2'nin aşırı ekprese edildiği meme kanserlerinde metastaz olasılığının daha da yüksek olduğu görülmektedir (King ve ark., 1985; Slamon ve ark., 1987; Robert ve ark., 2017)

2.1.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseriyle ilişkili bazı risk faktörleri kontrol edilemeyen risk faktörleri grubundadır. Bu gruptaki risk faktörlerinin başında cinsiyet gelir ki kadın olmak meme kanseri için major bir risk faktörüdür (Sung ve ark., 2021). Diğer önemli bir risk faktörü ise yaştır. Meme kanseri en sık 55-64 yaş arası kadınlarda teşhis edilir ve ortalama tanı yaşı 61'dir. Meme kanserlerinin %5'den azı 40 yaşın altındaki kadınlarda görülür. Risk yaşla birlikte artar ve menopozdan sonra artış hızı azalır (Rojas ve Stuckey, 2016).

Tüm meme kanseri vakalarının neredeyse dörtte biri aile öyküsüyle ilişkilidir ve annesi veya kız kardeşi meme kanseri olan kadınlar bu hastalığa diğerlerine göre daha

yatkındır. Birinci derece akrabalarında meme kanseri olan kadınların bu hastalığa yakalanma riski, herhangi bir akrabası meme kanseri olmayan kadınlara göre yaklaşık 2 kat daha yüksektir. Meme kanseri olan birinci derece akraba sayısı arttıkça bu oran daha da artmaktadır (Brewer ve ark., 2017).

Östrojenin, HR(+) tümörler üzerindeki uyarıcı bir etkisi vardır ve meme kanseri vakalarının yaklaşık üçte ikisi HR(+)’dır. Bu nedenle östrojene maruz kalma düzeyi ile meme kanseri riski arasında çok sıkı bir bağlantı vardır. Erken menarş, geç menopoz, ilk gebelik yaşının geç olması ve doğum sayısının düşük olması gibi üreme faktörleri meme kanseri riskini arttırmaktadır. Menopozdaki her 1 yıllık gecikme meme kanseri riskini %3 arttırır, menarştaki her 1 yıllık gecikme veya her ilave doğum ise meme kanseri riskini sırasıyla %5 ve %10 oranında azaltır. Kombine doğum kontrol ilaçlarının ve menopoz sonrası hormon kullanımının meme kanseri riskini arttırdığı bilinmektedir. Emzirmenin sağladığı hipoöstrojenik durum göz önüne alındığında, geleneksel olarak meme kanseri riskinde genel bir azalma ile ilişkili olduğu düşünülür. Ancak yapılan çalışmalar ile emzirmenin, ER(+) veya HER2(+) meme kanseri riskinde bir azalma ile ilişkili olmadığı ancak üçlü negatif meme kanseri riskinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Sigara ve alkol kullanımı, fiziksel hareketsizlik, vücut kitle indeksi artışı da meme kanseri riskini arttırmaktadır (Dieterich ve ark., 2014; Rojas ve Stuckey, 2016; Sun ve ark., 2017).

Genetik faktörler meme kanseri gelişiminde önemli bir yere sahiptir ve bunların başında *BRCA1/2* gen mutasyonları gelmektedir. *BRCA1* (meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini, meme kanseri 1) ve *BRCA2* (meme kanseri tip 2 duyarlılık proteini, meme kanseri 2), çift sarmallı DNA kırıklarının homolog rekombinasyonla aslına uygun şekilde onarılmasında görevli tümör baskılayıcı proteinlerdir (Narod ve Salmena, 2011). *BRCA* genlerindeki delesyon ve/veya fonksiyon kaybı mutasyonları, DNA onarım etkinliğinin azalmasına neden olur ve meme kanserine yakalanma riskini 5-6 kat arttırır (Kuchenbaecker ve ark., 2017). Toplamda, kalıtsal meme kanserlerinin yaklaşık %20-25’i, tüm meme kanserlerinin ise %5-10’u *BRCA1/2* mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Sun ve ark., 2017). *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde toplamda sırasıyla 1650 ve 1731 mutasyon tespit edilmiştir (Rebbeck ve ark., 2018).

Tümör supresor *TP53* genindeki inaktive edici mutasyonların varlığı, meme kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde rapor edilmiştir. Otozomal

dominant bir hastalık olan Li-Fraumeni sendromu, *TP53* germline mutasyonlarından kaynaklanmaktadır ve osteosarkom, lösemi, beyin tümörleri, adrenokortikal karsinom ve meme kanseri riskinde artışa yol açar. Bu sendroma sahip kadınların 45 yaşından öncesi meme kanserine yakalanma riski, genel nüfusa kıyasla 18 kat daha yüksektir (Feng ve ark., 2018). *TP53* genindeki germline mutasyonları meme kanseri vakalarının %1'inden azını oluştururken, *TP53* genindeki somatik mutasyonlar ise insan meme kanserlerinin %19-57'sinde rapor edilmektedir (de Jong ve ark., 2002).

Fosfataz ve tensin homolog gen (*PTEN*) ürünü, MAPK/mTOR sinyal yolunda yer alan bir tümör baskılayıcı proteindir (Ban ve Godellas, 2014). *PTEN* ekspresyonu kaybının varlığı, meme kanseri vakalarının yaklaşık %33'ünde görülmektedir (Sun ve ark., 2017). Hamartomların ve iyi huylu tümörlerin gelişimi ile karakterize “Cowden Sendromuna” sahip ailelerin %80'inde *PTEN* geninde mutasyonlar bulunmaktadır (Marsh ve ark., 1999). *PTEN* mutasyonuna sahip “Cowden Sendromlu” bireylerin yaşam boyu meme kanseri riski %85'tir (Tan ve ark., 2012). Meme kanseri riski ile ilişkili genler ve fonksiyonları Tablo 2-2'de yer almaktadır (Narod ve Salmena, 2011; Ozaki ve Nakagawara, 2011; Ban ve Godellas, 2014; Shiovitz ve Korde, 2015; Sun ve ark., 2017; Feng ve ark., 2018).

Tablo 2-2: Meme kanseri riski ile ilişkili genler ve fonksiyonları

Gen	Fonksiyon
<i>BRCA1/2</i>	Çift sarmallı DNA kırıklarının homolog rekombinasyon ile onarımı
<i>TP53</i>	Hücre döngüsü, DNA onarımı ve apoptoz kontrolü
<i>PTEN</i>	Hücre büyümesi ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu
<i>CHEK2</i>	Hücre döngüsünün düzenlenmesi (G2 fazında). CHEK2, DNA hasarına cevap olarak hızla fosforilasyona uğrar ve aktif CHEK2, p53'ü stabilize eder ve BRCA1 ile etkileşime girer.
<i>BRIP1</i>	BRCA1'in C-terminal alanıyla etkileşim
<i>ATM</i>	dsDNA'nın onarımı, BRCA1 ve CHEK2'nin regülasyonu
<i>PALB2</i>	BRCA2 ile etkileşim, BRCA2'nin nükleer lokalizasyonu ve birikimi

2.1.4. Meme Kanserinin Belirtileri, Teşhisi ve Evrelemesi

Meme kanserinin klasik semptomu memede veya koltuk altında (lenf düğümlerinde) bulunan bir şişlik veya yumrudur. Bu belirtilere ek olarak meme

kanserinin genel uyarıcı belirtileri şunlardır: memede sürekli hassasiyet ve olağan dışı meme ağrısı, meme ucunda ağrı, meme ucu akıntısı (berrak veya kanlı), ters (geri çekilmiş) meme ucu, meme ucunda pullu veya çukurlaşmış cilt. Hastalığın ileri evresinde metastaza bağlı olarak kemik ağrısı (kemik metastazları), nefes darlığı (akciğer metastazları), iştahsızlık ve kilo kaybı (karaciğer metastazları), baş ağrısı, nörolojik ağrı veya zayıflık görülür (Sharma ve ark., 2010). Yukarıdaki belirtilere sahip, meme kanserinden şüphelenilen hasta için ilk yapılması gereken, tanının doğrulanması ve ardından hastalığın evresinin belirlenerek uygun tedavinin seçimidir. Tanıyı doğrulamak için mamografi, ultrasonografi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve meme biyopsisi yapılır. Gerekli görülmesi halinde bilgisayarlı tomografi (CT) veya pozitron emisyon tomografisi (PET) ile de görüntüleme yapılabilir (Wang, 2017). Oldukça heterojen bir hastalık olan meme kanseri için FDA tarafından kanser antijenleri (CA); CA 15-3, CA 27-29, HER2 ve dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC) olmak üzere dört biyolojik belirteç onay alabilmiştir. Alt tiplerin belirlenmesinde ise hücre proliferasyon geni (*Ki67*) ve hormon reseptörlerinin (ER, PR ve HER2) ekspresyon seviyeleri dikkate alınır (Zubair ve ark., 2021). Meme kanseri tanısı konulduktan sonra, Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği (UICC)'nin tümör, düğüm (nod) ve metastaz (TNM) evreleme sistemine göre meme kanserinin klinik evrelemesi yapılır (Tablo 2-3).

Tablo 2-3: Meme kanseri evreleri-Feng ve ark., 2018'den

Evre	Tanım
Evre 0	Duktal karsinom in situ
Evre I	IA Boyutu ≤ 20 mm'den küçük primer invaziv tümör, lenf nodu tutulumu yok
	IB ≤ 20 mm primer tümörle birlikte veya yalnız nodal mikrometastazlar ($>0,2$ mm, $<2,0$ mm)
Evre II	IIA Hareketli ipsilateral seviye I, II lenf nodu metastazlı ≤ 20 mm primer tümör veya nodal tutulumu olmayan > 20 mm, ≤ 50 mm tümör
	IIB Hareketli ipsilateral seviye I, II lenf nodu metastazlı >20 mm, ≤ 50 mm tümör veya nodal tutulumu olmayan >50 mm tümör
Evre III	IIIA Hareketli ipsilateral seviye I, II lenf nodu metastazı ve >50 mm tümör veya sabit ipsilateral Seviye I, II veya dahili lenf nodu metastazı olan herhangi bir boyuttaki primer tümör
	IIIB Göğüs duvarı ve/veya cilt invazyonu olan primer tümör
	IIIC Supraklaviküler veya ipsilateral seviye III lenf nodu metastazı olan herhangi bir boyuttaki primer tümör veya ipsilateral Seviye I, II ve internal lenf nodu metastazı olan
Evre IV	Uzak organ metastazı olan herhangi bir olgu

2.1.5. Meme Kanserinin Tedavisi

Meme kanserinin evrenlenmesinin ardından, belirlenen moleküler alt tipin rehberliğinde, cerrahi, radyoterapi ve sistemik kemoterapi veya hedefe yönelik ilaç seçeneklerinin değerlendirilmesi ile uygun tedaviye karar verilir. Rezeksiyon yapılabilecek derecede küçük tümör dokusuna sahip olan erken invaziv meme kanserleri (I, IIa, IIb) için ameliyat öncesi tedavi önerilmez. Çünkü ameliyat öncesi sistemik tedavinin amacı ileri evre hastalarda tümörlerin boyutunu küçülterek rezeksiyona uygun hale getirmektir ve ayrıca ameliyat edilemeyecek hastalar içinde tek seçenektir (Waks ve Winer, 2019).

Tümörün cerrahi eksizyonundan sonra kalan subklinik tümörün ortadan kaldırılması amacıyla radyoterapi uygulanır. Radyoterapi, lumpektomi geçirmiş hastalara veya yüksek riskli, nod pozitif hastalığı olup mastektomi yapılmış hastalara önerilmektedir. Lumpektomi sonrası radyoterapi, 20 yıllık nüksetme oranını azaltmaktadır (Fisher ve ark., 2002; O'Sullivan ve ark., 2018).

Meme kanserlerinin yaklaşık %70'inde ER ekspresyonu pozitifdir ve ER(+) hastalar, tamoksifen gibi seçici östrojen reseptör modülatörleri, seçici östrojen reseptör parçalayıcıları veya aromataz enzim inhibitörleri kullanılarak, anti-hormon (endokrin) tedavisi ile tedavi edilirler. Seçici östrojen reseptör modülatörleri (özellikle tamoksifen) ile tedavi, meme kanserine bağlı ölüm oranını %25-30 oranında azaltmaktadır. Aromataz inhibitörleri genellikle tamoksifene dirençli tümörlerde ikinci basamak tedavi olarak kullanılır (Haque ve Desai, 2019). HR(+) tanısı almış menopoz öncesi meme kanseri hastalarının tamoksifen ve/veya bir aromataz inhibitörü ile tedavisine, yumurtalık fonksiyonunun (östrojen üretiminin) baskılanması için gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) agonistlerinin eklenmesi gerekir. Menopoz sonrası dönemde olan kadınlar için ise bu gerekli değildir (Trayes ve Cokenakes, 2021). Cerrahi sonrası aromataz inhibitörü ile tedavi edilen non-metastatik, post-menopozal hastalara, kemik metastazı ve kırık oluşum riskini azaltmak amacıyla bifosfonatların kullanımı önerilmektedir (Bouvard ve ark., 2018).

Meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sinde HER2 aşırı eksprese edilmektedir. HER2(+) kanserlerin prognozu kötüdür ve tedavisinde HER2 hedefli ajanlar ve kemoterapötik ajanlar birlikte kullanılmaktadır. HER2 hedefli tedavinin geliştirilmesi, meme kanseri tedavisindeki en önemli ilerlemelerden biri olmuş, nüks riskinin

azaltılması ile sağ kalımının arttırılmasında önemli faydalar sağlamıştır. HER2 hedefli ajanlara örnek olarak, HER2 hücre dışı alanını hedefleyen trastuzumab, HER2 dimerizasyon alanını hedefleyen pertuzumab ve bir tirozin kinaz inhibitörü olan neratinib verilebilir (Cameron ve ark., 2017; Waks ve Winer, 2019). HR(-) ve HER2(-) olan üçlü negatif meme kanseri için mevcut tek sistemik tedavi seçeneği kemoterapötik ajanların kullanımıdır (O’Sullivan ve ark., 2018). Meme kanserinin sistemik tedavisinde kullanılan ajanlar Tablo 2-4’ te özetlenmiştir.

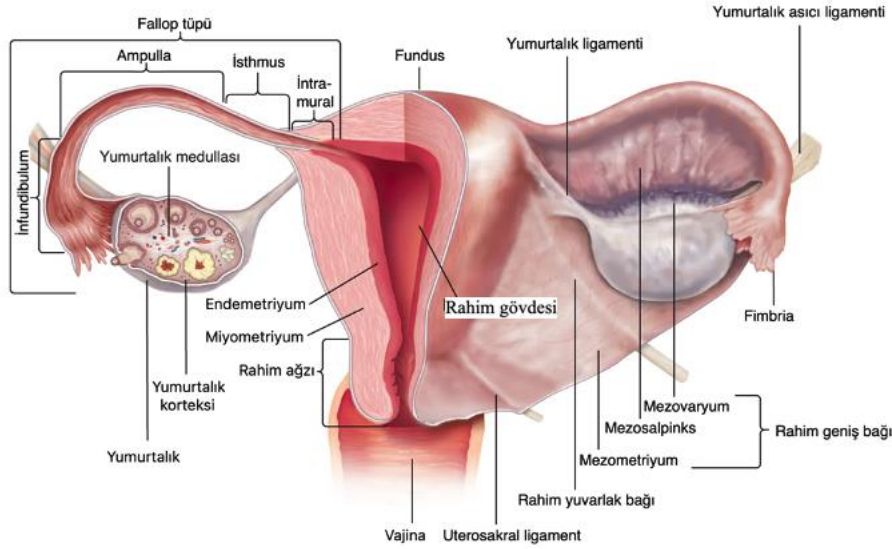
Tablo 2-4: Meme kanserinin sistematik tedavisi-Waks ve Winer, 2019’dan

HR(+)/HER2(-)	HER2(+) [HR(+) veya (-)]	ÜÇLÜ NEGATİF
Oral yollu endokrin tedavi (tüm hastalar)	İntravenöz yollu kemoterapiye ek HER2 hedefli tedavi (tüm hastalar)	İntravenöz yollu kemoterapi (tüm hastalar)
Tamoksifen, letrozol, anastrozol veya eksemestan	Paklitaksel/trastuzumab (TH)	Adriamisin/siklofosfamid
İntravenöz yollu kemoterapi (bazı hastalar)	Adriamisin/siklofosfamid/paklitaksel/ trastuzumab ± pertuzumab	Adriamisin/siklofosfamid/paklitaksel
Adriamisin/siklofosfamid	Dosetaksel/karboplatin/trastuzumab ± pertuzumab	Dosetaksel/siklofosfamid
Adriamisin/siklofosfamid/paklitaksel	Endokrin tedavisi (HR(+) hastalar için)	
Dosetaksel/siklofosfamid	Tamoksifen, letrozol, anastrozol veya eksemestan	

2.2. Yumurtalık Kanseri

Yumurtalıklar pelvik girişin hemen altında, lateral pelvik duvara bitişik olarak uzanan, rahmin her iki yanında birer tane olacak şekilde yerleşmiş, yaklaşık 3–5 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde ve 2–3,5 g ağırlığında bir çift oval organdır (Şekil 2-5). Yumurtalıklar steroid hormon biyosentezi, oosit üretimi, gebelik oluşumu ve desteği, büyümenin düzenlenmesi, davranış, iştah, bağışıklık fonksiyonu gibi çok sayıda fizyolojik işlevi yerine getiren eşsiz bir organ çiftidir. Fonksiyonel alt birimleri oosit taşıyan foliküllerdir ve bu foliküller oosit gelişimini ve döngüsel steroid hormon

üretimini düzenlemek için kapsamlı parakrin sitokin/büyüme faktörü aracılı ağlar ile iletişim kuran çok sayıda somatik hücre tipinden oluşur (Orsi ve ark., 2014 pp. 1-32).



Şekil 2-5: Yumurtalıkların vücuttaki yerleşimi

<https://www.britannica.com/science/ovary-animal-and-human>

Yumurtalık kanseri, yumurtalıklardan veya fallop tüplerinin ve peritonun ilgili bölgelerinden köken alan bir grup hastalıktır. Ölümcül jinekolojik maligniteler denildiğinde akla ilk olarak meme kanseri gelse de, bu maligniteler arasında en ölümcül olanı yumurtalık kanseridir. Belirsiz semptomlar göstermesi ve genellikle ileri evreye gelinceye kadar teşhis edilememesi nedeniyle “sessiz katil” olarak isimlendirilir. Vakaların %70’inden fazlasına, III. ve IV. evreye gelindiğinde teşhis konulabilir ve 5 yıllık sağ kalım oranı %47,4’tür (Stewart ve ark., 2019). 2020 yılında dünya çapında toplam 313.959 kişiye yumurtalık kanseri teşhisi konulmuştur ve aynı yıl yumurtalık kanseri nedeniyle 207.252 kişi hayatını kaybetmiştir. Yüksek gelir düzeyine sahip ülkelerde yeni vakaların görülme sıklığı daha yüksektir ve bu ülkeleri sırasıyla, üst-orta gelir düzeyine sahip, düşük-orta gelir düzeyine sahip ve düşük gelir düzeyine sahip ülkeler izlemektedir (Huang ve ark., 2022).

2.2.1. Yumurtalık Kanserinin Histolojik Alt Tipleri

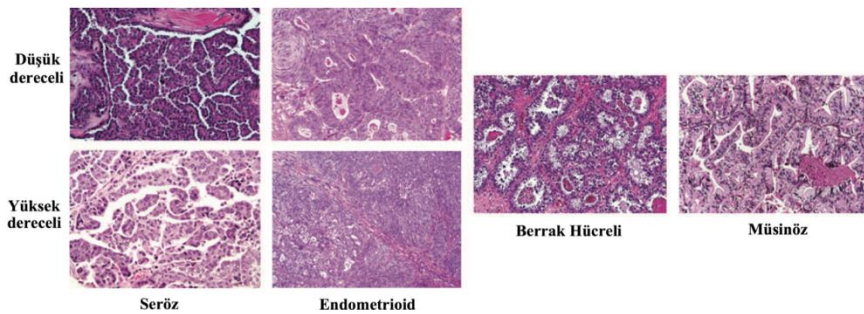
Yumurtalık kanseri, risk faktörlerine, köken aldıkları hücrelere, moleküler bileşimlerine ve klinik özelliklere göre farklı histolojik tiplere ayrılır. Epitelyal, germ

hücreli ve seks-kord-stromal olmak üzere başlıca üç ana histolojik tip vardır. Yumurtalık kanserinin alt tiplerine ait temel özellikler Tablo 2-5'te yer almaktadır.

Tablo 2-5: Yumurtalık kanserinin histolojik sınıflaması-Stewart ve ark., 2019'dan

1-Epityal Yumurtalık Kanseri	
Seröz Tümörler	Endometrioid Karsinomlar
Yüksek Dereceli Seröz Tümörler (HGSC)	Endometriozis kaynaklı
Tüm tümör türlerinin %90'ı	İyi prognoz
Daha ölümcül prognoz	Berrak (Şeffaf) Hücreli Karsinomlar
10 yıllık ölüm oranı %70	Epityal yumurtalık kanserlerinin %10'u
Düşük Dereceli Seröz Tümörler (LGSC)	Çoğunlukla erken evrelerde teşhis
Tüm tümör türlerinin %10'u	Geç teşhis edilirse kötü prognoz
Genç yaşta teşhis	Müsinöz Karsinom
HGSC' ye göre daha iyi prognoz	En az görülen epityal tür
	Gastrointestinal sistemden metastaz ile ilişkili
2-Germ Hücreli Yumurtalık Kanseri	3-Seks Kord-Stromal Yumurtalık Kanseri
Nadir	En az görülen yumurtalık kanseri
Tüm yumurtalık kanserlerinin %3'ü	Primer yumurtalık kanserlerinin %2'sinden azı
Genç kadınlarda sıklıkla teşhis edilir	Nadiren malign
Erkeklerin testis germ hücreli tümörlere benzer histolojik tip	Genellikle erken teşhis

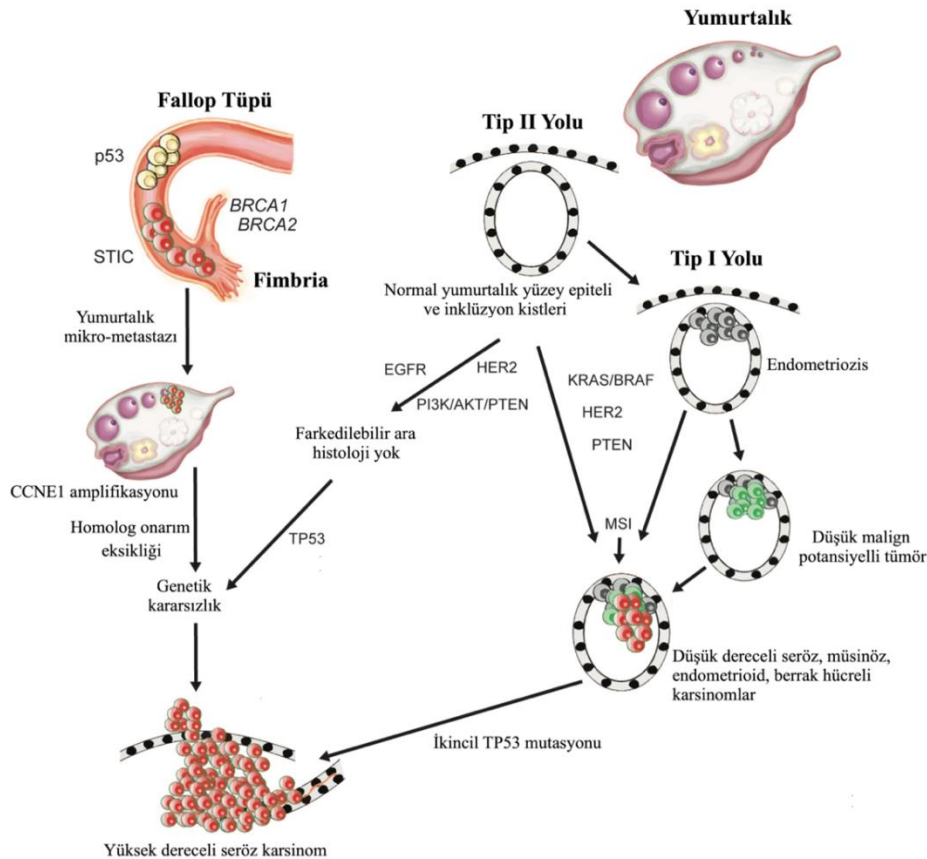
Yumurtalık kanserinin önemli bir kısmını (~%95) epityal tip oluşturur ve bu tip, dört alt tipe ayrılır; seröz, endometrioid, müsinöz ve berrak hücreli (Şekil 2-6). Epityal tümörlerin %10, %3 ve %10'undan sırasıyla endometrioid, müsinöz ve berrak hücreli alt tipleri, geri kalan kısmından ise seröz tümörler sorumludur. Seröz tümörler ise yüksek dereceli seröz karsinomlar (HGSC) ve düşük dereceli seröz karsinomlar (LGSC) olarak ikiye ayrılır. HGSC'ler, epityal yumurtalık kanserinin tüm alt tiplerinin %70-80'ini oluşturur. Germ hücreli ve seks-kord-stromal ana tipler ise, yumurtalık kanseri vakalarının yaklaşık %5'ini oluşturur (Jayson ve ark., 2014; National Comprehensive Cancer Network, 2018).



Şekil 2-6: Epityal yumurtalık kanserinin histolojik alt tipleri-Cho ve Shih, 2019'dan.

2.2.2. Epitelyal Yumurtalık Kanseri Karsinojenezi

Epitelyal yumurtalık kanserleri yumurtalık, fallop tübü ve pelvisteki diğer epitelyal bölgelerden köken alır. Yapılan klinikopatolojik ve moleküler genetik çalışmaları sonucunda epitelyal tümörler için, tip I ve tip II tümörleri olarak adlandırılan, iki ana tümör oluşum yolunun bulunduğu yeni bir yumurtalık karsinojenez modeli önerilmiştir. Tip I ve tip II tümör terimleri, tümörün histopatolojik sınıfından bağımsız olarak, tümör oluşum yollarını tanımlamaktadır. Tip I tümörler (LGSC, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli karsinomlar ve Brenner tümörleri) borderline tümörlerden kademeli şekilde oluşan düşük dereceli neoplazmalar iken, tip II tümörler (HGSC, malign karışık mezodermal tümörler (karsinosarkom) ve farklılaşmamış karsinom) öncü lezyonların tanımlanmadığı, *de novo* gelişim gösteren yüksek dereceli neoplazmlardır (Şekil 2-7) (Shih ve Kurman, 2004).



Şekil 2-7: Yumurtalık kanserinin patajenez yolları-Hirst ve ark. 2018'den

AKT: Protein kinaz B, BRAF: V-raf murin sarkom viral onkogen homolog B, BRCA1/2: Meme kanseri tip 1/2 duyarlılık proteini, CCNE1: Siklin E1, EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü, HER2: İnsan epidermal reseptörü 2, KRAS: Kirsten sıçan sarkomu viral onkogeni, MSI: Mikrosatelit kararsızlık, PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz, PTEN: Fosfataz ve tensin homoloğu, P53: Tümör protein 53, STIC: Seröz tubal intraepitelyal karsinom, TP53: Tümör protein 53 geni.

Tip I tümörler yavaş büyüme eğilimindedir ve ultrasonografiyle daha erken tespit edilme olasılıkları daha yüksektir, ancak kemoterapötik kimyasallara karşı daha az duyarlıdır ki bu durum tedavilerini zorlaştırabilir. Tip II tümörler ise, genellikle hızlı büyürler ve erken yayılırlar (Sundar ve ark., 2015).

Epitelyal yumurtalık kanserlerine bakıldığında, farklı genlerde meydana gelen mutasyonların ve genomik kararsızlıkların karsinogeneze aracılık ettiği görülür. Tip I tümörler, mikrosatellit kararsızlığı ile birlikte *BRAF*, *KRAS* ve *PTEN* genlerinde mutasyonlar barındırır. Tip II tümörler ise, sıklıkla *p53*, *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları içerir ve ayrıca *NF1*, *CDK12* mutasyonları da bu tip için tanımlanmıştır. HGSC'lerin kabaca %50'sinde DNA hasarının homolog rekombinasyon onarımı kusurludur ve seröz tümörlerin patofizyolojisinde NOTCH ve FOXM1 sinyalleme de önemli bir rol oynar (Jayson ve ark., 2014). Epitelyal tümör alt tipleri ve bu tiplerin oluşumu ile ilişkili mutasyonların meydana geldiği genler Tablo 2-6'da özetlenmiştir.

Tablo 2-6: Epitelyal yumurtalık kanseri ile ilişkili genler-Jayson ve ark., 2014'den

Yüksek Dereceli Seröz	Düşük Dereceli Seröz	Endometrioid	Berrak Hücreli	Müsinöz
<i>TP53</i>	<i>BRAF</i>	<i>ARID1A</i>	<i>ARID1A</i>	<i>KRAS</i>
<i>BRCA1/2</i>	<i>KRAS</i>	<i>PI3KCA</i>	<i>PI3KCA</i>	<i>HER2</i> amplifikasyonu
<i>NF1</i>	<i>NRAS</i>	<i>PTEN</i>	<i>PTEN</i>	
<i>CDK12</i>	<i>HER2</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>PPP2R1A</i>	
Homolog rekombinasyon tamir genleri		<i>MMR</i>	<i>CTNNB1</i>	
Sinyal yolu değişiklikleri <i>PI3/Ras/Notch/FoxM1</i>				

2.2.3. Yumurtalık Kanseri Risk Faktörleri

Epitelyal yumurtalık kanseri, çoğunlukla ileri yaşlarda ortaya çıkan, post-menopozal bir hastalıktır. Kanserinin görülme sıklığı 65 yaş üstü kadınlarda daha belirgindir ve ileri yaş, hastalığın ilerlemiş olması ve daha düşük sağ kalım oranıyla ilişkilidir. 64 yaş üstü olmak, yumurtalık kanseri olan kişilerde ölüm oranının belirleyicilerinden biridir. Yaşlı hastalar, genç hastaların aksine daha az agresif bir şekilde tedavi edilir ve dolayısıyla bu grupta hayatta kalma oranı daha düşüktür. (Momenimovahed ve ark., 2019).

Ailesinde yumurtalık kanseri öyküsü olan kadınların, hastalığa yakalanma riski daha yüksektir. Risk, birinci derece akraba öyküsü olan kadınlar için, akraba öyküsü olmayan kadınlara göre yaklaşık üç kat daha fazladır ve akrabanın yaşının 50'nin altında olması durumunda ise bu risk daha da artmaktadır (Stratton ve ark., 1988; Jervis ve ark., 2014). Belirli etnik kökenlere sahip bireylerde yumurtalık kanserine yatkınlık daha fazla görülmektedir. Özellikle, Yahudi, Kanadalı Fransız, Hollanda ve İzlanda kökenlilerine sahip olan bireylerde yumurtalık kanseri riski daha fazladır (Slatnik ve Duff, 2015; National Cancer Institute, 2018)

Yumurtlama ile yumurtalık kanseri arasında doğrudan bir bağlantı vardır. “Sürekli yumurtlama” teorisini göre kesintisiz yumurtlama, yumurtalık epiteline zarar vererek kanser oluşumuna katkıda bulunur ve yumurtlamanın azalmasına katkıda bulunan herhangi bir faktör, yumurtalık kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahiptir (Fathalla, 1971). Yapılan çalışmalar, yumurtlama döngüleri ne kadar fazla tamamlanırsa yumurtalık kanseri riskinin de o oranda arttığını göstermektedir (Mori ve ark., 1988; Kim ve ark., 2017). Salazar-Martinez ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada 8,7 yıl boyunca yumurtlama gerçekleşmeyen kadınlarda, yumurtalık kanseri riskinin 4 kat azaldığı bildirilmiştir. Oral kontraseptif kullanımı, hamilelik, emzirme ve erken menopoz gibi yumurtlamayı kesintiye uğratan faktörler, yumurtalık kanseri riskini azaltmaktadır (Stewart ve ark., 2019).

Endometriozis, polikistik over sendromu (PCOS) ve diğer iyi huylu jinekolojik durumlar ile yumurtalık kanser riski arasındaki ilişkiye bakıldığında; endometriozis öyküsünün, endometrioid ve berrak hücreli yumurtalık kanseri riskini 2-3 kat arttırdığı bildirilmiştir (Pearce ve ark., 2012; Wentzensen ve ark., 2016) PCOS vakaları ve yumurtalık kanseri arasındaki ilişki ise çok açık değildir ve yürütülen çalışmaların çoğunda anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Yine yumurtalık kistleri ve fibroidler gibi durumlar ile yumurtalık kanseri riski arasında net bir ilişki saptanamamıştır (Webb ve Jordan, 2017).

Yumurtalık kanseri riski, çeşitli genetik değişikliklerle yakından ilişkilidir. En iyi incelenen değişiklikler, DNA onarımın mekanizmalarında görevli genlerde meydana gelen mutasyonlardır ve bu mutasyonlar, yumurtalık karsinomlarının yaklaşık üçte birinde tanımlanmıştır. Yumurtalık kanseri için bilinen en önemli genetik risk faktörü germline *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarıdır ki bu mutasyonlar, hastaların yaklaşık

%17'sinde görülür. Epitelyal yumurtalık kanserlerinin çoğu tipinde görülen bu mutasyonlar en yaygın olarak HGSC'ler ile ilişkilendirilmiştir (Matulonis ve ark., 2016). *BRCA1/2*'nin yanı sıra, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *BARD1* ve *PALB2* gibi DNA onarımında rol oynayan genlerdeki diğer germline mutasyonları da yumurtalık kanseri gelişme riskini arttırmaktadır. Yine, *CHEK2*, *MRE11A*, *RAD50*, *ATM* ve *TP53* gibi DNA onarımında rol oynayan diğer genlerdeki kalıtsal mutasyonlar da yumurtalık kanseri gelişme riskini arttırabilmektedir (Tablo 2-7) (Walsh ve ark., 2011; Pennington ve Swisher, 2012; Norquist ve ark., 2016).

Tablo 2-7: Yumurtalık kanserinde yaygın olarak mutasyona uğrayan genler-Matulonis ve ark., 2016'dan

Gen	Protein	Fonksiyon
<i>BRCA1</i>	Meme kanseri tip 1 duyarlılık proteini	Homolog rekombinasyon yoluyla DNA onarımında yer alan diğer proteinler için iskele görevi görerek çift zincirdeki kopmaları onarmak ve RAD51-ssDNA komplekslerini stabilize etmek
<i>BRCA2</i>	Meme kanseri tip 2 duyarlılık proteini	
<i>BARD1</i>	BRCA1 ile ilişkili RING alanı proteini 1	Mutual stabilite için gerekli BRCA1-BARD1 kompleksi oluşturmak
<i>BRIP1</i>	BRCA1 ile etkileşime giren protein 1 (Fanconi anemi grubu J proteini)	BRCA1'e bağlanarak, S fazı kontrol noktası aktivasyonu için gerekli BRCA1-BRIP1 kompleksi oluşturmak
<i>PALB2</i>	BRCA2'nin ortağı ve yerleştiricisi	DNA hasarı bölgelerinde BRCA1 ve BRCA2'yi bağlayan bir köprü görevi görmek, RAD51'in ssDNA'ya bağlanmasına yardımcı olmak
<i>RAD51C</i>	DNA onarım proteini RAD51 homologu 3	Nükleoprotein filamentleri oluşturmak ve DNA onarımını başlatmak için ssDNA kırıklarına bağlanmak
<i>RAD51D</i>	DNA onarım proteini RAD51 homologu 4	
<i>MSH2</i>	MutS protein homologu 2	DNA replikasyonu sırasında meydana gelen baz eşleşmesi hatalarını tanımak ve onarmak (uyumsuzluk onarım genlerindeki mutasyonlar Lynch sendromuyla da ilişkili)
<i>MSH6</i>	MutS protein homologu 6	
<i>MLH1</i>	MutL protein homologu 1	
<i>PMS2</i>	Uyumsuzluk onarımı endonükleazı PMS2	

Epitelyal tümörlerde gözlenen moleküler değişiklikleri arasında kusurlu NOTCH, PI3K/AKT, RAS-MEK ve Forkhead (çatal uçlu) kutu proteini M1 (FOXO1) sinyal yolları ve ayrıca proteinleri kodlayan genlerde yüksek düzeyde somatik kopya sayısı değişiklikleri sayılabilir (CGARN, 2011). Yumurtalık kanseri için bir diğer risk faktörü "Lynch Sendromu"dur. Bu sendrom, *MLH1*, *PMS2*, *MSH2/6* gibi DNA yanlış

eşleşme tamiri genlerindeki mutasyonlarla karakterizedir ve yumurtalık kanserinin yanı sıra kolorektal, endometriyal, idrar yolu, mide, ince bağırsak ve safra yolu kanserleriyle de ilişkilidir (Lynch ve ark., 2015).

Alkol ve sigara kullanımı ile yumurtalık kanseri riski arasındaki ilişki tartışmalıdır. Toplam alkol alımı ile yumurtalık kanseri riski arasında hiçbir ilişki olmadığını gösteren geniş ölçekli analizler ile alkolün yumurtalık kanseri riskini arttırdığını öne süren çok az kanıt vardır. Sigara kullanımının müsinöz yumurtalık kanseri riskini arttırdığına dair tutarlı kanıtlar olmakla birlikte, diğer türler için böyle bir kanıt söz konusudur değildir (Webb ve Jordan, 2017).

2.2.4. Yumurtalık Kanseri Belirtileri, Teşhisi ve Evrelemesi

Yumurtalık kanserinin semptomları genellikle belirsizdir ve kötü tanımlanmıştır. Karında şişlik ve/veya kitle, karın kitlesi, karın veya pelvik bölgesinde şişkinlik, hazımsızlık, karın veya pelvik ağrısı, anormal vajinal kanama, iştah kaybı ve kilo kaybı, bağırsak alışkanlıklarında değişiklik (kabızlık, ishal), idrar sıklığı veya aciliyeti gibi belirtiler yumurtalık kanseriyle ilişkili semptomlar arasında yer almaktadır. Bu belirtiler, spesifik olmadıkları için başlangıçta gözden kaçırılabilir veya diğer hastalık süreçlerine (dispepsi, irritabl bağırsak sendromu, menstürasyon ve menopoz gibi) atfedilebilir. Buna göre tanı sıklıkla kanser geç bir aşamaya ulaştığında (evre III veya IV) konur, çünkü semptomlar belirgin hale gelmiştir ve müdahale gerektirir. (Goff ve ark., 2000; Ebell ve ark., 2016).

Tanı, yukarıda belirtilen semptomlara sahip hastanın öncelikle fiziksel muayenesinin (pelvik ve/veya rektovajinal) yapılması ve ardından radyografik görüntülemesi (abdominal ultrasonografi, transvajinal ultrasonografi, CT, MR ve/veya PET) ile konulur. Ayrıca, CA125 tümör belirteci de tanıda kullanılmaktadır. CA125'in özgüllüğünün ve duyarlılığının olmadığı ve iyi huylu durumlarda ve hatta hamilelik de bile yükselebildiği ve ayrıca erken evre yumurtalık kanser hastaların yaklaşık %50'sinde artış göstermediği unutulmamalıdır. Kesin tanı için doku biyopsisi yapılır (Matulonis ve ark., 2016; Stewart ve ark., 2019), Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) ve Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) tarafından geliştirilen evreleme sistemleri kullanılarak kanser evrelemesi gerçekleştirilir (Tablo 2-8) (Heintz ve ark., 2006).

Tablo 2-8: Yumurtalık kanseri evreleri (FIGO)-Heintz ve ark., 2006’dan

Evre	Tanım
Evre I	Tümör yumurtalıklarla sınırlı
Ia	Büyüme tek bir yumurtalıkla sınırlı
Ib	Büyüme her iki yumurtalıkla sınırlı
Ic	Evre Ia veya Ib, ancak bir veya her iki yumurtalığın dış yüzeyinde tümör var veya kapsül yırtılmış veya malign hücreler içeren asit mevcut veya pozitif periton yıkamaları var.
Evre II	Pelvik yayılım ile birlikte bir veya her iki yumurtalığı içeren tümör
Ila	Rahim ve/veya tüplere yayılım
Ilb	Diğer pelvik dokulara yayılım
Ilc	Evre Ila veya Ilb ancak bir veya her iki yumurtalığın yüzeyinde tümör mevcut veya rüptüre olmuş kapsül(ler) veya malign hücreler içeren asit veya pozitif periton yıkamalar
Evre III	Pelvis dışında histolojik olarak doğrulanmış periton yayılımı ve/veya pozitif retroperitoneal veya kasık düğümleri olan bir veya her iki yumurtalığı içeren tümör, yüzeysel karaciğer metastazları Evre III’e eşit
IIla	Tümör büyük ölçüde gerçek pelvisle sınırlı, negatif düğümler, abdominal periton yüzeylerine mikroskopik yayılım veya ince bağırsak veya mezentere histolojik olarak kanıtlanmış yayılım
IIlb	Karın periton yüzeylerinde çapı 2 cm’yi geçmeyen metastazlar, negatif düğümler
IIlc	Pelvisin ötesinde 2 cm çapından büyük peritoneal metastaz ve/veya pozitif retroperitoneal veya inguinal nodlar
Evre IV	Uzak metastazlarla birlikte bir veya her iki yumurtalığı kapsayan tümör, parankimal karaciğer metastazı Evre IV’e eşit

2.2.5. Yumurtalık Kanseri Tedavisi

Mevcut tedavi, hastanın yaşı, genel sağlık durumu ve başvuru evresi gibi çeşitli prognostik faktörlere bağlıdır. Yumurtalık kanserinin tedavisinde, birincil basamakta cerrahi ve adjuvan kemoterapi (ameliyat sonrası kemoterapi) veya neoadjuvan kemoterapi (ameliyattan önce kemoterapi), ardından aralıklı cerrahi ve ek kemoterapi yer alır (Matulonis ve ark., 2016).

Cerrahide başlıca hedef, mümkün olduğunca fazla miktarda kanserli dokunun çıkarılmasıdır. Cerrahi seçenekler arasında: total histerektomi, iki taraflı salpingo-ooferektomi, sitoredüksiyon (“Debulking surgery”/tümör küçültme) ve omentektomi yer alır (Jayson ve ark., 2014).

Erken evre yumurtalık kanseri olan kadınların çoğu ameliyatla iyileşir. Yeterli evreleme ile “düşük riskli” erken evre hastalığı olan hastaların adjuvan kemoterapi olmadan hayatta kalma oranı da %90’ın üzerindedir (Ahmed ve ark., 1996). Bununla

birlikte evre Ic'li hastalar, yüksek risk taşıdıklarından, bu hastalara adjuvan kemoterapi önerilir (Vergote ve ark., 2001). Yüksek dereceli (II-III-IV) ve/veya spesifik histolojilere (HGSC ve berrak hücreli karsinom gibi) sahip hastalara ise standart olarak ameliyat sonrası adjuvan kemoterapi uygulanır. Yumurtalık kanserinde birincil kemoterapi yaklaşımı, taksan (paklitaksel veya dosetaksel) ve platin analoglarının (sisplatin veya karboplatin) kombinasyonudur. Karboplatin/paklitaksel ikilisi, yumurtalık kanserinin başlangıç tedavisinin omurgası durumundadır (Boyd ve Muggia, 2018). Sağlık durumu cerrahiye imkan vermeyen ve/veya tam rezeksiyona izin vermeyecek derecede büyük kanser dokusuna sahip hastalara neoadjuvant terapi uygulanır. Üç kür boyunca karboplatin ve paklitakselden oluşan kombine tedaviyi, daha sonra cerrahi sitoredüksiyon ve ameliyat sonrası ilave kemoterapi takip eder (Elies ve ark., 2018). Tedavide yaygın olarak kullanılan ajanlar ve uygulama şekilleri Tablo 2-9'da yer almaktadır.

Tablo 2-9: Yumurtalık kanserinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlar-Stewart ve ark., 2019'dan

Ajan	Uygulama yolu	Evre	Süre
Paklitaksel+karboplatin	İntravenöz	I	21 gün
Paklitaksel+karboplatin	İntravenöz	I	7 gün
Dosetaksel+karboplatin	İntravenöz	I	21 gün
Paklitaksel+sisplatin	İntravenöz/intraperitoneal	II, III, IV	21 gün
Paklitaksel+karboplatin	İntravenöz/intraperitoneal	II, III, IV	21 gün
Yoğun doz paklitaksel+karboplatin	İntravenöz	II, III, IV	21 gün
Paklitaksel+karboplatin	İntravenöz	II, III, IV	7 gün
Dosetaksel+karboplatin	İntravenöz	II, III, IV	21 gün
Karboplatin+liposomal doksorubisin	İntravenöz	II, III, IV	28 gün
Bevasizumab+paklitaksel+karboplatin	İntravenöz	II, III, IV	21 gün

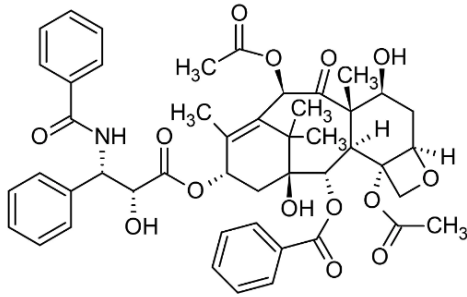
2.3. Paklitaksel

İlk olarak 1963 yılında, Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute) tarafından, Kuzeybatı Pasifiğin ormanlarında yaşayan nadir bir tür olan, *Taxus brevifolia* (pasifik porsuk ağacı) ağacının kabuğundan elde edilen ekstre içeriği analiz edildi. Ekstre ile yapılan prelinik çalışmalar, bu ekstrenin bir çok kanser türü üzerinde toksik etkiye sahip olduğunu gösterdi. 1971 yılında ise, paklitaksel bu ekstrenin aktif bileşini olarak belirlendi (Nikolic ve ark., 2011). 1992 yılında, paklitaksel (Taxol) ilk

kez yumurtalık kanserinin tedavisi için ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylandı. İlk onayın ardından 1994 yılında, FDA meme kanseri için paklitakselin kullanımına onay verdi. Günümüzde paklitaksel, yumurtalık, ilerlemiş prostat ve meme karsinomları, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu, endometrial kanser, mesane kanseri, servikal karsinom, kaposi sarkomu gibi malignitelerin tedavisinde kullanılmaktadır (Zhao ve ark., 2022).

2.3.1. Paklitakselin Yapısı

Paklitaksel, taksan sınıfının öncü bir ilacıdır ve IUPAC'a (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) göre (1S,2S,3R,4S,7R,9S,10S,12R,15S)-4,12-diasetiloksi-15-[(2R,3S)-3-benzamido-2-hidroksi-3-fenilpropanoil]oksi-1,9-dihidroksi-10,14,17,17-tetrametil-11-okso-6-oksatetrasiklo[11.3.1.0^{3,10}.0^{4,7}]heptadek-13-en-2-yl benzoat olarak isimlendirilir. Bir taksan halkası ve bir N-benzoilfenilizoserin grubuna sahip paklitaksel, C₄₇H₅₁NO₁₄ moleküler formülüne ve 853,906 g/mol moleküler ağırlığına sahip bir psödoalkaloiddir. Suda çözünmeyen ($5,56 \times 10^{-3}$ g/L) oldukça lipofilik, beyaz kristal bir tozdur (Rowinsky ve ark., 1990). Paklitaksel, bir adet taksan halkası içeren, karmaşık bir kimyasal yapıya sahip, trisiklik bir diterpenoiddir (Şekil 2-8).

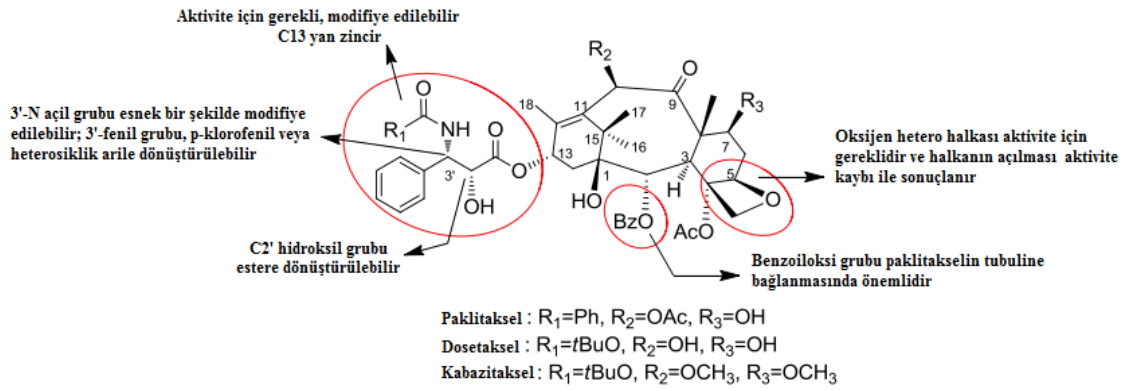


Şekil 2-8: Paklitakselin yapısı.

<https://www.abcam.com/products/biochemicals/paclitaxel-anticancer-agent-ab120143.html#lb>

Taksan halkasının yanı sıra C13 yan zinciri, oksetan halkası, hidroksil grubunun 2' konumu, homokiral ester zinciri, molekülün antitümör aktivitesi için gereklidir. Bununla birlikte, C-7 pozisyonundaki hidroksil grubu ve C-10 hidroksil grubunun asetilasyonu, antitümör aktivitesi için gerekli olmadığı bildirilmiştir ki, bu pozisyonda asetil grubu olmayan paklitakselin sentetik analogu dosetaksel, yine yüksek antitümör aktivite gösterir (Gallego-Jara ve ark., 2020).

Paklitakselin yapısal modifikasyonu ile çeşitli türevler sentezlenmiş ve bu modifikasyonlarda temel olarak C-13 yan zincirin 3'-amino grubuna, C-7 hidroksil ve C-10 asetil gruplarına odaklanılmıştır (Şekil 2-9). Paklitakselin bir 3'-amino türevi olan ve yarı sentezle elde edilebilen dosetaksel, 1998 yılında kemoterapi tedavisinde başarısız olan ileri evre veya metastatik, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisi için FDA tarafından onay almıştır. C-7 hidroksil ve C-10 asetil grupları temel aktivite grupları olmasa da, bu grupların yapısal modifikasyonu ile çoklu ilaç dirençli tümörler üzerinde anti-tümör aktivite artışı olduğu bildirilmektedir. Bu duruma örnek, doketakselin C-7 hidroksil ve C-10 asetil gruplarının yapısal modifikasyon türevi olan ve P-glikoprotein ile etkileşime girdiğinde zayıf etki gösteren kabazitakseldir. Kabazitaksel dosetaksele göre kan-beyin bariyerini daha kolay geçebilmektedir ve metastatik prostat kanseri tedavisi için kullanılmaktadır (Cao ve ark., 2018).



Şekil 2-9: Paklitaksel ve türevlerinin yapı-aktivite ilişkisi-Cao ve ark., 2018'den.

Paklitaksel kullanımının ana kısıtlamalarından biri, sudaki düşük çözünürlüğüdür (0,1 µg/mL). Bu sorunu çözmek için ilk paklitaksel formülasyonu olan Taxol®, PEG-35 hint yağı (Cremophor EL, CrEL) ve absölu etanol içerir. CrEL, az çözünen farklı ilaçlar için bir araç olarak kullanılan heterojen iyonik olmayan bir yüzey aktif maddedir ancak ciddi yan etkilere (anafilaktoid aşırı duyarlılık reaksiyonları, hiperlipidemi, anormal lipoprotein tabloları, eritrosit agregasyonu ve periferik nöropati gibi) sahiptir. Bu nedenle alternatif ilaç formülasyonlarına ihtiyaç doğmuştur (Gelderblom ve ark., 2001) ve birçok ilaç firması tarafından yeni formülasyonlar piyasaya sürülmüştür. Bu formülasyonlar arasındaki en büyük fark ilaç taşıyıcı sistemlerindeki farklılıklardır. Bu nedenle, albümin bazlı nanopartiküller (örn. Abraxane®), polimerik lipidik nanopartiküller (örn. PICN®), polimerik miseller (örn.

Cynviloq®, Nanoxel® ve Paclical) ve lipozomlar (örn., Lipusu®) gibi farklı paklitaksel tabanlı nanoteknolojik taşıyıcı bazlı ilaçlar geliştirilmiş ve onaylanmıştır (Gallego-Jara ve ark., 2020). Abraxane® şüphesiz en başarılısıdır. Bununla birlikte, genel yanıt oranı Abraxane® için Taxol®’dan açıkça daha iyi olmasına rağmen, metastatik meme kanseri hastalarında yanıt oranı yalnızca %33’tür (Taxol®’un yanıt oranı %25’tir) (Dranitsaris ve ark., 2015).

2.3.2. Paklitakselin Yan Etkileri

Paklitakselin en ciddi yan etkisi, aşırı duyarlılık reaksiyonlarının gelişimi ve kemik iliğinin baskılanmasıdır. Anafilaksi ve bronkodilatatör gerektiren nefes darlığı, tedavi gerektiren hipotansiyon, anjiyoödem ve/veya genelleştirilmiş ürtiker gibi şiddetli aşırı duyarlılık reaksiyonlarının önlenmesi için, hastaların infüzyon öncesi kortikosteroidler, difenhidramin ve H2 antagonistleri ile premedikasyonu gerekir. Minör aşırı duyarlılık reaksiyonları arasında kızarıklık, nefes darlığı, hipotansiyon, cilt reaksiyonları ve taşikardi yer alır. Ciddi aşırı duyarlılık reaksiyonlarının gelişmesi durumunda infüzyon durdurulmalıdır (Morgan ve ark., 2011; Banerji ve ark., 2014).

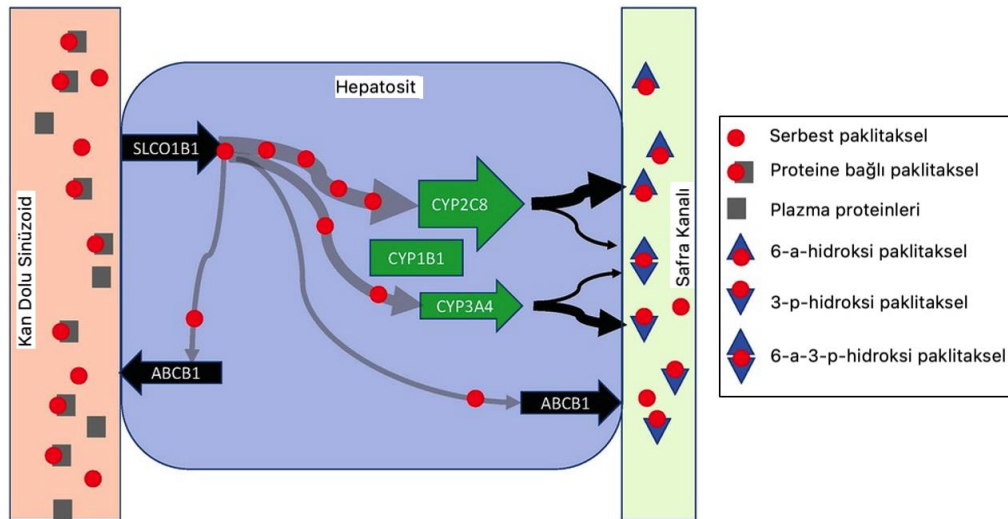
Paklitakselin alopesi, bulantı, kusma, halsizlik, mukozit, nötropeni, lökopeni, anemi, aşırı duyarlılık reaksiyonları, artralji, miyalji, periferik nöropati gibi yaygın yan etkileri vardır (Brewer ve ark., 2016). Daha az görülen yan etkilere örnek olarak ise kızarıklık, deri döküntüsü, ödem, hipotansiyon, stomatit, trombositopeni, kanama, alkalen fosfataz (ALP) ve aspartat transaminaz (AST) artışı, enjeksiyon bölgesinde reaksiyon, serum kreatinin artışı verilebilir. İnfüzyona bağlı bradikardi ve/veya hipertansiyon da görülebilir. Bu olası yan etkiler nedeniyle infüzyonun özellikle ilk saatinde hastanın sık sık takip edilmesi önerilir (Marupudi ve ark., 2007).

2.3.3. Paklitakselin Farmakokinetiği

Paklitakselin plazma klirensi bifaziktir. Plazma konsantrasyonundaki ilk hızlı düşüş, ilacın merkezi bölmeye dağılımının ve eliminasyonunun bir sonucudur. İkinci faz ise ilacın periferik bölmeden geri dağılımının sonucudur. Farmakokinetiği yüksek standart sapma gösterir. Terminal yarı ömür 1,3–8,6 saat (ortalama 5 saat) aralığındadır. İlaç, sitokrom P450 (CYP450) (izoenzim CYP3A ve CYP2C) aracılı yoğun hepatik metabolizmaya uğrar. Esas olarak CYP2C8 tarafından büyük ölçüde inaktif metabolit 6-hidroksipaklitaksele ve daha az derecede CYP3A4 tarafından 3-fenil-hidroksipaklitaksele metabolize edilir (Şekil 2-10). Değişmemiş formdaki ilacın

%10'dan azı idrarla, çoğu ise dışkıyla atılır. Paklitakselin %90'dan fazlası hızla ve geniş ölçüde plazma proteinlerine bağlanır (Cresteil ve ark., 2002; Alves ve ark., 2018).

Paklitaksel, MDR1 (P-gp), BCRP ve MRP1/2 dahil olmak üzere çoklu ilaç direnciyle ilişkili ATP bağlayıcı kaset (ABC) efluks taşıyıcıları için bir substrattır (Şekil 2-10). Paklitakselin ABC taşıyıcıları aracılı olarak bağırsak lümenine geri atılması, oral biyoyararlanımının çok düşük olmasını ve intravenöz uygulama gerekliliğini açıklamaktadır. İnfluks taşıyıcı OATP1B3'ün paklitakselin hepatik alımında rol oynadığı gösterilmiştir ve paklitaksel aynı zamanda renal OAT2 (SLC22A7) için de bir substrattır. Bu hepatik ve renal taşıyıcıların aktivitesi, paklitakselin dağılımı ve eliminasyonunda önemli bir rol oynayarak ilacın farmakokinetiğindeki değişkenliklere katkıda bulunabilir (Stage ve ark., 2018).



Şekil 2-10: Paklitakselin metabolizması- Johnson ve ark., 2023'ten.

ABCB1: Çoklu ilaç direnci proteini 1, CYP1B1: Sitokrom P450 ailesi 1- alt aile B üyesi 1, CYP2C8: Sitokrom P450 ailesi 2 -alt aile C üyesi 8, CYP3A4: Sitokrom P450 ailesi 3 alt aile A üyesi 4, SLCO1B1: Çözünen taşıyıcı organik anyon taşıyıcı aile üyesi 1B1 (OATP1B1).

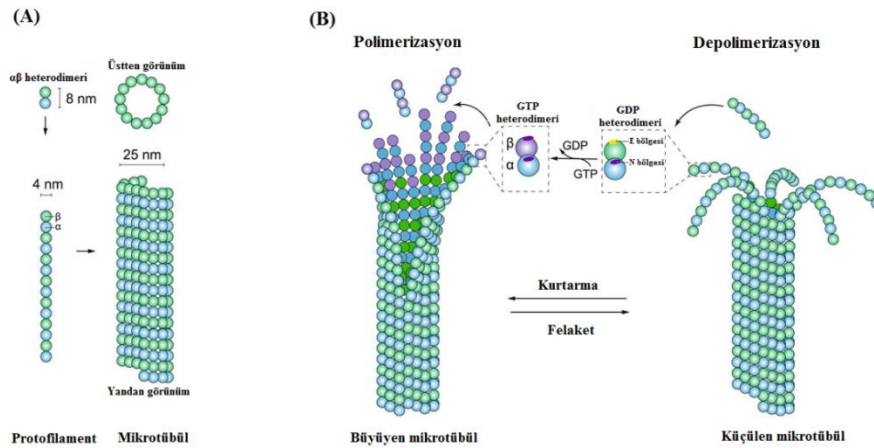
2.3.4. Paklitakselin Etki Mekanizması

2.3.4.1. Mikrotübül Stabilizasyonu

Mikrotübüller, hücre iskeletinin ana bileşenlerini oluşturan, ince filamentli tüpler şeklinde düzenlenmiş, α -tübülün ve β -tübülün heterodimerlerinden oluşan protein polimerleridir. Hücreye özgü şeklin oluşumunda ve devamlılığının sağlanmasında,

hücre içi taşımada ve sinyal iletiminde, hücre bölünmesinde ve mitozda oynadıkları roller nedeniyle tüm ökaryotik hücrelerde hayati öneme sahiptirler (Jordan ve Wilson, 2004) . Mikrotübüllerin bu hayati önemi nedeniyle, mikrotübül oluşumu kanser tedavisi için geliştirilen çok sayıda doğal ve sentetik molekül tarafından hedef alınan mekanizmalardan biridir.

Paklitaksel, ilk tanımlanan mikrotübül stabilize edici ajandır ve mikrotübüllerdeki β -tübülün alt birimine bağlanır. Paklitaksel, komşu mikrotübül alt birimler arasındaki ara yüzde spesifik olarak β -tübülün ile taksan bağlayıcı bölge üzerinden etkileşime girer ve mikrotübüllerde (protofilamentler arasında) yanıl temasların kurulmasında rol oynayan anahtar bir element olan M-döngüsü (loop) üzerindeki spesifik kalıntılarla hidrojen bağları oluşturur. Bu etkileşim β -tübülün alt ünitesinde konformasyonel değişikliklere neden olarak mikrotübülün kendisinde yapısal değişikliklere yol açar. Bu konformasyonel değişiklikler, mikrotübül depolimerizasyonunda kritik bir adım olan protofilamentlerin eğriliğinin önlenmesinde çok önemlidir (Wang ve ark., 2023) (Şekil 2-11).

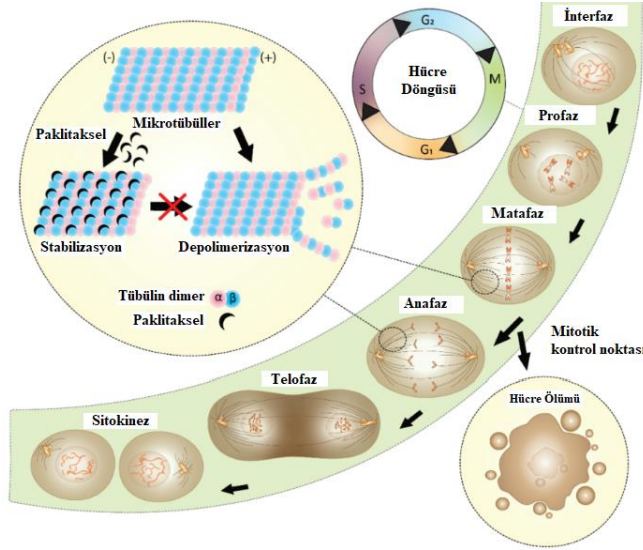


Şekil 2-11: Mikrotübül yapısı ve dinamikleri-Wang ve ark., 2023'den.

(A) Mikrotübül yapısı. (B) Polimerizasyon-depolimerizasyon döngüsü. GDP: Guanozin difosfat, GTP: Guanozin trifosfat.

Paklitakselin mikrotübüllere bağlanması, mikrotübülleri stabilize ederek polimerizasyonu artırır ve hücre ölümüne yol açar. Ayrıca bu stabilizasyon G2/M fazında somatik hücre mitozunu durdurur ve hücreleri apoptoza sürükler (Şekil 2-12) (Schiff ve Horwitz, 1980; Parness ve Horwitz, 1981). Taksanlar çözünür formdaki tübülünlere zayıf, mikrotübül yapısındaki tübülünlere ise yüksek afinite ile bağlanırlar.

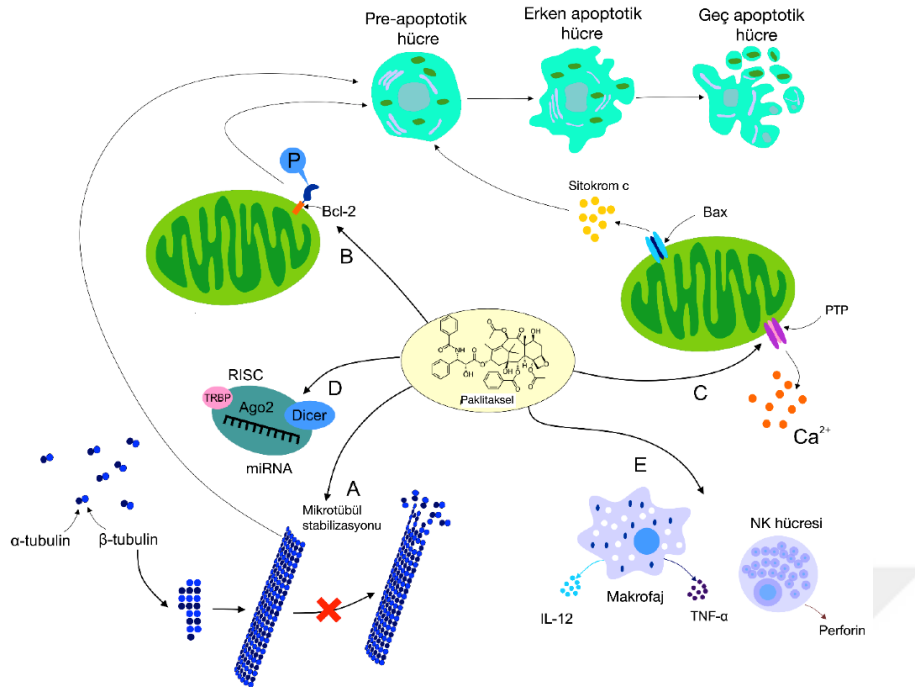
Mikrotübül stabilizasyonu için gerekli çok sayıda taksan molekülünün aksine, çok az sayıda paklitaksel molekülü güçlü bir stabilizasyon için yeterlidir (Derry ve ark., 1995).



Şekil 2-12: Paklitakselin mikrotübül oluşumu üzerine etkisi-Škubník ve ark., 2021'dan

2.3.4.2. Apoptozun İndüksiyonu

Apoptoz, embriyojenez ve yetişkin doku homeostazının sağlanması gibi normal fizyolojik süreçlerde aktif rol alan, sıkı bir şekilde düzenlenen ve evrimsel olarak korunmuş bir hücre ölüm yoludur. Apoptoz aynı zamanda bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak işlev görür. Apoptoz, hücreler tarafından onarılamayan DNA lezyonları oluşturan kanser ilaçlarına ve/veya radyoterapi dahil olmak üzere birçok uyarana, enfeksiyona veya hücre hasara karşı verilen normal fizyolojik bir tepkidir. Kanser ilaçlarının etkinliği yalnızca neden oldukları hücre hasara değil, aynı zamanda kanser hücrelerinde apoptozu aktive etme yeteneklerine de bağlıdır (Morana ve ark., 2022). Paklitakselin kanser hücrelerindeki ana hedeflerinden biri de apoptozdur ve paklitaksel hem ekstrinsik hem de intrinsik sinyal yollar aracılığıyla apoptozu indüklemektedir (Şekil 2-13).



Şekil 2-13: Paklitakselin etki mekanizması-Abu Samaan ve ark., 2019'dan.

(A) Mikrotübülün stabilizasyonu, hücre döngüsünün durması ve ardından apoptoz, (B) Anti-apoptotik protein Bcl-2'nin fosforilasyonu ve etkisiz hale getirilmesi, (C) Mitokondriden sitokrom c salınımı, (D) Tümör ilerlemesinin modülasyonu ile ilişkili miRNA'ların düzenlenmesi, (E) Bağışıklık tepkisinin aktivasyonu.

Tümör baskılayıcı (supresör) genlerin aktivasyonu

Tümör baskılayıcı genler (TBG), tümör gelişiminin ve büyümesinin baskılanmasında anahtar role sahiptir ve kanser olgularında çeşitli TBG'de çeşitli mutasyonların olduğu bildirilmiştir. *BRCA1*, *p53*, *PTEN*, *p21*, *BAX*, Fas ile ilişkili ölüm domaini (*FADD*) gibi bazı tümör baskılayıcı genler apoptozun indüklenmesinde rol oynarlar (Xu ve ark., 2016). Paklitakselin *BRCA1*/JNK ve *p38* yoluyla apoptozu indükleyebileceği belirtilmiştir. Yine bazı kanser hücrelerinde, *PTEN* ve *p53* genlerinin paklitaksel tarafından aktive edilerek apoptozun indüklendiği ifade edilmektedir. Ayrıca, paklitakselin kanser hücrelerinde aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini tetikleyerek de *PTEN* aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Gilmore ve ark., 2004; Li ve ark., 2011; Wang ve ark., 2016).

Reaktif oksijen türlerinin üretimi

ROS, yeni mutasyon oluşumuna neden olur ve anjiyogenezi arttırabilir. Bununla birlikte, kanser tedavisi sırasında kanserli hücrede büyük miktarda ROS üretimi DNA'da ve diğer kritik organellerde onarılamaz hasarların oluşumuna, tümör

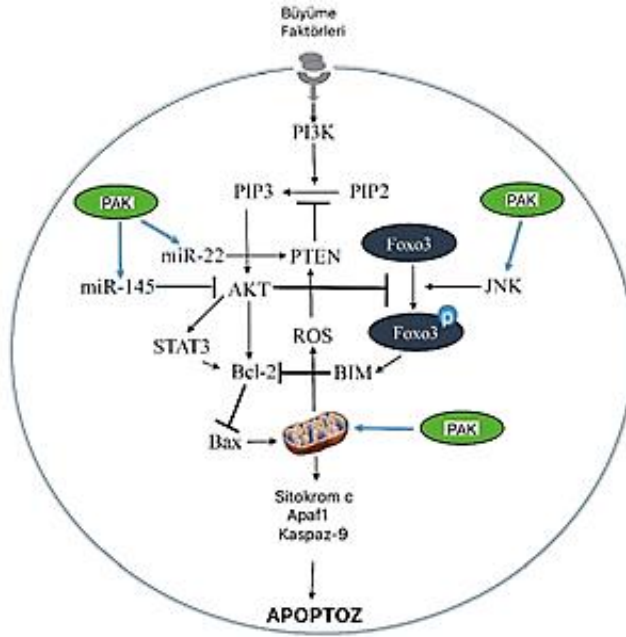
büyümesinin inhibisyonuna yol açabilir (Zhao ve ark., 2022). Paklitaksel, endojen ROS üretimini arttırarak kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesine neden olur (Lin ve ark., 2000). Yapılan çalışmalarda, paklitakselin seramid, p38, JNK ve AMPK aktivasyonuna yol açan ROS bağımlı bir yol ile apoptozu indüklediği belirtilmiştir (Sun ve ark., 2011; Liu ve ark., 2015). Buna ek olarak, AMPK'nin aktivasyonu da p53 (apoptoz indükleyicisi) aktivitesinde artışa yol açarak apoptozu tetikler (Adamovich ve ark., 2014). ROS üretimi aynı zamanda endoplazmik retikulum stresinin artmasına ve buna bağlı olarak, AMPK gibi bazı apoptotik sinyallerin indüklenmesine neden olur ki bu durum da apoptozu tetikleyebilir (Huang ve ark., 2011; Young ve ark., 2013).

Kalsiyum sinyal artışı

Paklitaksel, mitokondriyal geçirgenlik geçiş poru (MGGP) yoluyla mitokondriyal rezervden kalsiyum iyonlarının tükenmesine neden olur. Kalsiyum iyonlarının mitokondriden salınımı, apoptozu başlatmak üzere sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasını sağlayan MGGP'yi indükler (Abu Samaan ve ark., 2019). MGGP'nin indüksiyonu birikmiş Ca^{+2} salınımı da dahil olmak üzere mitokondri ve sitozol arasındaki metabolik değişimlerin bozulmasına yol açmakla kalmayacak, aynı zamanda mitokondrinin şişmesine de neden olacaktır. Mitokondriyal matris genişledikçe dış zar üzerine baskı uygular ve zar sonunda yırtılır. Bu olay, apoptotik hücre ölümünü başlatma potansiyeline sahip sitokrom c ve diğer pro-apoptotik proteinleri serbest kalmasına yol açar (Halestrap, 2009).

PI3K/AKT yolunun hedeflenmesi

PI3K/AKT yolu, *BCL-2*, *STAT3*, *NF-κB* ve *COX-2* gibi anti-apoptotik genlerinin aktivasyonlarında anahtar bir role sahiptir ve bu yolunun aşağı regülasyonu, kanserde önemli bir hedeftir. Paklitaksel, PTEN aktivasyonu yoluyla AKT fosforilasyonunu ve ekspresyonunu azaltır (Wang ve ark., 2016) ve ayrıca miR-145'in düzenlenmesini indükleyerek AKT ekspresyonunun inhibisyonuna neden olur ve hücreleri apoptozla sürekler (Papadopoulos ve Scorilas, 2015; Xin ve ark., 2021). Paklitaksel, AKT'nin inhibisyonu ve c-Jun NH2-terminal kinaz 1/2'nin (JNK1/2) uyarılması aracılığı ile FOXO3'ü uyarır. Paklitaksel tedavisini takiben JNK1/2'nin uyarılması da ayrıca AKT'yi inhibe eder ki bu durum FOXO3a'nın aktivasyonuna ve nükleusa hareketine neden olur ve hücrelerde apoptoz indüklenir (Sunters ve ark., 2006) (Şekil 2-14).



Şekil 2-14: Paklitakselin P13K/AKT yolu üzerinden apoptozu indüklemesi-Zhao ve ark., 2022'den.

AKT: Protein kinaz B, Apaf1: Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1, Bax: Bcl-2 ile ilişkili X proteini, Bcl-2: B-hücre lenfoma 2, BIM: Bcl-2 benzeri protein 11, Foxo3: Forkhead kutu proteini O3, JNK: Jun N-terminal kinase, miR: Mikro RNA, PAK: Paklitaksel, PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat, PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat, PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz PTEN: Fosfataz ve tensin homoloğu, ROS: Reaktif oksijen türleri, STAT3: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3.

BCL-2 fonksiyonunun tersine çevrimi

Paklitakselin, anti-apoptotik bir protein olan BCL-2'nin aktivitesinde tersine bir değişime neden olarak BCL2'yi proapoptotik bir faktöre dönüştürdüğü bulunmuştur (Haldar ve ark., 1996). Bu dönüşümün temelini ise, paklitakselin nükleer yetim reseptör Nurr77 ile olan yapısal benzerliği oluşturur. Paklitaksel, bu benzerlik sayesinde Nurr77'yi taklit eder ve BCL-2'nin N-terminal halkasına bağlanarak, BCL2-homoloji 3 alanını ortaya çıkarmak üzere konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Oluşan bu konformasyonel değişimle birlikte BCL-2 fosforilasyona uğrar ve mitokondriden sitokrom c salınımını indükleyerek proapoptotik bir etki gösterir (Lin ve ark., 2004; Ferlini ve ark., 2009).

2.3.4.3. Epigenetik Düzenleme

MikroRNA'lar (miRNA'lar), 18-25 nükleotid uzunluğuna sahip kodlamayan RNA'lardır. Yüzlerce hedef genin ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alarak hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz gibi temel biyolojik süreçlerde önemli düzenleyici roller üstlenebilirler. miRNA ekspresyonunun düzensizliği, tümör oluşumu,

kanserin ilerlemesi ve metastaz ile ilişkilidir (Yanokura ve ark., 2020). Paklitakselin, HER(+) meme kanseri hücrelerinde KRAS ve HER3'ü hedef alan tümör baskılayıcı potansiyele sahip let-7a ve miR-205 miRNA'ların, ekspresyon seviyelerini arttırdığı görülmüştür (Asghari ve ark., 2018). Yine paklitakselin metronomik tedavisinin, meme kanseri hücrelerinde let-7f miRNA seviyelerinin azalmasına neden olarak, anti-anjiyogenik potansiyel ile ilişkili trombospodin-1 (TSP-1) ekspresyonunun artışına katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Tao ve ark., 2015).

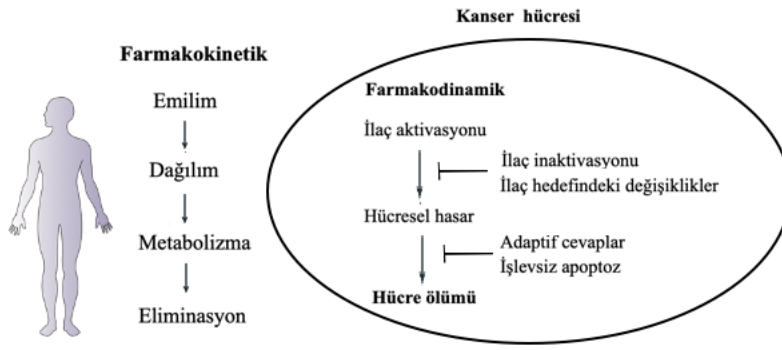
2.3.4.4. İmmün Sistem Aktivasyonu

Paklitaksel ve immün sistem arasındaki etkileşimler, hem tekli hem de kombine tedaviler (immünoterapi, radyoterapi gibi) için kritik öneme sahiptir. Paklitakselin, makrofajları anti-tümör sitokinlerin salınması (TNF-alfa, IL-12 gibi) için uyardığı gösterilmiştir. Anti-tümör sitokinlerin salınımı sitotoksik T-lenfositleri (CTL), doğal öldürücü hücreler (NK) ve dendritik hücreler (DC) dahil olmak üzere anti-tümör immün hücrelerinin proliferasyonlarının ve aktivasyonlarının artışıyla ilişkilidir (Javeed ve ark., 2009).

2.4. Kanserde İlaç Direnci

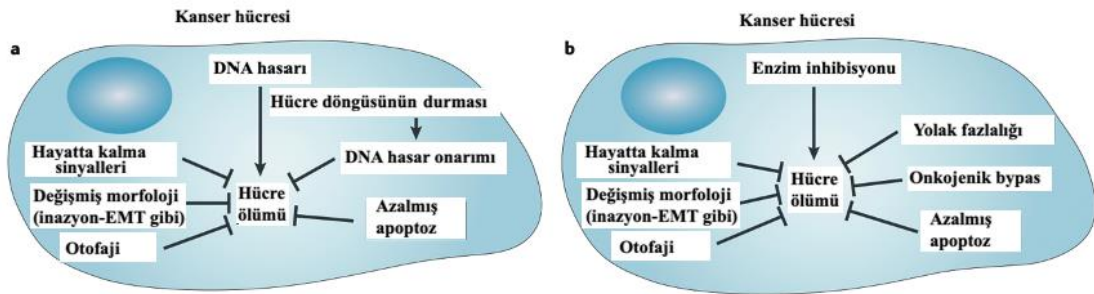
İlaç direnci, kanser tedavisinde başlıca kısıtlayıcı faktör olmaya devam etmekte ve ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Klinikte içsel (intrinsik) ve kazanılmış olmak üzere iki çeşit ilaç direnci vardır. Hücresel düzeyde intrinsik direnç, tedaviden önce tümör hücrelerinde bir direnç mekanizmasının varlığına bağlı olarak ortaya çıkarken, kazanılmış dirençte tümör hücrelerinin çoğunluğu başlangıçta tedaviye yanıt verir ancak zamanla ilaca karşı direnç gelişir (Burrell ve Swanton, 2014).

Tümör hücrelerinin adaptasyon yetenekleri son derece yüksektir ve ilaç direncinde çok çeşitli moleküler mekanizmalar rol oynamaktadır. Tümör hücreleri, ilacın hücre içerisine verimli bir şekilde alınamaması, artmış ilaç dışı atımı (efflux), hücre içinde ilacın inaktive veya metabolize edilmesi gibi çok sayıda farklı yol ile ilaca karşı direnç kazanabilirler (Şekil 2-15) (Holohan ve ark., 2013; Blair ve ark., 2014).



Şekil 2-15: İlaç direncinin genel prensipleri- Holohan ve ark., 2013'ten.

Yine, hayatta kalma sinyal yollarının aktivasyonu ve/veya ölüm sinyal yollarının etkisizleştirilmesi yoluyla ilaç direnci gelişebilir. Epigenetik değişiklikler, lokal tümör mikro çevresi, moleküler ve genetik heterojenite de dirence katkıda bulunan parametreler arasındadır. Birçok ilaca karşı oldukça dirençli olan kanser kök hücrelerinin varlığı da yine tedavi başarısızlığının nedenleri arasında sayılmaktadır (Şekil 2-16) (Holohan ve ark., 2013; Blair ve ark., 2014).



Şekil 2-16: İlaç direncini etkileyen alt faktörlerin özeti- Holohan ve ark., 2013'ten.

a. DNA hasarına neden olan kemoterapötik ajanların etkinliğinin sınırlandırılması. b. Spesifik hücrel enzimleri ve reseptörleri inhibe eden hedefe yönelik tedavilerin etkinliğinin sınırlandırılması.

İlaç direncini ortadan kaldırmak için tek ajanlı kemoterapi yerine, örtüşmeyen etki mekanizmalarına sahip farklı kemoterapötik ajanların kombine olarak uygulanması, büyüme faktörü destekli tedaviler, doz yoğunluklarına ve sürelerine yönelik bir dizi farklı yaklaşımlarla tedavilerde başarılar elde edilse de yetersiz kalmıştır. Cerrahi, radyoterapi ve polikemoterapi pek çok tümör tipini iyileştirmek için yeterli değildir ve kanserin biyolojik belirleyicileri anlaşılacak hedefe yönelik yeni tedavilerin geliştirilmesi zorunludur (Vasan ve ark., 2019).

2.4.1. Tümör Yüğü ve Büyüme Kinetiğı

Teşhis anındaki tümör yüğü (boyutu), prognozu tahmin etmek için en sık kullanılan değışkendir. Tümör yüğü ile tedavi edilebilirlik arasında neredeyse evrensel bir ilişki vardır ve büyük tümörler artan metastatik riskle ilişkilidir (Fisher ve ark., 1969). Tümör boyutu ilaç direncinin kritik bir belirleyicisi olmasına rağmen, tümörün büyüme hızı ve tedavi ile indüklenen büyüme kinetiğindeki değışiklikler de terapiye dirençte önemli bir role sahiptir. Tümörün büyüme kinetiğı, yavaştan agresife farklı değışkenlikler sergiler. Düşük büyüme oranlarına sahip tümörler genellikle uzun sağkalım ile ilişkilendirilse de, tipik olarak kemoterapi ve hatta hedefe yönelik tedavilerle tedavi edilemezler. Buna karşın, yüksek hızlarda büyüyen tümörler, kemoterapiye son derece duyarlı olabilirler (Vasan ve ark., 2019).

İlaç ile tedavi sonrası kanserin büyümesini veya gerilemesini belki de en iyi açıklayan ve katı tümörlerin çoğı için geçerli olan model “Norton-Simon” hipotezidir. “Gompertzian” büyüme eğrisine dayanan bu modele göre, tümörler sigmoidal bir büyüme gösterirler. Düşük tümör yükleri ilk aşamada katlanarak daha hızlı ve ardından daha büyük bir boyuta ulaştıkça daha yavaş bir büyüme oranı sergileyerek plato yapar. Kemoteraprötikler tümör boyutunu küçülttüğü için büyüme kinetiğini etkilemiş olurlar ve tek bir kemoterapi uygulamasından sonra, kalan tümör hücreleri sigmoidal büyümenin erken fazına dönebilirler (Laird, 1964; Norton ve ark., 1976; Norton ve Simon, 1977). Tedaviler arasında tümörün hızlı bir şekilde yeniden büyümesini önleyip eradikasyon olasılığının en üst düzeye çıkarılması amaçlanmıştır. Bu da doz-yoğun kemoterapi (en etkili dozun en kısa zaman aralığında verilmesi) kavramını doğurmuş ancak ilaç tedavisinde yeterli olamamıştır.

2.4.2. Tümör Heterojenitesi

Tümör heterojenitesi, primer tümör ve metastazları içinde veya aynı histopatolojik alt tipteki tümörler arasında farklı biyolojik davranışlar barındırabilen farklı genotiplere ve fenotiplere sahip hücre alt popölasyonlarının varlığını ifade eder ki bu durum hastalığın prognozunu ve tedaviye yanıtını etkiler (Fisher ve ark., 2013). Bu nedenle, tümör heterojenitesini anlamak ilaç direncinin anlaşılmasında çok önemlidir. Tümör heterojenitesi, tümörlerin doğal seyri içerisinde görülen önemli bir durumdur ve birçok farklı seviyede, bir dizi farklı faktöre bağılı olarak gözlemlenebilir. İlk olarak hücresel düzeyde (hücreler arası heterojenite) meydana gelen heterojenlik, herhangi bir

hücre klonunun/veya klonlarının seçici büyümesiyle değişen derecelerde klonal heterojenliği ortaya çıkabilir. Alt klonlar ise genişleyebilir ve gelişebilir veya dallanmış evrimsel yörüngeleri izleyerek birbirinden giderek ayrılmaya devam edebilir (Burrell ve Swanton, 2014).

Tümör heterojenitesi, tümör içi (intratümöral) ve tümörler arası (intertümöral) olmak üzere ikiye ayrılır. İntratümöral heterojenitede, tek bir tümör içinde farklı moleküler profillere sahip birkaç alt klonun bir arada bulunması durumu mevcutken, intertümöral heterojenite ise, aynı hastadaki farklı lokasyonlarda veya farklı hastalardan alınan tümörler arasında moleküler farklılıklar vardır (McGranahan ve Swanton, 2017).

Tümör heterojenliği ya doğrudan terapötik hedefleri etkiler ya da transkriptom ve fenotipik özellikleri tanımlayarak tedavi direncini etkilemek için tümör mikro çevresini değiştirir. Meme kanseri hastalarında yapılan bir araştırmada, yüksek tümör heterojenitesine sahip bireylerin düşük heterojeniteye sahip bireylere kıyasla tedaviye direnç geliştirme olasılığının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (McDonald ve ark., 2019). Yine yumurtalık kanseri hastalarında yürütülen bir çalışmada, belirgin heterojeniteye sahip bireylerde platin bazlı tedaviye direnç geliştirme olasılığının daha yüksek olduğu keşfedilmiştir (Patch ve ark., 2015).

2.4.3. İlaç Taşınımı ve Metabolizması

2.4.3.1. İlaç İnaktivasyonu

Kanser ilaçlarına karşı gelişen direnç mekanizmalarından biri, ilacın biyotransformasyonu aşamasında meydana gelen değişimlerdir. İlaç biyotransformasyonu iki aşamada (Faz 1 ve Faz 2) gerçekleşir. Sitokrom P450 (CYP450) ve daha az ölçüde flavin içeren monooksijenazlar (FMO) aracılığı ile gerçekleşen Faz 1 aşamasında, ana ilaç, redoks reaksiyonları, dealkilasyonlar gibi reaksiyonlara girer ve ilacın kimyasal yapısı değişerek suda daha çözünür hale gelir. Faz 2 aşamasında ise, ilacı detoksifiye etmek ve daha polar, inert ve suda çözünür bir forma dönüştürmek için konjugasyon reaksiyonları gerçekleşir, böylece oluşan ilaç metabolitleri vücuttan atılır. Faz 2 biyotransformasyon reaksiyonları, UDP-glukuronoziltransferazlar (UGT'ler), sülfotransferazlar (SULT'ler), N-asetiltransferazlar (NAT'ler) ve glutatyon S-transferazlar (GST'ler) dahil olmak üzere çok sayıda enzim ailesini içerir. Konjugasyon reaksiyonları sonucunda, ilaç detoksifiye edilir ve buna bağlı olarak aktivasyon kapasitesi azalır (Crettol ve ark., 2010).

CYP1B1 izoenziminin meme kanseri hastalarında yüksek derecede eksprese edildiği ve tamoksifene karşı gelişen dirençle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Başka bir CYP izoenzimi olan CYP2D6'nın bozulmuş ekspresyonunun, tamoksifen direnci ile bağlantılı olabilecek önemli bir faktör olduğu ifade edilmektedir. Kronik lenfositik lösemili hastalarda artmış UGT2B17 ekspresyonunun ilaç direncine sebep olması nedeniyle kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (de Souza ve Olopade, 2011). Glutasyon S-transferazlar (GST) ile birlikte glutasyon, ksenobiyotiklere ve kanser ilaçlarına karşı vücudun ana savunma mekanizmasıdır. Glutasyonun, sisplatin, doksorubisin gibi kanser ilaçlarının detoksifikasyonunda görev aldığı ve ayrıca bu ilaçların neden olduğu DNA hasarının onarılmasına da yardımcı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, glutasyon, gerek ilaçların inaktivasyonu gerekse DNA hasar onarımına olan katkısıyla kemoterapi etkilerine maruz kalan tümör hücrelerinin hayatta kalma olasılığını arttırarak ilaç direncine yol açar. (Kannampuzha ve Gopalakrishnan, 2023).

2.4.3.2. İlaç Dışa Atımı

ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı ailesi, çok sayıda kemoterapötik ajanın plazma zarı boyunca akışını düzenleyen ve kemoterapötiklere karşı gelişen dirençle ilişkili olan bir protein ailesidir. Bu proteinleri kodlayan genlerin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler veya taşıdıkları mutasyonlar ilaç direncine sebep olan faktörler arasında yer almaktadır. 49 üyeden oluşan bu ailenin özellikle üç üyesi çoklu ilaç direnci (MDR) ile ilgili olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bunlar; MDR protein 1 (P-glikoprotein, ABCB1), MDR ile ilişkili protein 1 (MRP1, ABCC1) ve meme kanseri direnç proteini (BCRP, ABCG2) dir. Bu üç protein, örtüşen substrat özgüllüğü gösterir ve taksanlar, topoizomeraz inhibitörleri gibi kemoterapötikler dahil çeşitli hidrofobik bileşiklerin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar (Holohan ve ark., 2013).

MDR1 aşırı ekspresyonunun böbrek, kolon, karaciğer kanserleri, lösemi ve lenfoma dahil birçok kanserde, MRP1'in aşırı ekspresyonu ise prostat, akciğer ve meme kanserinde görülen kemorezistans ile ilişkilendirilmiştir (Nooter ve ark., 1997; Zalcberg ve ark., 2000; Triller ve ark., 2006). BCRP ise, meme kanseri ve lösemide gelişen ilaç direnci ile ilişkilidir (Doyle ve ark., 1998, Robey ve ark., 2007).

2.4.4. DNA Hasar Onarımı

Sağlıklı hücrelerde, DNA üzerinde oluşan hasarların onarımından ve genom stabilitesinin devamlılığından sorumlu çeşitli mekanizmalar vardır. Bununla birlikte, oluşan hasarın giderilememesi, yanlış DNA onarımı, hasarlı DNA'ya karşı hücresel tolerans gelişimi gibi durumlar hücreyi mutajeneze sürükleyerek DNA lezyonlarına sahip hücrenin hayatta kalmasıyla sonuçlanabilir. Birçok kemoterapötik ilacın temel özelliği, DNA hasarı oluşturmak suretiyle hücre ölüm yolu olan apoptozu indüklemektir. Artmış DNA hasar onarım mekanizmaları, kemoterapinin neden olduğu DNA hasarının onarılmasını sağlayarak ilaca karşı direnç gelişimine sebep olur. İlaç direncindeki bir diğer potansiyel mekanizma ise DNA hasarına karşı gelişen toleranstır ve burada DNA replikasyonu sırasında bu lezyonlarının onarılması yerine onları atlayarak DNA zincirlerini kopyalama süreci devam eder (Salehan ve Morse, 2013). Yapılan pek çok çalışmada, çeşitli kanser türlerinde *TRIP13*, *XRCC4* benzeri faktör (*XLF*), *FOXM1*, flap endonükleaz 1 (*FEN1*) ve glikojen sentaz kinaz-3 β (*GSK-3 β*) gibi DNA hasar onarımıyla ilişkili genlerin yüksek düzeyde eksprese edildiği ve ilaç direncine neden olduğu bildirilmiştir (Kannampuzha ve Gopalakrishnan, 2023).

2.4.5. İlaç Hedefindeki Değişiklikler

Hedefe yönelik ilaçlar, geleneksel kemoterapötiklere kıyasla, kanser ile ilişkili spesifik hedef proteinlerin aktivitesini inhibe edip kanser hücrelerinin çoğalmasını durdururlar bu nedenle daha seçici ve etkilidirler. İlaç hedeflerinde, ikincil bir mutasyon ve/veya epigenetik değişikliklere bağlı olarak ekspresyon seviyelerinde değişiklikler meydana gelebilir ki bu durum ilaç direncine sebep olur. Bu direnç mekanizmasına örnek olarak küçük hücre dışı akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan, epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) hedefleyen erlotinib ve gefitinibe (tirozin kinaz inhibitörleri) karşı gelişen direnç verilebilir. Tedavinin başlangıcında alınan yüksek yanıt oranına rağmen, yanıt veren hastaların neredeyse %50'sinde ilk bir sene içerisinde *EGFR*'de bir T790M mutasyonu gelişir ve bu değişim dirençle sonuçlanır (Wang ve ark., 2019). ER(+) meme kanserinin anti-östrojenik (tamoksifen gibi) tedavisi sırasında da, tümör hücrelerinde ER'lerin belirgin derecede kaybı nedeniyle hastalar endokrin tedaviye dirençli hale gelir (kanser hücreleri büyümeleri için artık östrojene bağımlı değildir) (Luqmani, 2005).

2.4.6. Akış Aşağı Direnç Mekanizmaları

Yeterli miktarda aktif ilaç birikip hücrel hedeflerini etkiledikten sonra, tedavinin sonucu kanser hücresinin nasıl tepki verdiğiine bağlıdır. İdeal olan, ilaca bağlı oluşan hücrel hasarın, hücre ölümünün indüklenmesiyle sonuçlanmasıdır. Bunun yanında, kanser hücresinin hayatta kalmasını destekleyen çok sayıda içsel yanıt da tetiklenebilir. Bu dönüşüm sürecinin bir parçası olarak, apoptoz yoluyla hücre ölümünü düzenleyen sinyal yolları sıklıkla işlevsiz hale gelir; bu da, kanserin klasik özelliklerinden biridir (Hanahan ve Weinberg, 2000).

2.4.6.1. İlaça Bağlı Apoptozdan Kaçınma

Tümör hücreleri onkojenik stres, genomik instabilite, hücrel hipoksi, kemoterapötiklere bağlı gelişen hasarlar dahil olmak üzere sürekli bir stres altındadır. Bu tür apoptotik uyarılara maruz kalma sonucunda apoptozun normal olarak aktive olması beklenir ancak, kanser hücrelerinde apoptotik yolları devre dışı bırakan birçok mekanizmanın varlığı söz konusudur ki bu durum kanser hücrelerinin apoptozdan kaçınması ile sonuçlanır. Kanser hücreleri anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırarak ve/veya pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu azaltarak, sırasıyla anti-ve/veya pro-apoptotik proteinleri stabilize ederek ve/veya destabilize ederek apoptozdan kaçınabilir. Yine bu hücreler, fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar ile anti- veya pro-apoptotik proteinlerin fonksiyonlarını değiştirerek apoptozu inhibe edebilir (Fernald ve Kurokawa, 2013). İlaça bağlı olarak indüklenen apoptoza tümör hücresi duyarlılığı, pro-apoptotik ve anti-apoptotik sinyallerin dengesine bağlıdır ve pro-apoptotik süreçlerin bloke edilmesi veya artmış anti-apoptotik sinyaller hücreyi ilaç direncine sürükler (Fodale ve ark., 2011).

Kanser hücrelerinde özellikle anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinleri olmak üzere anti-apoptotik proteinlerin aşırı düzeyde ifade edildiği ve bu proteinlerin aşırı ekspresyonunun sıklıkla kötü prognoz, metastaz ve kanser terapötiklerine karşı direnç ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Taniai ve ark., 2004; Wulleme-Toumi ve ark., 2005; Yu ve ark., 2015). Hücreyi, apoptozdan kaçma yoluna sürükleyen bir başka mekanizma da, PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonudur. Bu sinyal yolu, apoptozu inhibe etmede ve hücre sağ kalımına yol açmada önemli bir rol oynar (Neophytou ve ark., 2021). Küçük hücre dışı akciğer kanserinde, paklitaksel tedavisine direncin aşırı AKT ekspresyonuna bağlı olabileceği ve AKT'nin, BAD'nin Ser136/Ser112'deki

fosforilasyon sürecini destekleyerek apoptozu engellediği belirtilmektedir (Liu ve ark., 2020). Bir tümör supressor protein olan p53'te, apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. p53 modifikasyonları varlığında, hücreler apoptozdan kaçabilir ve kemoterapötik ilaçların neden olduğu DNA hasarına karşı daha dirençli hale gelir (Levine, 1997).

2.4.6.2. Otofaji

Otofaji, metabolik stresler sırasında hücrel biyosentezi ve canlılığı sürdürmek için organelleri ve proteinleri parçalayan bir lizozomal bozunma yoludur. Hem baskılıyıcı rolü ile tümörün başlamasını engellemesi hem de kemoterapötik ajanların neden olduğu metabolik stresler sırasında kanser hücrelerinin hayatta kalmasını kolaylaştırarak bir ilaç direnç mekanizması olarak işlev görmesi nedeniyle kanserdeki rolü paradoksaldır (White, 2012). Bir otofaji inhibitörü olan klorokin ile tedavi edilen fare lenfoma modelinde, otofajinin baskılanmasının ilaç yanıtını arttırarak tümörün gerilemesini arttırdığı, yine hidroksiklorokin ile otofajinin inhibe edilmesi yoluyla insan kanser hücrelerinin ilaca duyarlı hale geldiği belirtilmiştir (Amaravadi ve ark., 2007; Sasaki ve ark., 2010).

2.4.7. Direnci Teşvik Edici Adaptif Cevaplar

2.4.7.1. Hayatta Kalma Sinyalinin Aktivasyonu

Hücre hayatta kalma yolları genellikle protein tirozin kinazlar (PTK'ler) tarafından düzenlenir. EGFR tirozin kinaz aktivasyonu, çeşitli kemoteraplere karşı gelişen bir direnç mekanizmasıdır. Bu nedenle, EGFR hedefli tedavilerin çeşitli tümör tiplerini 5-FU, irinotekan ve paklitaksel gibi ajanlara karşı duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Holohan ve ark., 2013). Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT ve STAT'ların (sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri) aracılık ettiği sinyal yolları da hayatta kalma yollarına örnektir. AKT yolunun aktivasyonu, apoptozu birçok düzeyde inhibe eder. AKT, proapoptotik BAD'i doğrudan inhibe edebilir ve aynı zamanda nükleer faktör-B (NFB) transkripsiyon faktörünün aktivasyonu veya proapoptotik Forkhead transkripsiyon faktörünün etkisizleştirilmesi yoluyla hücre hayatta kalımını destekler. Buna ek olarak, AKT, insan çift dakika-2'yi (HDM-2) fosforile edebilir, bu da HDM-2'nin çekirdeğe translokasyonuna ve p53 aracılı süreçlerin inhibisyonuna neden olur. STAT-3/-5'in PTK'ler tarafından fosforile edilerek aktive edilmeleri, anjiyogenezin, hücre döngüsünün ilerlemesinin ve hücre döngüsünde

rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonlarının artışına yol açar (Wilson ve ark., 2009).

2.4.7.2. Onkojenik “Baypas” ve Sinyal Yolunun Aşırı Aktivasyonu

Bazı durumlarda kanser ilacının birincil hedefinde herhangi bir değişim yoktur ve ilaç etkisini bu yolla göstermeye devam eder ancak alternatif bir kinaz yolu, adaptif bir geri beslenme döngüsüyle veya seçilen bir mutasyon nedeniyle aktive olur ki bu “onkojenik baypas” olarak adlandırılır (Holohan ve ark., 2013). Onkojenik baypasa en iyi örneklerden biri, HER3 ve PI3K/AKT yolu aktivasyonu ile EGFR hedefli ajanlara (tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlar) karşı gelişen adaptif dirençtir (Wheeler ve ark., 2008). Yine insan kanserlerinin yaklaşık %25’inde görülen aktive edici KRAS mutasyonları, pek çok kanser türünde kemoterapötik dirençten sorumludur (Jiao ve Yang, 2020). Bir serin/treonin kinaz olan BRAF, başta melanom olmak üzere pek çok kanserde sıklıkla mutasyona uğrayarak aktive olmuştur. Vemurafenib gibi bazı inhibitörler, BRAF’ın özellikle en yaygın mutant formu olan BRAF-V600E’ye hedeflenerek geliştirilmiştir. Ancak BRAF V600E mutasyonlu melanomda vemurafenibe klinik yanıt oranları yüksek olsa da (~%50), ikincil direnç her zaman gelişir (Chapman ve ark., 2011).

2.4.8. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG), iyi polarize olmuş epitel hücrelerinin geri dönüşümlü olarak apikal-bazal polaritelerini ve hücre-hücre bağlantılarını kaybederek, ileri hareketliliğe ve göç edici özelliklere sahip, iğ şeklinde mezenkimal benzeri bir morfoloji kazanmaları ile sonuçlanan fizyolojik bir süreçtir. Süreç, mezankimal genleri aktive epitelyal genleri ise inibe edebilen SNAIL, SLUG, TWIST ve ZEB gibi düzenleyiciler tarafından düzenlenir. Bu düzenlenmeler ve hücre dinamikler, embriyogeneze, yara iyileşmesine, doku rejenerasyonuna, fibroza, ilaç direncine, immün kaçışa ve metastaza eden olur (Jonckheere ve ark., 2022; Manfioletti ve Fedele, 2023). Yapılan bazı çalışmalarda meme kanseri hücrelerinde paklitaksel/dosetaksel ve 5-florourasile karşı gelişen direnç EMG’nin de eşlik ettiği, trastuzumab’a dirençli HER2 aşırı eksprese meme kanseri hücrelerinde EMG benzeri fenotipler gözlemlendiği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2016).

2.4.9. Tümör Mikro Çevresi

Tümör mikro çevresi (TMÇ), tümör hücrelerini çevreleyen ve bir vasküler ağ tarafından beslenen çeşitli hücre tiplerini (endotel hücreleri, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri vb.) ve hücre dışı bileşenleri (sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar, ekstrasülüler matriks vb.) ifade eder. TMÇ, yalnızca tümörün başlaması, ilerlemesi ve metastazı sırasında çok önemli bir rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda terapötik cevapla da yakından ilişkilidir. Tümör hücreleri ve TMÇ arasındaki karşılıklı etkileşimler, tümör hücrelerinin apoptozdan kaçarak direnç gelişmesine neden olur (Wu ve Dai, 2017). Bu direnç genellikle geçicidir, yalnızca tümör hücreleri TMÇ ile temas halindeyken ortaya çıkar ve tümör hücreleri bu mikro çevreden uzaklaştırıldığında ilaç direnci geri dönebilirler (Meads ve ark., 2009).

İlaç direnci, TMÇ kapsamında incelendiğinde; bazı spesifik proteinler ön plana çıkmaktadır. Bir kemokin olan stromal hücreden türeyen faktör 1 (SDF1), anti-apoptotik proteinler olan MYC ve BCL-XL'nin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olarak lösemi hücrelerinde ilaç direncini indükler (Chen ve ark., 2013). İnsan kolon kanserinde, SDF1 reseptörü olan *CXCR4* geni aşırı eksprese edilir ve lenf düğümlerinden gelen stromal hücreler, SDF1/CXCR4'e bağlı mekanizma ile 5-florourasil ve oksaliplatine karşı direnci destekler (Margolin ve ark., 2011). Bunun yanı sıra, melanoma hücrelerinde kanser ilişkili fibroblastlar (CAF) tarafından salgılanan hepatosit büyüme faktörü (HGF), MAPK ve PI3K/AKT sinyal yollarının aktivasyonuna yol açarak BRAF inhibitörlerine karşı gelişen dirençten sorumludur (Straussman ve ark., 2012). Yine insülin benzeri büyüme faktörü 1'in (IGF1), MAPK ve PI3K sinyal kaskadları yoluyla multipl miyelom (MM) hücrelerinin hayatta kalmasını, göçünü ve metastazını desteklemektedir (Qiang ve ark., 2002).

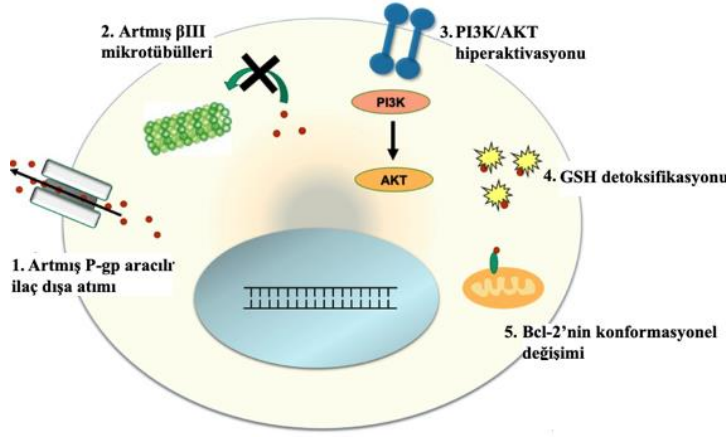
2.5. Kanserde Paklitaksel Direnci

Kanser tedavisinde görülen paklitaksel direnci ile ilişkili çeşitli mekanizmalar tanımlanmıştır (Şekil 2-17).

Bu mekanizmaları şu şekilde listeleyebiliriz:

1. P-glikoprotein aracılı ilaç atımında artış
2. Mikrotübül elemanlarındaki değişiklikler
3. PI3K/AKT hiperaktivasyonu

4. Glutasyon (GSH) aracılı detoksifikasyon
5. Bcl-2'nin konformasyonel değişiklikleri



Şekil 2-17: Paklitaksel direnci ile ilişkili mekanizmalar-Ortiz ve ark., 2022'den.

AKT: Protein kinaz B, Bcl-2: B-hücre lenfoma 2, GSH: Glutasyon, PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz, P-gp: P-glikoprotein.

2.5.1. P-Glikoprotein

Çoklu ilaç direnci, kanser hücrelerinde yapısal olarak ilgisiz sitotoksik ajanlara karşı gelişen çapraz dirençtir ve çoğu kanser türünde görülen ortak bir olgudur (Baldini, 1997). Kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncine bir dizi mekanizma neden olabilir ve bunlardan en iyi tanımlanmış olanı P-glikoproteini (Pgp) kodlayan *MDR-1* geninin aşırı ekspresyonudur. Pgp, taksanlar, vinka alkaloidleri, epipodofilotoksinler ve antrasiklinler dahil olmak üzere bir dizi amfipatik doğal ürünün hücreden dışarıya atımından ve bunlara karşı gelişen dirençten sorumludur (Gottesman, 1993). Paklitaksel, Pgp için ana substrattır ve Pgp'nin aşırı ekspresyonu paklitaksel direnciyle sonuçlanır. Yapılan çalışmalarda, paklitaksele dirençli hücre serilerinde *MDR-1* mRNA veya Pgp protein düzeylerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *MDR-1*'i aşırı eksprese eden paklitaksel dirençli kanser hücrelerinde, verapamil, siklosporin A gibi Pgp inhibitörleri ile paklitaksele duyarlılığın yeniden sağlandığı görülmüştür (Yusuf ve ark., 2003).

2.5.2. Mikrotübül Elemanları

Paklitakselin mikrotübül stabilize edici ajan olması nedeniyle, mikrotübül bileşimindeki değişiklikler paklitaksele karşı gelişen hücresel cevapta önemli bir rol oynar. Tübülün birden fazla izoforma sahiptir ve çoğunlukla β III izoformundan oluşan

mikrotübüller, β I ve β II mikrotübüllere kıyasla önemli ölçüde daha düşük stabilite gösterir (Maloney ve ark., 2020). Düşük mikrotübül stabilitesi, paklitakselin etkisini ortadan kaldırabilir ve hücre bölünmesine izin verebilir. Paklitaksele dirençli yumurtalık tümörlerinde, β III izoformunda 4 kata kadar bir artış olduğu ve bu artışın paklitaksel direncine neden olduğu bildirilmiştir (Kavallaris ve ark., 1997). Bununla birlikte, alfa- ve β -tübülinin ekspresyonunda meydana gelen değişimler, β -tübülin ekspresyon artışı, tübülünlerde meydana gelen mutasyonlar ve mikrotübül ilişkili proteinlerin ifade düzeylerindeki değişiklikler de taksan direnci ile yakından ilişkilidir (Murray ve ark., 2012).

2.5.3. Fosfatidilinositol 3-Kinaz/Protein Kinaz B (PI3K/AKT) Yolu

PI3K/AKT sinyal yolu, *BCL-2*, *STAT3*, *MCL-1*, *BCL-XL*, *NF- κ B* ve *COX-2* gibi anti-apoptotik genlerin yukarı regülasyonunda anahtar bir rol oynar. Bu sinyal yolu ayrıca, epitelyal-mezenkimal geçişin uyarılması ile de apoptozu baskılayabilir ve metaztazı indükleyebilir. PI3K/AKT yolunun aşırı aktivasyonu, yumurtalık ve meme kanseri de dahil birçok farklı kanserde, paklitaksel direncinin önemli bir nedenidir. PTEN (PI3K/AKT'nin negatif düzenleyicisi) fonksiyon kaybı, PI3K ve AKT hiperaktivitesi, PI3K/AKT kaynaklı direncin nedenleri arasındadır (Ortiz ve ark., 2022; Zhao ve ark., 2022). Ayrıca, artmış SOX2 (cinsiyet belirleyici bölge Y) seviyelerinin (Li ve ark., 2014; Li ve ark., 2015) ve tümör mikro çevresindeki artmış büyüme faktörlerinin salınımının, kanser hücrelerinde PI3K/AKT yolunun aktivasyonuna neden olarak paklitaksel direncine yol açtığı da bilinmektedir (Ying ve ark., 2015).

PI3K/AKT yolunun baskınlanması ile, kanser hücreleri paklitaksele duyarlı hale gelir (Du ve ark., 2013; Chen ve ark., 2018). Paklitakselin, PTEN aktivasyonu yoluyla PI3K/AKT'nin ekspresyonunu ve fosforilasyonunu azalttığı ve apoptozu arttırdığı bilinmektedir (Wang ve ark., 2016).

2.5.4. B hücreli Lenfoma 2 (BCL-2) Ailesi

BCL-2 ailesi, çok sayıda proteini barındırır ve apoptozda önemli bir yere sahiptir. BCL-2 ailesinin anti-apoptotik (*BCL-2*, *BCL-XL*, *MCL-1*, *BFL-1*, *BCL-W*, ve *BCL2L10*) ve pro-apoptotik (*BAX*, *BAK*, *BOK*) üyelerinin düzeylerinde değişiklikler, paklitaksel direnci ile ilişkilidir (Huang ve ark., 1997; Gazitt ve ark., 1998; Liu ve ark., 1998).

Yapılan çalışmalarda, artmış BAX ve BAD ifadesinin kanser hücrelerinin paklitaksele olan duyarlılığını arttırdığı (Strobel ve ark., 1996; Strobel ve ark., 1998), BCL-2 ve BCL-XL'nin aşırı ekspresyonunun ise paklitaksel direncine neden olduğu (Ibrado ve ark., 1997; Sharma ve ark., 2000; Sharifi ve ark., 2014) gösterilmektedir. Ancak BCL-2'nin aşırı ekspresyonunun paklitaksel direncine katkıda bulunmadığını öne süren (Ogretmen ve Safa, 1996; Luo ve ark., 2000) ve hatta yumurtalık kanserinde, BCL-2'nin paklitakselin bir hücre içi hedefi olduğu ve azalmış BCL-2 seviyelerinin taksan direncinde rol oynadığını ifade eden (Ferlini ve ark., 2003) çalışmalar da vardır.

Paklitaksel, genellikle anti-apoptotik bir protein olan BCL-XL'nin inhibisyonu ile apoptozda artışa yol açar (Yamanaka ve ark., 2004; Parrondo ve ark., 2013; Kasai ve ark., 2017). Ancak, paklitakselin BCL-XL'nin fosforilasyonunu indükleyebildiği ve paklitaksel tedavisini takiben apoptoz direncine yol açabileceği gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bunu engellemek adına paklitaksel ile kombinasyon halinde spesifik inhibitörler kullanılarak, BCL-XL ve MCL-1 inhibe edilebilir ve paklitakselin anti-tümör etkisini arttırabilir (Basu ve Halder, 2003; Flores ve ark., 2012).

2.5.5. p53

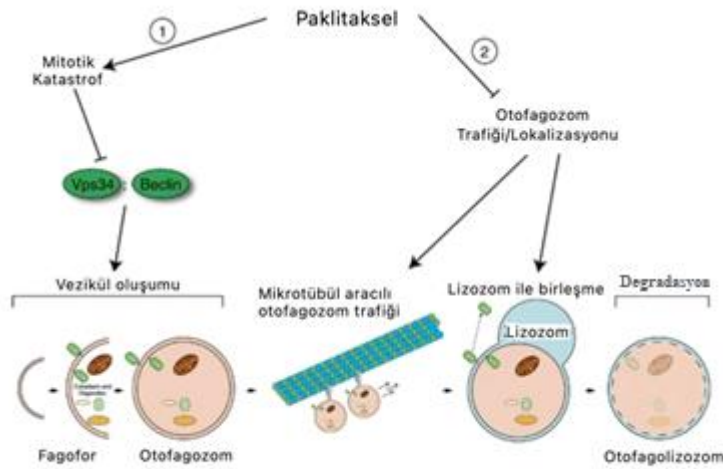
DNA hasarı varlığında, hücre döngüsünün durmasına neden olan ve apoptozu indükleyen p53 proteinin taksan direncine olan katkısı tartışmalıdır. Mutant p53'ün, apoptotik mekanizmayı devre dışı bıraktığı ve ilaç direncine katkı sağladığı bildirilmiştir (Murray ve ark., 2012). Buna karşın, paklitaksel direnci ile ilgili bazı çalışmalarda, p53 geni susturulmuş farelerde paklitaksele karşı hassasiyetin arttığı görülmüştür (Vasey ve ark., 1996; Yusuf ve ark., 2003).

2.5.6. Glutasyon Aracılı Detoksifikasyon

Bu direnç mekanizması, kanser hücrelerinde paklitakselin glutasyon S-transferaz 1 (GSTP1) tarafından sekestre ve tübülüne bağlanmadan önce detoksifiye edilmesi ile paklitakselin aleyhine işlemektedir. Sağlıklı hücresel koşullarda, yüksek protein arginin metiltransferaz 6 (PRMT6) aktivitesi ile glukoz-6-P dehidrojenaz (G6PD)'ın ve dolayısıyla GSTP1'in üretimi inhibe edilir. Paklitaksele dirençli yumurtalık kanseri hücrelerinde ise, PRMT6 düzeyinin baskılandığı, G6PD ve GSTP1 seviyelerinin ise arttığı gösterilmiştir (Feng ve ark., 2020).

2.5.7. Otofaji

Otofajinin paklitaksel direncindeki etkisi tam olarak anlaşılamamıştır ve direnç üzerindeki etkisinin, büyük oranda kanserin türüne ve paklitakselin konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmektedir. Veldhoen ve ark., (2013) tarafından yapılan çalışmada, paklitakselin meme kanseri hücrelerinde, hücre döngüsünün aşamasına bağlı olarak, otofajiyi iki farklı yolla inhibe ettiği (Şekil 2-18) ve ayrıca, otofagozom oluşumu bloke edilerek paklitaksel kaynaklı apoptozun azaldığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, meme kanseri hastalarında, otofaji genlerinin aşağı regülasyonu ile kötü prognoz arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Diğer yandan, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada, paklitaksel ile birlikte otofajinin uyarılmasının paklitakselin etkisini arttırdığı (Lee ve ark., 2018) ifade edilmektedir. Buna karşın, diğer bir çalışmada, meme kanseri hücrelerinde, apoptozdan otofajik hücre ölümüne geçişin, paklitaksel direncine neden olduğu ifade edilmektedir (Ajabnoor ve ark., 2012).



Şekil 2-18: Paklitakselin iki farklı yolla otofajiyi inhibe etmesi- Veldhoen ve ark., 2013'den.

1: Mitotik durma, Vps34'ün fosforilasyonu ve inhibisyonu yoluyla otofajiyi inhibisyonu.
2: Otofagozomların bozulmasının engellenmesi, anormal otofagozom trafiği ve lokalizasyonu.

Yumurtalık kanserinde ise, otofajiyi indükleyen ve apoptozu inhibe eden “taurin yukarı regüle edilmiş 1” in (TUG1) silinmesi ile, otofagozom oluşumunun azaldığı ve apoptozun arttığı görülmüştür. Bu bulgu, otofajinin yumurtalık kanseri hücrelerinde paklitaksel direncinde etkin bir mekanizma olduğunu göstermektedir (Gu ve ark., 2020).

2.5.8. Diğer Direnç Mekanizmalarına Örnekler

Bir transkripsiyon faktörü olan STAT3 apoptozun inhibisyonuna neden olur. Bu faktörün yukarı regülasyonu ve fosforilasyonu, çoklu ilaç direnci, anjiyogenez ve metastaz ile ilişkilidir (Siveen ve ark., 2014). Paklitakselin STAT3 ekspresyonunu aşağı regüle ettiği (Zhang ve ark., 2017) ve STAT3 inhibisyonunun paklitaksel tedavisini takiben kanser hücrelerinde apoptozu arttırabileceği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2011; Fan ve ark., 2016).

Kemoterapi veya iyonlaştırıcı radyasyona maruziyet gibi stres koşulları altında, bağışıklık hücreleri tarafından salınan TGF- β , IL-1 ve TNF- α gibi bazı sitokinler, NF- κ B'nin yukarı regülasyonuna ve nükleer translokasyonuna yol açar (Magné ve ark., 2006). Meme kanseri hücrelerinde NF- κ B'nin yukarı regülasyonu, anti-apoptotik genleri indükleyerek paklitaksele karşı direnci arttırabilir (Patel ve ark., 2000). TGF- β , malign hücrelerde epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) indükleyebilen ve paklitaksel direncine yol açabilen önemli bir immünosüpresif sitokindir (Bhola ve Arteaga, 2011). Park ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada, TGF- β sinyalinin inhibisyonunun, meme kanseri hücrelerinde EMT'yi azalttığı ve bu azalışın kanser hücrelerinin paklitaksele duyarlı hale gelmesiyle ilişkili olduğu belirtilmektedir.

Bazı miRNA'ların yukarı veya aşağı regülasyonu, paklitaksel direncinde rol oynayabilir. miR-22 düzeyindeki azalma ve miR-29c düzeyindeki artışın, kanser hücrelerinde paklitaksel kaynaklı apoptozu karşı direnci indüklediği bildirilmiştir (Li ve ark., 2011; Huang ve ark., 2019). Yine yapılan başka bir çalışmada, paklitaksele dirençli kanser hücrelerinde miR-125b ekspresyonunda bir artış olduğu görülmüştür (Zhou ve ark., 2010). Bunlara ek olarak, azalmış organik anyon taşıyan polipeptit 1 B3'ün (OATP1B3/SLCO1B3) ekspresyonu, artışı CYP2C8 ve HER2 ekspresyonları da paklitaksel direncinde rol oynamaktadır (Kumar ve ark., 2010).

2.6. Kanonikal WNT Sinyal Yolu

Kanonikal WNT sinyal yolu, WNT/ β -katenin sinyal yolu olarak da bilinir. Bu yol, hücrenin akıbetinin belirlenmesi, organogenez, doku homeostazı ve çeşitli patolojik koşullar gibi çok sayıda hayati süreci yöneten, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yoludur. Anormal WNT/ β -katenin sinyal yolu, kanser oluşumu ile birçok yönden sıkı bir şekilde bağlantılıdır (MacDonald ve ark., 2009). Sitozolik β -katenin proteininin

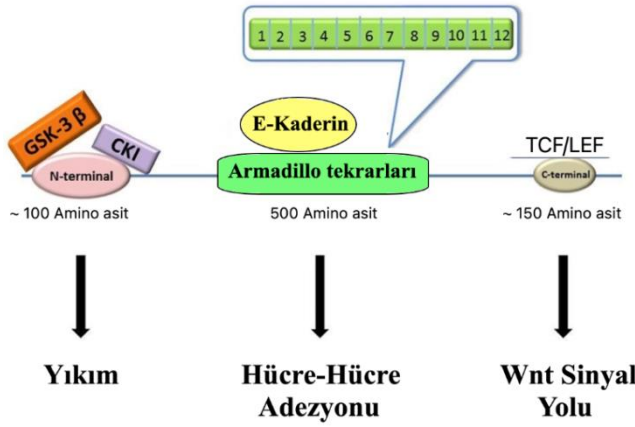
fosforilasyonu ve bunun WNT tarafından düzenlenmesi, WNT/ β -katenin sinyal yolunun temelini oluşturur (Clevers, 2006).

WNT protein ailesi on beş kadar reseptör ve yardımcı reseptör için ligand görevi gören, sistein açısından zengin glikoproteinlerden oluşur. Memelilerde, WNT1 proteininin tanımlanmasından bu yana dizi benzerliğine dayalı olarak son derece korunmuş, 18 adet WNT geninin daha varlığı saptanmıştır. WNT genlerinin birçoğunun, erken dönemdeki (evrimsel süreç) çok hücreli organizmalar da dahi yüksek düzeyde korunmuş olması bu yolun kritik bir önemi olduğunu göstermektedir. Hücre dışı WNT, WNT/ β -katenin bağımlı (kanonikal) yol ve β -katenin bağımsız (non-kanonikal) yol gibi çeşitli hücre içi sinyal iletim yollarını tetikleyebilir. Non-kanonikal yolun örnekleri arasında WNT/ Ca^{+2} yolu ve “Düzlemsel Hücre Polaritesi” (PCP) yolu yer alır (Coudreuse ve Korswagen, 2007; Krishnamurthy ve Kurzrock, 2018).

β -katenin, hem hücreler arası adherent bağlantılarda hem de WNT sinyalinde önemli rolleri olan çok fonksiyonlu bir proteindir. Sitozolde ve çekirdekte, WNT sinyallerinin iletiminden sorumlu olan küçük ve dinamik bir β -katenin havuzu vardır. Hücredeki β -kateninin büyük çoğunluğu ise, E-kaderin proteininin sitoplazmik bölgesi ile etkileşime girdiği adherent bağlantılarla ilişkilidir. Her ne kadar β -kateninin, E-kaderini α -katenin yoluyla hücre iskeletine bağladığı uzun süredir düşünülse de, son çalışmalar β -kateninin α -katenin homodimerizasyonunu düzenlediğini ve bunun da aktin dallanmasını ve demetlenmesini kontrol ettiğini göstermektedir (Xu ve Kimelman, 2007).

781 amino asitten oluşan β -katenin proteini, 16 ekzona sahip *CTNNB1* geni (23,2 kb) tarafından kodlanmaktadır (Gao ve ark., 2018). β -kateninin birincil yapısı, 12 armadillo tekrarından oluşan merkezi bir armadillo tekrar alanı (141-664 kalıntıları) (~500 a.a.), α -katenin için bağlanma ve Beta-transducin tekrarları içeren protein (β -Trcp) ubiquitin ligaz tarafından tanınan glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) ve kazein kinaz 1 (CK-1) için fosforilasyon bölgeleri içeren bir N-terminal alanı (~150 a.a.) ve C-terminal alanı (~100 a.a.) olmak üzere başlıca üç alandan meydana gelir (Şekil 2-19) (Rimm ve ark., 1995; Jiang ve Struhl, 1998; Wu ve ark., 2003). Armadillo tekrar alanı, β -kateninin en korunmuş bölgesidir ve çok sayıda β -katenin bağlayıcı protein için bağlanma bölgesi görevi görür. β -katenin, çeşitli bölgelerde serin/treonin (Ser/Thr) ve

tirozin (Tyr) fosforilasyonu, ubiquitinasyon ve asetilasyon gibi çok sayıda post-translasyonel modifikasyonla sıkı bir şekilde düzenlenir (Xu ve Kimelman, 2007).



Şekil 2-19: β-kateninin primer yapısı ve bağlanma bölgeleri-Gao ve ark., 2018'den

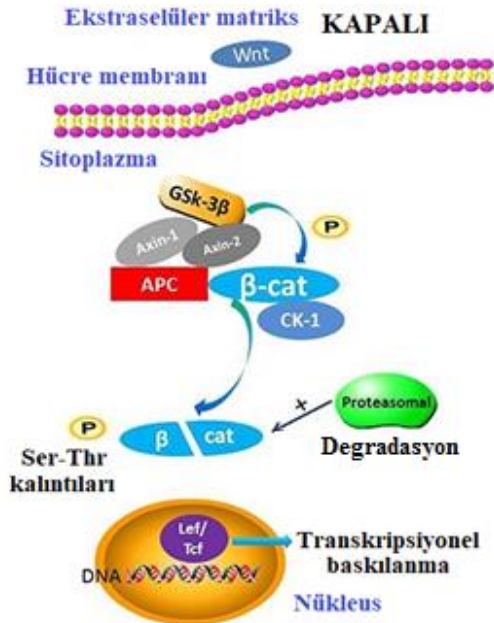
GSK-3β: Glikojen sentaz kinaz-3 beta, CKI: Kazein kinaz I, TCF: T hücresi faktörü, LEF: Lenfoid arttırıcı faktör ailesi.

2.6.1. WNT Sinyali Yokluğunda

Sitozolik β-katenin, bir “scaffold” proteini olan AXIN tarafından yakalanır. AXIN, adenomatöz polipozis koli (APC), CK-1 ve GSK-3 proteinlerini de içeren yıkım kompleksinin bir elemanıdır. Bu kompleksdeki APC, β-kateninin etkili bir şekilde yakalanmasında ve komplekse sabitlenmesinde önemlidir. AXIN, β-katenin, CK-1 ve GSK-3 ile etkileşime girerek yıkım kompleksi tarafından yakalanmış olan β-kateninin, N-ucundaki korunmuş Ser ve Thr kalıntılarının fosforilasyonunu düzenler. β-katenin CK-1 tarafından Ser45 üzerinden ve ardından GSK-3 tarafından Thr41, Ser37 ve Ser33 üzerinden sıralı olarak fosforillenir. Bu fosforillenme, β-kateninin bir E3 ubiquitin ligaz alt birimi olan β-Trcp tarafından tanınarak ubiquitinasyonuna ve proteazomal parçalanmasına neden olur. Bu proteazomal yıkım, β-kateninin nükleusa translokasyonunu ve dolayısı ile WNT hedef genlerinin aktivasyonunu engeller. GSK-3 ve CK-1, β-katenine ek olarak AXIN ve APC'yi de fosforileyerek, bu proteinlerin β-katenin ile etkileşimlerinin artmasına ve dolayısıyla β-katenin fosforilasyonunun ve yıkımının artmasına yol açar (Kimelman ve Xu, 2006; Barker 2008 pp. 5-15).

Sitozolik β-katenin seviyesinin azalması, “Groucho” proteinlerinin TCF/LEF proteinlerine bağlanması ile sonuçlanır. Bu bağlanma, TCF/LEF proteinlerinin çekirdekteki WNT hedef genlerinin promotörlerini ve güçlendiricilerine bağlanarak ilgili genlerin transkripsiyonlarının baskılanmasına neden olur. WNT hedef genlerinin

baskılanması, hücre çoğalması da dahil olmak üzere bir dizi biyolojik tepkinin sürdürülmesi ile sonuçlanır (Cavallo ve ark., 1998) (Şekil 2-20).



Şekil 2-20: WNT/β-katenin sinyali yolunun inaktivasyonu-Gao ve ark., 2018'den.

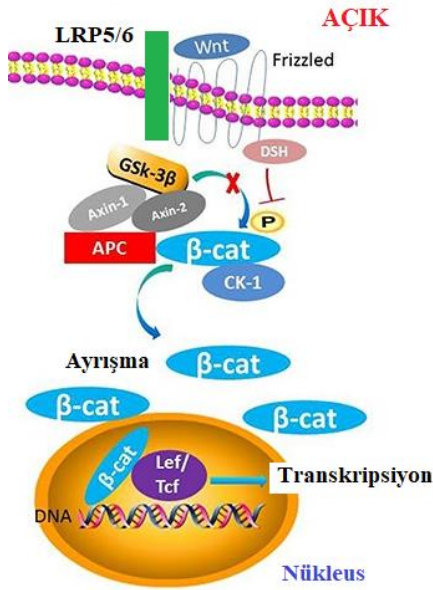
APC: Adenomatöz polipozis koli, Axin-1: Axis inhibisyon proteini 1, Axin-2: Axis inhibisyon proteini 2, β-cat: Beta-katenin, CKI: Kazein kinaz I, GSK-3β: Glikojen sentaz kinaz-3 beta, LEF: Lenfoid arttırıcı faktör ailesi, Ser: Serin amino asidi, TCF: T hücresi faktörü, Thr: Treonin amino asidi, Wnt: Wingless.

2.6.2. WNT Sinyali Varlığında

WNT ligandının yedi geçişli bir transmembran protein olan Frizzled (Fz/Fzd) reseptörüne ve onun koreseptörü olan, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüyle ilişkili protein 6'ya (LRP6) veya LRP5'e bağlanması ile WNT/β-katenin yolu aktive olur. WNT-FZD-LRP6/LRP5 kompleksinin oluşumu, scaffold proteini Disheveled'in (DVL) aktive olarak Fzd reseptörü ile etkileşimine girmesi ile sonuçlanır. Reseptör kompleksi ile etkileşimde olan DVL, yıkım kompleksinin (AXIN, GSK-3, CK-1 ve APC) reseptörün etrafında toplanmasına aracılık eder (Gordon ve Nusse, 2006; Bilic ve ark., 2007; Wu ve Pan, 2010).

LRP6 fosforilasyonu, reseptör aktivasyonunda anahtar bir rol oynar. LRP6'nın sahip olduğu PPPSPxS motifleri (P:prolin, S: serin, x: değişken bir a.a.) yıkım kompleksi için kenetlenme bölgeleridir ve LRP6, taşıdığı bu motifler üzerinden GSK-3 ve CK-1 tarafından fosforillenerek aktive olur. Reseptör aktivasyonu, AXIN aracılı β-katenin fosforilasyonunun inhibisyonuna ve dolayısıyla sitozolde β-katenin birikimine

neden olur (Tamai ve ark., 2004; Davidson ve ark., 2005; Zeng ve ark., 2005) (Şekil 2-21).



Şekil 2-21: WNT/β-katenin sinyal yolunun aktivasyonu-Gao ve ark., 2018'den.

APC: Adenomatöz polipozis koli, Axin-1: Axis inhibisyon proteini 1, Axin-2: Axis inhibisyon proteini 2, β-cat: Beta-katenin, CKI: Kazein kinaz I, DSH: Dishevelled, GSK-3β: Glikojen sentaz kinaz-3 beta, Lef: Lenfoid arttırıcı faktör ailesi, Tcf: T hücreli faktörü, LRP: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilgili protein, Wnt: Wingless.

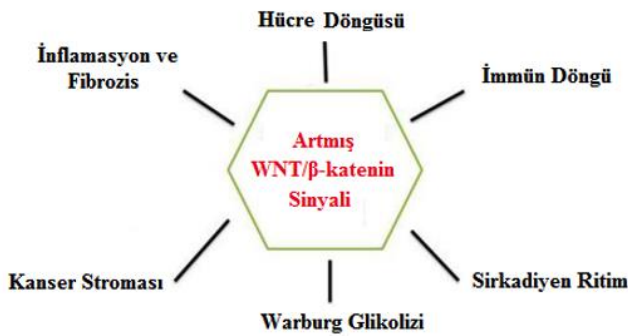
β-katenin sitozol ve çekirdek arasında iki yönlü olarak hareket edebilen bir proteindir. Klasik bir nükleer protein, nükleer por proteini olan importine bağlanarak nükleusa geçişine imkan sağlayan nükleer lokalizasyon dizisine (NLS) sahiptir. Ancak β-katenin NLS'ye sahip değildir. β-kateninin importin ile benzer armadillo tekrar alanlarını paylaşması, importini atlayarak nükleer por bileşenleriyle doğrudan etkileşime girebileceğini (Fagotto ve ark., 1998) ve bir protein kinaz olan AKT tarafından Ser552 üzerinden (Fang ve ark., 2007) ve ayrıca JNK2 ile Ser191 ve Ser605 üzerinden fosforilasyona uğramasının (Wu ve ark., 2008) β-kateninin nükleusa taşınımını düzenlediği düşünülmektedir. β-katenin yine nükleustan sitozole taşınımı için gerekli, nükleer çıkış sinyali (NES) de içermemektedir. β-kateninin sitozole taşınımı ise, AXIN (Cong ve Varmus, 2004) ve APC (Rosin-Arbesfeld ve ark., 2000) gibi WNT yolundaki diğer proteinler tarafından kontrol edilir.

Sitozolde biriken β-katenin nükleusa göç ederek, WNT yolu inhibitörleri (β-katenin ve TCF inhibitörü (ICAT) ve CHIBBY) veya bir takım transkripsiyonel

aktivatörlerle birlikte (BCL9/BCL9-2, CBP/p300, pygopus ve TCF/LEF ailesinin üyeleri vb) çoklu protein kompleksleri oluşturur (Xu ve Kimelaman, 2007).

DNA'ya bağlı transkripsiyon faktörlerinden TCF/LEF ailesi, gen regülasyonunda β -katenin ile yakından ilişkilidir (Hoppler ve Kavanagh, 2007). TCF, histon deasetilasyonunu ve kromatin sıkışmasını destekleyen “Groucho” (insanda TLE1) ile etkileşime girerek gen ekspresyonunu baskılar. WNT kaynaklı β -kateninin stabilizasyonu ve nükleer birikimi, TCF'nin, “Groucho” yerine β -katenin ile kompleks oluşturmaya yol açar (Daniels ve Weis, 2005). TCF/LEF, N-terminali ile nükleusa giren β -katenine, HMG alanı ile ise WNT yanıt elemanları (WRE) adı verilen spesifik DNA dizilerine bağlanır. WRE dizisi, CCTTTGNN (N:T/A) şeklindedir ve birçok WNT hedef geni, promotör bölgesinde veya uzak bölgelerde birden fazla WRE dizisi içerir (Liu ve ark., 2016). TCF- β -katenin kompleksi BCL-9, c-MYC, siklin D1 ve siklin bağımlı kinaz (SBK) gibi genlerin ekspresyonlarını artırır. Bu sinyal yolunun sürekli olarak aktive olması, hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasına ve sonuç olarak ise karsinogeneze neden olur (Gordon ve Nusse, 2006).

Kanonikal WNT sinyali, hücre döngüsü, bağışıklık döngüsü, sirkadiyen ritim, kanser stroması, Warburg glikolizi, inflamasyon ve fibrozis gibi çeşitli kanser patofizyolojilerinin temel alanlarında etkilidir (Lecarpentier ve ark., 2019) (Şekil 2-22).



Şekil 2-22: WNT/ β -katenin sinyalinin kanser patofizyolojizinde etkilediği temel alanlar- Lecarpentier ve ark., 2019'dan.

2.6.3. Kanserde Anormal WNT/ β -katenin Sinyal Yolu

Bazı kanser olgularında, sinyal yolunun ligandından bağımsız olarak aşağı akışında bulunan en az bir bileşeninde, bu yolun aktivasyonunu sağlayacak mutasyonların varlığı söz konusudur. Bu duruma en güzel örnek, kolorektal kanser

vakalarının yaklaşık %85’inde görülen APC’nin mutasyonlarıdır ve bu mutasyonlar APC’nin fonksiyon kaybına neden olur. Bu fonksiyon kaybı, β -katenin seviyelerinde artışa ve bunu takiben karsinogenez sürecine girilmesine yol açar. Kanser olgularında, WNT sinyal yolunun diğer bileşenlerine kıyasla, β -katenin proteinini kodlayan *CTNNB1* geninde meydana gelen mutasyonlar çok daha yaygın olarak görülmektedir (Howe ve Brown, 2004).

Çeşitli kanserlerde görülen *CTNNB1* mutasyonları genellikle yanlış anlamlı mutasyonlardır ve bunların neredeyse tamamı ekzon 3’te lokalize olmuştur. Bu mutasyonlar çoğunlukla, β -katenin proteininin N-terminal bölgesinde yer alan GSK-3 β tarafından fosforilasyona uğradığı S33, S37 ve T41 bölgelerinde, CK-1 tarafından fosforilasyona uğradığı S45 bölgesinde ve F-box/WD tekrar içeren protein 1A (Fbw1) ile etkileşim bölgelerinde (ubikitinasyon tanıma bölgeleri) (D32 ve G34) meydana gelir. Meydana gelen bu mutasyonlar β -kateninin fosforilasyona ve ubikitinasyona dirençli hale gelmesine böylece hücrede, dolayısı ile nükleusta β -katenin birikimine neden olur (Gao ve ark., 2018). Bu bölgelerde meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonların bazıları Tablo 2-10’da verilmiştir.

Tablo 2-10: Bazı *CTNNB1* mutasyonları ve bu mutasyonların etkileri

Mutasyon	Etki
D32A (95A>C)	Nükleer β -katenin birikimi, ubikitinasyonda azalma ve yüksek hücrel transformasyon (Provost ve ark., 2005; Zhong ve ark., 2023)
D32G (95A>G)	β -katenin protein seviyelerinde artış, güçlü TCF-4’e bağımlı transkripsiyon artışı (Al-Fageeh ve ark., 2004)
D32V (95A>T)	Nükleer β -katenin birikimi (Machin ve ark., 2002)
D32Y (94G>T)	β -katenin protein seviyelerinde artış, güçlü TCF-4’e bağımlı transkripsiyon artışı (Al-Fageeh ve ark., 2004)
S33A (97T>G)	Nükleer β -katenin birikimi (Machin ve ark., 2002; Gondak ve ark., 2020)
S33C (98C>G)	β -katenin bağımlı transkripsiyon artışı ve nükleer β -katenin birikimi (Lee ve ark., 2009; Haller ve ark., 2015)
S33F (98C>T)	Sitoplazmada ve nükleusta β -katenin birikimi (Haller ve ark., 2015; Alomar ve ark., 2016)
S33P (97T>C)	Nükleer β -katenin birikimi (Tanaka ve ark., 2001; Machin ve ark., 2002; Oulès ve ark., 2022)
S33Y (98C>A)	Nükleer β -kateninin birikimi, β -katenin bağımlı transkripsiyonel artış ve artmış hücre proliferasyonu (Groen ve ark., 2008)
G34A (101G>C)	Ubikitinasyonda azalma, nükleer β -katenin birikimi (Provost ve ark., 2005; Aono ve ark., 2022)
G34E (101G>A)	Nükleer β -katenin birikimi (Machin ve ark., 2002; Haller ve ark., 2015)
G34V (101G>T)	Nükleer β -katenin birikimi (Ikeda ve ark., 2000; Machin ve ark., 2002)
S37A (109T>G)	Total ve non-fosforile β -katenin seviyesinde artış (Björklund ve ark., 2008)
S37F (110C>T)	Nükleer β -katenin birikimi (Yanagisawa ve ark., 2001; Machin ve ark., 2002;)

S37T (109T>A)	Total β -katenin seviyesinde artış (Zeng ve ark. 2006)
T41A (121A>G)	Nükleer β -katenin birikimi ve WNT hedef gen (IL-8) transkripsiyonunda artış (Van Nhieu ve ark., 1999; Lévy ve ark., 2002; An ve ark., 2021)
T41I (122C>T)	Nükleer β -katenin birikimi (Garcia-Rostan ve ark., 1999; An ve ark., 2021)
T41P (121A>C)	β -katenin ve WNT hedef gen (c-myc) seviyelerinde artış (Javanmard ve ark., 2020)
S45A (133T>G)	β -katenin bağımlı transkripsiyonel artış (Hagen ve ark., 2009)
S45C (134C>G)	Nükleer β -katenin birikimi (Huss ve ark., 2013)
S45F (134C>T)	Nükleer β -katenin birikimi, β -katenin bağımlı transkripsiyonel artış (Austinat ve ark., 2008; Hamada ve ark., 2014; An ve ark., 2021)
S45P (133T>C)	Nükleer β -katenin birikimi (Haller ve ark., 2015; An ve ark., 2021)
S45T (133T>A)	Nükleer β -katenin birikimi (Wong ve ark., 2001)

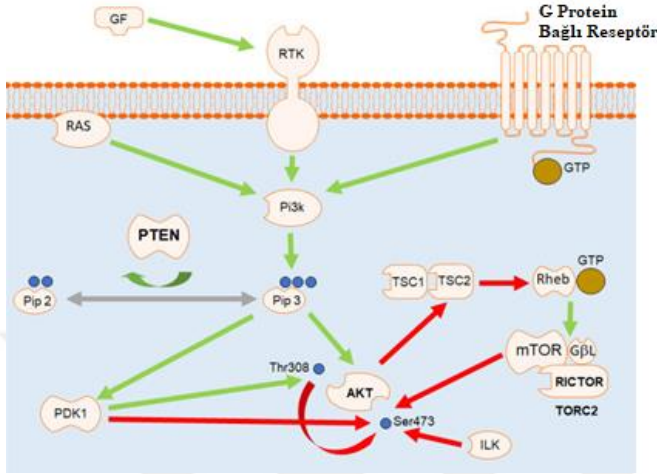
2.7. PI3K/AKT Sinyal Yolu

PI3K/AKT, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, apoptoz, hücre iskeleti organizasyonu, vezikül trafiği ve trombosit fonksiyonu gibi önemli hücresel süreçlerde etkili olan birçok efektör molekülü aktive ederek, çoklu hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir sinyal yoludur. Bu yolun aşırı aktivasyonu, insan malignitelerinde sıkça karşılaşılan bir durumdur, bu nedenle, kanser tedavisindeki önemli yaklaşımlardan biri, PI3K/AKT sinyal yolunun ve/veya bu yolun etkilediği molekülerin hedeflenerek rasyonel ilaçların tasarımıdır (Shi ve ark., 2019).

PI3K'ler, plazma membranında yer alan inositol fosfolipitlerinin 3-hidroksil grubunu fosforile eden önemli bir lipit kinaz ailesidir (Fruman ve ark., 1998). PI3K substratları olan 3-fosfoinositidler, spesifik lipit bağlama alanlarına (Plekstrin homoloji alanı: PH, Phox homoloji alanı: PX ve FYVE alanı) sahip efektör proteinleri (PDK1 ve AKT1 gibi) kendine bağlayarak, bu proteinlerin lokalizasyonunu ve fonksiyonunu kontrol ederler. PI3K'ler substrat seçiciliklerine ve hücre biyolojisinin farklı yönlerini kontrol eden yapılara bağlı olarak sınıf I, II ve III olarak üçe ayrılır. Bu üç grup içerisinde sınıf I PI3K'ler (PI3K α , PI3K β , PI3K γ , PI3K δ), düzenleyici alt birim p85 ve katalitik alt birim p110'dan oluşan heterodimerik enzimleri içerirler ve kanserde en kapsamlı incelenmiş olan izoformlardır (Vanhaesebroeck ve ark., 2010).

PI3K aktivasyonu, büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler gibi ligandların, reseptör tirozin kinazlar (RTK) ile bağlanması sonucunda p110 ve p85 gibi düzenleyici alt birimler etkinleştirilmesi yoluyla veya G protein bağlı reseptör (GPCR) aracılığıyla gerçekleşir. Bu aktivasyon sonucunda membranda fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) oluşur. Daha sonra AKT, membrana alınır ve PDK-1 ve mTORC2 tarafından fosforile edilir. PI3K/AKT yolunun genel aktivitesi, bir lipit fosfataz olan PTEN

tarafından düzenlenir. PTEN, ve PIP3'ün 3' pozisyonunu defosforile eder ve fosfatidilinositol 3,4-bifosfatı (PIP2) oluşur, böylece, PI3K aktivitesini doğrudan antagonize edilir. PTEN aktivite kaybı ise, AKT'nin yapısal aktivasyonuna neden olur (Davies, 2012) (Şekil 2-23).



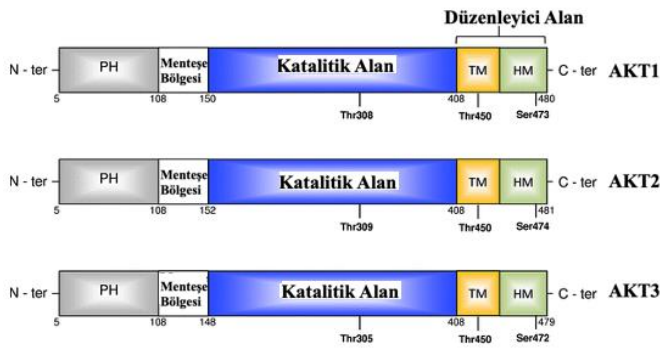
Şekil 2-23: PI3K aktivasyonu-Asproni ve ark., 2021'den.

AKT: Protein kinaz B, GF: Büyüme faktörü, GTP: Guanozin trifosfat., GBL: Rapamisin kompleksi alt birimi LST8'in hedefi, ILK: İntegrin bağlantılı kinaz, mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi, PDK1: Piruvat dehidrojenaz kinaz 1, PI3K, Fosfatidilinositol 3-kinaz; PIP2: Fosfatidilinositol 3,4-bifosfatı, PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat, PTEN: Fosfataz ve tensin homologu, RAS: Sıçan sarkoma viral onkogeni, Rheb: Ras homologu, RICTOR: MTOR'un rapamisine duyarlı ortağı, RTK: Reseptör tirozin kinaz, Ser: Serin amino asidi, Thr: Treonin amino asidi, TSC1: Tübero skleroz 1, TSC2: Tübero skleroz 2.

RTK'ler, N-terminal hücre dışı alan (ECD), tek transmembran (TM) alan, hücre içi kinaz alan ve hücre içi C-terminal kuyruk bölgesini içerirler. RTK'lerin çoğunda kinaz alanları korunmuş bir yapı sergilerken, ECD'ler, reseptör alt aileleri arasında farklılık gösterir. ECD alanlarındaki bu çeşitlilik, reseptörlerin yapısal olarak farklı protein ligandlarını tanımasına olanak sağlar ve bu da, kinaz alanının aktivasyonunun regülasyonunda rol alır. Ligandların, reseptörlerin ECD'lerine bağlanması ile reseptör dimerizasyonu gerçekleşir ve dimerizasyon C-terminal kuyruğun transfosforilasyonuna (otofosforilasyonu) neden olur. Bu yapısal değişim, PI3K için kenetlenme alanı görevi görerek, PI3K'nin, p85 düzenleyici alt birimi ile birleşmesini ve bu sayede PI3K aktivasyonunu sağlar (An ve ark., 2018; Trenker ve Jura, 2020).

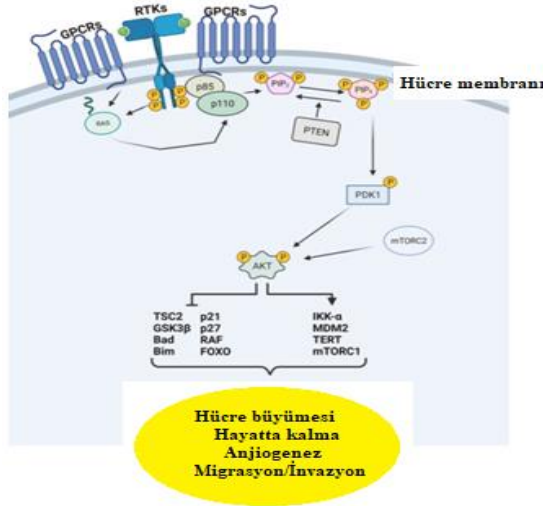
Aktive olmuş PI3K, katalitik alt birim p100 aracılığıyla PIP2'yi, PIP3'e dönüştürür. PIP3 ise, ikinci haberci olarak görev yapar ve AKT'nin membrana yönlendirilmesini ve fosforilasyon yoluyla AKT aktivasyonuna neden olur (Dong ve ark., 2021).

AKT (Protein kinaz v-akt murin timoma viral onkogen homolog) mTOR, matris metaloproteinaz (MMP), sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve VEGF dahil olmak üzere çeşitli substratları ve aşağı akış efektörlerini fosforile eden bir Ser/Thr kinazdır. AKT, PI3K/AKT sinyal yolunun merkezi konumundadır ve önemli bir sinyal iletim proteinidir (Cidado ve Park, 2012). 56 kDa ağırlığına sahip AKT, AGC protein kinaz ailesinin bir üyesidir ve farklı kromozomlar üzerindeki farklı genler tarafından kodlanan üç izoformdan oluşur; AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) ve AKT3 (PKB γ) (Toker ve Marmioli, 2014). Katalitik ve NH₂-terminal PH alanlarında yüksek düzeyde dizi homolojisine sahip bu üç izoform, alanlar arasındaki bağlayıcı bölgeler ve COOH terminal uzantılar bakımından farklılık gösterir (Şekil 2-24) (Coffer ve ark., 1998).



Şekil 2-24: AKT izoformlarının yapısı-Chautard ve ark., 2014'den.

AKT1, PH alanı ile membranda yerleşim gösteren PIP3'e bağlanır ve bağlanmayı takiben PDK1 tarafından katalitik alanda yer alan T308 kalıntısı ve mTORC2 (PDK2) tarafından C-terminal uzantıda yer alan S473 kalıntısı üzerinden fosforile edilir. Ser473 kalıntısının fosforilasyonu, mTORC2'ye ek olarak integrin bağlı kinaz, protein kinaz C ϵ ve otofosforilasyon yoluyla sağlanır (Mahadevan ve ark., 2008; Basu ve Lambring, 2021). Fosforile AKT (aktif), hücrenin hayatta kalmasını teşvik etmek üzere ölüm genlerinin ekspresyonunu baskılayıp, hücrenin hayatta kalmasını teşvik eden genlerin ekspresyonlarını arttırmak üzere membrandan ayrılarak sitoplazma ve nükleusa doğru serbestçe hareket eder ve bir dizi hedefin fosforilasyonunu sağlar (Nicholson ve Anderson, 2002) (Şekil 2-25).



Şekil 2-25: AKT'nin aktivasyonu ve hücresel süreçlerdeki rolü- Vidal ve ark., 2022'den.

AKT: Protein kinaz B, Bad: BCL2 ilişkili hücre ölümü agonisti, Bim: Bcl-2 benzeri protein 11, FOXO: Transkripsiyon faktörlerinin Forkhead ailesi., GPCRs: G-proteinine bağlı reseptörler, GSK3β: Glikojen sentez kinaz 3, IKK-α: Nükleer faktör kappa B kinaz kompleksinin inhibitör bileşeni, MDM2: E3 Ubikitin Protein Ligaz Mdm2., mTORC2: mTOR kompleks 2, p110: Katalitik alt ünite, p21 ve p27: Siklin bağımlı kinaz inhibitörler, p85: Düzenleyici alt ünite, PDK1: Piruvat dehidrojenaz kinaz 1, PIP2: Fosfatidilinositol 3,4-bifosfatı, PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat, PTEN: Fosfataz ve tensin homoloğu, RAF: Murin lösemi viral onkogeni, RAS: Sıçan sarkoma viral onkogeni, RTKs: Reseptör tirozin kinazlar, TERT: Telomeraz ters transkriptaz, mTORC1: mTOR kompleks 1. TSC2: Tübero skleroz 1.

2.7.1. AKT1 Tarafından Düzenlenen Hücresel Süreçler

AKT1'in aktivasyonu ile birlikte farklı hücre hayatta kalma mekanizmaları aktiflenir. AKT1, proapoptotik faktörler olan BAD ve prokaspaz-9'u ve aynı zamanda Fas ligandı gibi proapoptotik faktörlerin ekspresyonunu indükleyen "Forkhead Transkripsiyon Faktörleri Ailesi"ni fosforilleyerek inaktive eder. Öte yandan, AKT1, antiapoptotik aktiviteye sahip genlerin ekspresyonunu düzenleyen, transkripsiyon faktörü "Siklik AMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Proteini" (CREB) ve NF-κB'nin pozitif düzenleyicisi olan IκB kinazı (IKK), fosforilasyon yoluyla aktive eder. Kanser hücrelerinde AKT aktivasyonu, seçici antitümör aktivitesine sahip olduğu bilinen TNF süper ailesinin bir üyesi olan TRAIL/APO-2L (TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand) tarafından indüklenen apoptoza karşı artan dirençle ilişkilendirilmiştir (Vara ve ark., 2004).

GSK-3β, fosfodisteraz-3B, mTOR, insülin reseptör substrat-1 (IRS-1), Forkhead ailesi üyesi FKHR, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri p21 ve p27 protein sentezi, glikojen metabolizması ve hücre döngüsü düzenlemesinde görevli AKT1 hedefleri arasındadır (Blume-Jensen ve Hunter, 2001). AKT1 tarafından β-katenin, p21, p27, MDM2 veya Forkhead transkripsiyon faktörleri gibi substratların aktivitelerinin

düzenlenmesindeki temel mekanizma, fosforilasyonları yoluyla sitoplazmik veya nükleer lokalizasyonlarının düzenlenmesidir. AKT1 tarafından GSK-3 β 'nin inhibisyonu, β -katenin ve Siklin D1 fosforilasyonunun azaltılması yoluyla bu proteinlerin stabilizasyonunu destekler (Diehl ve ark., 1998). AKT1 tarafından p21'in fosforile edilerek sitoplazmada tutulması, onun antiproliferatif etkilerini inhibe eder ve buna benzer bir mekanizma p27 için de geçerlidir (Zhou ve ark., 2001; Viglietto ve ark., 2002).

AKT1, mTOR aktivasyonuna neden olarak protein sentezi ve hücre büyümesini aktifler. Buna ek olarak, AKT1'in, mTOR aktivasyonu hipoksi ile indüklenebilir faktör-1a (HIF-1) düzeyini ve dolayısıyla VEGF üretimini ve anjiyogenezi artırır (Mahadevan ve ark., 2008). AKT1, ayrıca, tümör baskılayıcı TSC2'nin fosforilasyonu yoluyla inhibisyonuna ve dolayısı ile p70 ribozomal protein S6 kinaz 1'i (translasyonun bir aktivatörü) inhibe eden ve 4E-BP1'i (translasyonel başlatmanın bir inhibitörü) aktive eden TSC1:TSC2 kompleksinin oluşumunu inhibe ederek büyümeyi uyarır. PI3K/AKT'ye bağımlı TSC kompleksinin inhibisyonu mTORC1'in aktivasyonu ile sonuçlanır (Vara ve ark., 2004). AKT1'nin diğer bir substratı olan MDM2, fosforilasyona uğramasının ardından nükleusa girererek bir tümör baskılayıcı protein olan p53 düzeylerinde azalmaya neden olur (Mayo ve Donner, 2002). AKT'nin fosforile ettiği bazı substratlar ve bu yolla düzenlediği hücresel süreçler Tablo 2-11'de özetlenmiştir.

Tablo 2-11: AKT tarafından düzenlenen hücresel süreçler-Vara ve ark., 2004'den

AKT substratı	Etki
BAD	Hayatta kalma: BAD'nin 14-3-3 proteinleriyle birleşimi; BAD'nin proapoptotik aktivitesinin baskılanması
Prokaspaz-9	Hayatta kalma: Kaspaz-9 aracılı apoptozun baskılanması
CREB	Hayatta kalma: CREB tarafından düzenlenen hayatta kalma genlerinin artan transkripsiyonu
Forkhead Ailesi (FKHR, FKHL1, AFX)	Hayatta kalma: 14-3-3 proteinleriyle ilişki; nüklear dışlama ve proapoptotik genlerin transkripsiyonunun inhibisyonu
IKK	Hayatta kalma: NF- κ B transkripsiyon aktivitesinin indüksiyonu; hayatta kalma genlerinin transkripsiyonunun aktivasyonu
ASK1	Hayatta kalma: Stresle aktive olan kinazların inhibisyonu
MDM2	Hayatta kalma: MDM2'nin nüklear girişi; p53 tarafından düzenlenen süreçlerin inhibisyonu
GSK3	Hücre büyümesi ve çoğalma: GSK3'ün katalitik aktivitesinin inhibisyonu
p21, p27	Hücre büyümesi ve çoğalma: Nükleer dışlama; antiproliferatif aktivitesinin önlenmesi
mTOR/FRAP	Hücre büyümesi ve çoğalma: mRNA translasyonunun düzenlenmesi
TSC2	Hücre büyümesi ve çoğalma: mTOR aktivitesinin düzenlenmesi

2.7.2. Kanserde PI3K/AKT Sinyal Yolu

PI3K/AKT sinyal yolu çeşitli kanserlerde, anormal şekilde aktive olmuştur. PI3K/AKT aktivasyonu, RTK'ler ve/veya sinyal yolunun belirli proteinlerindeki somatik mutasyonlar tarafından tetiklenir ve bu yolun anormal uyarımı, tümör büyümesi, anjiyogenez ve hayatta kalma ile bağlantılıdır (Noorolyai ve ark., 2019). PIK3CA, p110a izoformunun mutasyonları ve PTEN'in fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar insan tümörlerinde sıkça görülür ve bu yolun uyarılmasına neden olur (Pérez-Tenorio ve ark., 2007; Balakrishnan ve Chaillet, 2013).

AKT'nin düzenleyicileri ve substratları, tümör gelişiminde önemli bir rol oynamakla birlikte, anormal AKT aktivasyonunun kendisi de oldukça onkogeniktir. AKT'nin aşırı ekspresyonu ve fosforilasyonu yoluyla aktiflenmesi, çok çeşitli kanserlerde meydana gelen iki ana olaydır ve önemli derecede AKT mutasyonlarıyla ilişkilidir (Cerami ve ark., 2012). AKT1 aktivasyon artışına neden olan bazı yanlış anlamalı mutasyonlar Tablo 2-12'de verilmiştir.

Tablo 2-12: AKT1 aktivasyon artışına neden olan bazı yanlış anlamalı mutasyonlar

Mutasyon	Etki
PH Alanı	
E17K (49G>A)	AKT1 fosforilasyonunda ve dolayısıyla aktivasyonunda artış, yüksek hücrel transformasyon (Carpten ve ark., 2007)
E49K (145G>A)	AKT1 aktivasyonunda artış ve hücrel transformasyon (Askham ve ark., 2010)
L52R (155T>G)	p-AKT1 düzeyinde, aşağı akış AKT hedeflerinin fosforilasyonunda ve AKT'nin plazma membranına lokalizasyonunda artış, hücrel transformasyon (Parikh ve ark., 2012; Kyung ve ark., 2013)
F55Y (164T>A)	AKT1 aktivitesinde ve hücre proliferasyonunda artış (Parikh ve ark., 2012)
C77F (230G>T)	p-AKT1 düzeyinde, aşağı akış AKT hedeflerinin fosforilasyonunda ve AKT'nin plazma membranına lokalizasyonunda artış (Kyung ve ark., 2013)
Q79K (235C>A)	p-AKT1 düzeyinde, aşağı akış AKT hedeflerinin fosforilasyonunda ve AKT'nin plazma membranına lokalizasyonunda artış, hücrel transformasyon (Parikh ve ark., 2012; Kyung ve ark., 2013)
Kinaz Alanı	
K189N (567G>C)	p-AKT1 ve pS6RP seviyelerinde artış (Parikh ve ark., 2012)
E191A (572A>C)	AKT1 fosforilasyonunda ve hücre proliferasyonunda artış (Lu ve ark., 2015)
V271A (812T>C)	Hücre proliferasyonunda artış (Parikh ve ark., 2012)
D323H (967G>C)	p-AKT1 düzeyinde (aktivasyonunda) artış ve hücrel transformasyon (Parikh ve ark., 2012)
D323Y (967G>T)	AKT1 aktivasyonu (Parikh ve ark., 2012)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

Genel

Bikinkoninik Asit Kiti (Sigma, BCA1)

DMSO (Sigma, 41639)

Hidroklorik Asit (Merck, 320331)

MTS Reaktifi (Promega, G1111)

Nonidet P-40 (Merck, 11754599001)

Paklitaksel (Sigma, T7402)

PMS (Sigma, P9625)

SDS (Sigma, 428023)

Siğır Serum Albumini (Sigma, A9418)

Sodyum Deoksikolat (Sigma, D6750)

Sodyum Klorür (Sigma, S9888)

Alan Hedefli Mutajenez, Transformasyon ve Transfeksiyon

Kanamisin (Sigma, 60615)

LB Broth (Sigma, L3522)

LB Broth Agar (Sigma, L3147)

Maxi Plazmid İzolasyon Kiti (Qiagen, 12162)

MegaTran 2.0 Transfeksiyon Ajanı (Origene, TT210003)

Mini Plazmid İzolasyon Kiti (Qiagen, 12123)

Mutajenez Kiti (Agilent, 200519)

SOC Besiyeri (Invitrogen, 15544034)

TOP 10F' *E. coli* Hücreleri (Invitrogen, C3030-03)

Western Blot

Anti-Beta Aktin Monoklonal Antikoru (Boster, M01263)

Anti-DDK Monoklonal Antikoru (Origene, TA5011)

Anti-Mouse IgG-HRP Antikoru (Santa Cruz, sc-2005)

Anti-Rabbit IgG H&L Antikoru (HRP) (Abcam, ab205718)

EDTA (Sigma, E9884)

Glisin (Sigma, G8898)

Kemilüminesans Substrat (Bio-Rad, 1705060)

Laemmli Örnek Tamponu (2X) (Sigma, S3401)

Poliakrilamid Jel (Bio-Rad, 4569034)

Protein Marker (Invitrogen, LC5615)

PVDF Transfer Kiti, (Bio-Rad, 1704272)

Tris (Merck, 108387)

Tween 20 (Sigma, P9416)

Yağsız Süt Tozu (Havancızade)

β -Merkaptoetanol (Sigma, M6250)

Hücre Kültürü

DPBS (Wisent Bioproducts, 311-425-CL)

EMEM (Wisent Bioproducts, 320-026-CL)

Fetal Sığır Serum (Capricorn SCI, FBS-11A)

İnsan İnsülin Solüsyonu (Sigma, I9278)

McCoys's 5A (Wisent Bioproducts, 317-010-CL)

Penisilin-Streptomisin (Wisent Bioproducts, 450-201-EL)

RPMI 1640 (Wisent Bioproducts, 350-007-CL)

Trypsin (Sigma, T4799)

Trypan Mavisi (Sigma, T6146)

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

-80°C Dondurucu (Nuaire)

37°C'lik Su Banyosu (Memmert)

Buz Makinesi (Eurfrigor)

Buzdolabı (Arçelik)

CO₂ Destekli İnkübatör (N-Biotek)

Çalkalamalı İnkübatör (N-Biotek)

Elektroforez Güç Kaynağı (Bio-Rad)

Elektroforez Tankı (Bio-rad)

Fusion FX5 Jel Görüntüleme Cihazı (Vilber Lourmat)

Hassas Terazı (AND HM 200)

Hemositometre Lamı (Isolab)

Inverted Mikroskop (Olympus)

Isı Bloğu (Lab Line)

Laminar Flow Kabin (N-Biotek)

Mikro-plaka Okuyucu (Eon Biotek)

Orbital Çalkalayıcı (N-Biotek)

Otoklav (Hirayama)

Otomatik Pipetler (Eppendorf)

pH Metre (WTW)

Sıvı Azot Tankı (Arpege 70)

Soğutmalı Santrifüj (Gyrozen)

Steril 15 mL'lik Santrifüj Tüpü (Nest, 601052)

Steril 50 mL'lik Santrifüj Tüpü (Nest, 602052)

Steril 96 Kuyucuklu Plaka (Nest, 701001)

Steril Flask 75 cm² (Nest, 708003)

Steril Öze (LP Italiana, 31018)

Steril Petri Kapları 100 mm (Nest, 704001)

Steril Serolojik Pipet (Nest, 327001)

Şırınga (Set Inject)

Şırınga Filtresi (Aisimo, ASF33CA22S)

Termal Döngüleyici (PCR Cihazı) (Bio-Rad)

Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi (Bio-Rad)

Ultra Saf Su Cihazı (Elga)

UV Spektrofotometre (Biotek Epoch)

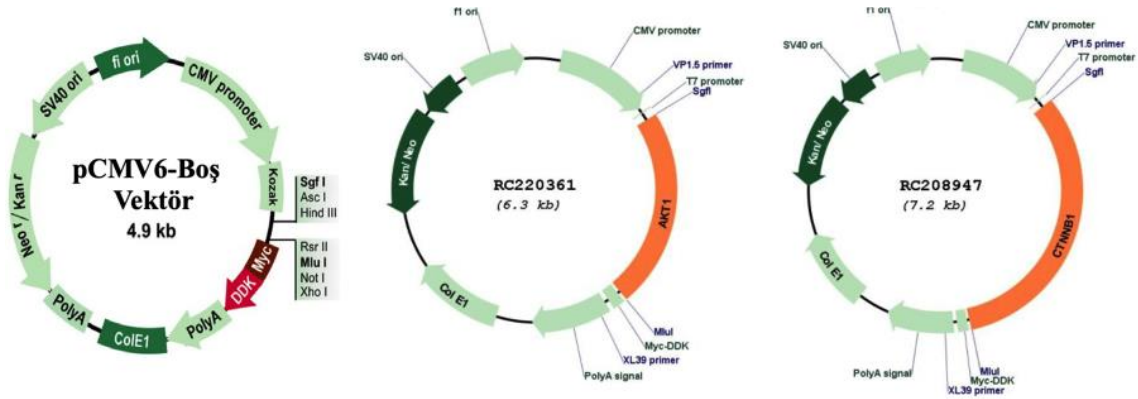
Vorteks (Velp Scientifica)

3.3. Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Alan Hedefli Mutajenez

Alan hedefli mutajenez, bir plazmid vektörü içerisinde yer alan spesifik bir dizinin, özel olarak tasarlanan primerler kullanılarak, belirli nükleotidlerini mutasyona uğratmak için kullanılan “Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)” temelli bir yöntemdir. Bu yöntem ile istenen mutasyonların oluşturulması sonucunda; protein yapısında yer alan amino asitler değiştirilebilir, enzimatik aktivite arttırılıp/inhibe edilebilir, protein-protein etkileşimleri incelenebilir veya post-translasyonel değişiklikler engellenebilir/taklit edilebilir (Bachman 2013 pp. 241-248).

İlaç direnci ile olası ilişkileri araştırılan spesifik *AKT1* ve *CTNNB1* gen mutasyonları, *AKT1* genini taşıyan pCMV6 vektörü (Myc-DDK etiketli, Origene-RC220361) (Şekil 3-1) ve *CTNNB1* genini taşıyan pCMV6 vektörü (Myc-DDK etiketli, Origene-RC208947) (Şekil 3-1) üzerinde, “Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit” yardımı ile üretici firma tarafından belirtilen protokole uygun olarak oluşturuldu.



Şekil 3-1: Boş pCMV6 vektörü, *AKT1* ve *CTNNB1* genlerini taşıyan pCMV6 vektörleri

Neo/Neo^r : Neomisin direnç geni, Kan/Kan^r: Kanamisin direnç geni, PolyA/PolyA signal: Poliadenilasyon için tanıma sekansı, Col E1; “ColicinE1” ekspresyon verimliliğini arttıran dizi, Myc-DDK: DYKDDDDK-Myc etiketi, Kozak: kozak dizisi, CMV promoter; promotör, T7 promotore: promotör, fi ori ve SV40 ori: filamentli faj ve “smian vacuolating” virüs 40 için replikasyon orijinleri

<https://cdn.origene.com/datasheet/ps100001.pdf>, <https://cdn.origene.com/datasheet/rc220361.pdf>
<https://cdn.origene.com/datasheet/rc208947.pdf>

3.3.1.1. Primelerin Tasarlanması

Mutajenik primerler “www.agilent.com/genomics/qcpd” adresinden çevrimiçi olarak ulaşılabilen, “Quik Change Primer Tasarım Programı” kullanarak tasarlandı ve IDT (Integrated DNA Technologies) firması tarafından sentezlendi (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: *AKT1* ve *CTNNB1* gen mutasyonları için alan hedefli mutajenez primerleri

Mutasyon	Primerler
<i>AKT1</i>	
E17K (Glu17Lys) 49G>A	İleri primer: 5'- GCACAAACGAGGG A AGTACATCAAGAC -3' Geri primer: 5'- GTCTTGATGTACT T CCCTCGTTTGTGC -3'
E49K (Glu49Lys) 145G>A	İleri primer: 5'- GATGTGGACCAACGT A AGGCTCCCCCTCAAC -3' Geri primer: 5'- GTTGAAGGGGAGCCT T ACGTTGGTCCACATC -3'
L52R (Leu52Arg) 155T>G	İleri primer: 5'- CGTGAGGCTCCCC G CAACAACCTTCTCTG -3' Geri primer: 5'- CAGAGAAGTTGTTG C GGGGAGCCTCACG -3'
<i>CTNNB1</i>	
S33P (Ser33Pro) 97T>C	İleri primer: 5'- CAGTCTTACCTGGAC C CTGGAATCCATTC -3' Geri primer: 5'- GAATGGATTCCAG G GTCCAGGTAAGACTG -3'
S45F (Ser45Phe) 134C>T	İleri primer: 5'- CTACCACAGCTCCTT T TCTGAGTGGTAAAG -3' Geri primer: 5'- CTTTACCACTCAG A AAGGAGCTGTGGTAG -3'
T41A (Thr41Ala) 121A>G	İleri primer: 5'- CATTCTGGTGCCACT G CCACAGCTCCTTCTC -3' Geri primer: 5'- GAGAAGGAGCTGTGG C AGTGGCACCAGAATG -3'

3.3.1.2. Mutant Zincir Sentez Reaksiyonları

5 µL 10X reaksiyon tamponu

2,5 µL (50 ng) dsDNA kalıp

2,5 µL (125 ng) mutajenik ileri primer

2,5 µL (125 ng) mutajenik geri primer

1 µL dNTP karışımı

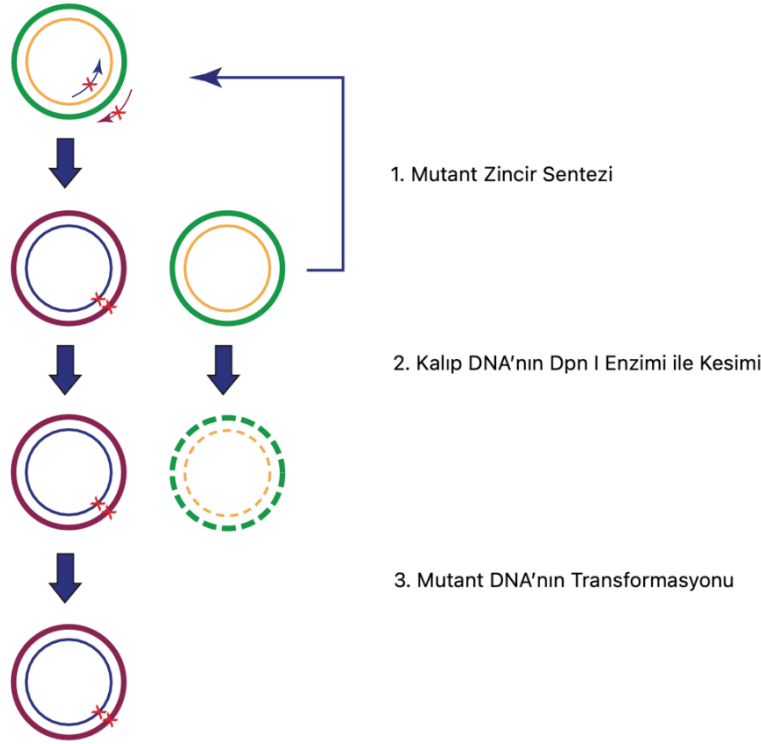
Reaksiyon karışımı son hacim 50 µL olacak şekilde yukarıdaki gibi hazırlandı ve üzerine 1µL PfuTurbo DNA polimeraz (2,5 U/µL) enzimi eklendi. Uygun şartlar altında PZR gerçekleştirilerek mutant genlerin amplifikasyonu sağlandı (Tablo 3-2). Amplifikasyon sonrası örnekler buz üzerine alınarak soğumaları için yaklaşık 2 dakika bekletildi.

Tablo 3-2: PZR koşulları

Döngü	Sıcaklık	Süre
1	95°C	30 saniye
15	95°C	30 saniye
	55°C	1 dakika
	68°C	8 dakika

3.3.1.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Dpn I Enzimi ile Kesimi

1. Dpn I enzimi, 5'-Gm6ATC-3' metilasyonuna sahip kalıp DNA'ların kesilmesini sağlayan bir endonükleazdır. PZR sonucunda mutajenez reaksiyonuna katılmamış, hala ortamda var olan kalıp (WT) DNA'ların ortamdaki uzaklaştırılmaları için, her bir amplifikasyon reaksiyonuna 1 µL Dpn I enzimi (10 U/µL) eklendi.
2. Her bir örnek pipetleme yapılarak nazikçe ve iyice karıştırıldı.
3. Örnekler 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılarak mutant olmayan DNA'ların kesilmesi sağlandı.



Şekil 3-2: Alan hedefli mutajenez (Walquist ve El-Gewely, 2018)

3.3.2. pCMV6 Vektörlerinin *Escherichia coli* Hücrelerine Transformasyonu

Mutant ve WT *AKT1/CTNNB1* pCMV6 vektörlerinin ve boş pCMV6 vektörünün transformasyonu için *Escherichia coli* hücreleri (One Shot® TOP10F' Competent Cells, Invitrogen) kullanıldı. Transformasyon, üretici firma tarafından belirtilen ısı-şok yöntemi temelli protokol kullanılarak gerçekleştirildi.

1. Hücreler buz üzerinde yavaşça çözüldü ve 15 mL'lik falkonlara, 50 µL'lik hacimlerde dağıtıldı.
2. Üzerlerine, Dpn I enzimi ile muamele edilmiş mutant DNA/WT DNA/boş vektör karışımı eklendi ve nazikçe karıştırıldı.
3. Karışım 30 dakika buz üzerinde inkübe edildikten sonra 42°C'de 45 saniye ve ardından buz üzerinde 2 dakika inkübe edildi.
4. Transformasyon sonrası her bir falkona 250 µL SOC sıvı besiyeri ilave edildi ve çalkalamalı inkübatörde 250 rpm'de, 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

5. Hücre karışımından 100 µL alındı ve 25 µg/mL kanamisin içeren LB Broth agar petrilere yayma yöntemi ile ekildi. Ters çevrilen petriler 37°C’de, 1 gece inkübe edildi.

Kullanılan plazmid vektörler kanamisin direnç geni taşımaktadır. Seçici besiyerine (kanamisin içeren LB Broth agar) ekimi yapılan hücre karışımından sadece transforme TOP10F’ hücreleri (kanamisin direnç geni taşıyanlar) çoğalarak, 1 gecelik inkübasyon sonrasında koloni oluşturur.

Kullanılan Çözeltiler:

Stok Kanamisin: 0,25 g kanamisin, 5 mL steril ddH₂O ile çözülerek stok çözeltisi (50 mg/mL) hazırlandı ve küçük hacimlere bölünerek -20°C’de saklandı.

LB Broth Agar: 100 g LB Broth agar 2,5 L ddH₂O içerisinde çözüldü ve 15 dakika 121°C’de otoklavlanarak steril hale getirildi. Otoklav sonrası çözelti 50°C’ye soğutuldu ve 1,25 mL kanamisin çözeltisinden (50 mg/mL) eklenerek karıştırıldı. 20-25 mL LB Broth agar, steril 100 mm’lik petri kaplarına pipetlendi ve katılaşana kadar oda ısısında bekletildi.

3.3.3. Mini Kit ile Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA’ların izolasyonu, Qiagen marka “Plazmid Mini Kit” ile üretici firma tarafından belirtilen protokole uygun şekilde gerçekleştirildi.

1. Petrilere tek bir koloni seçilerek, seçici antibiyotik içeren 3 mL LB besiyeri içerisine eklendi ve çalkalamalı inkübatörde 37°C’de 8 saat 300 rpm’de inkübe edildi.
2. Sekizinci saatin sonunda başlangıç kültürlerinden 6 µL alınarak 3 mL LB besiyerlerine eklendi (1/500 oranında seyreltilti). Çalkalamalı inkübatörde 37°C’de 16 saat 300 rpm’de inkübe edildi.
3. Inkübasyon sonrası bakteri hücreleri, 4°C’de 6000 g’de 15 dakika santrifüje edilerek toplandı.
4. Bakteri pelletleri üzerine 300 µL “P1 (resüpsansiyon) tamponu” eklenerek hücreler süspanse edildi. Süspansiyonlar üzerlerine 300 µL “P2 (lisis) tamponu” ilave edildi. Tüpler, karışmaları için 4-6 kez ters-düz yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

5. Önceden soğutulmuş “P3 (nötralize edici) tamponundan” 300 µL ilave edilerek, tüpler hızlı bir şekilde 4-6 kez ters-düz yapılarak karıştırıldı ve buz üzerinden 5 dakika bekletildi.
6. İnkübasyon sonrası tüpler 4°C’de 18000 g’de 10 dakika santrifüje edildi. Plazmid DNA içeren süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı ve süpernatantlar bir kez daha santrifüje edildi.
7. Qiagen-tip 20 kolonları üzerine 1 mL “QBT (eşitleyici) tamponu” uygulanarak yer çekimi ile boşalmasına izin verildi ve bu yolla kolonlar dengelendi.
8. Dengelenmiş kolonlar üzerine süpernatantlar eklendi ve yer çekimi akışı ile kolona girmeleri beklendi.
9. Kolonlar 2 kez 2 mL “QC (yıkama) tamponu” ile yıkandı ve ardından 800 µL “QF (elüsyon) tamponu” ile elüe edildi.
10. Elüe edilen DNA’lar üzerine 560 µL izopropanol eklenerek DNA’lar çöktürüldü ve ardından 4°C’de 22000 g’de, 30 dakika santrifüje edildi.
11. Süpernatantlar DNA pelletlerine zarar vermeden dikkatlice uzaklaştırıldı. DNA pelletleri 1 mL, %70’lik etanol ile yıkandı ve 10 dakika boyunca 22000 g’de santrifüje edildi.
12. DNA pelletleri 5-10 dakika açık havada kurutuldu ve 50 µL Tris-EDTA (TE) tamponunda (pH:8) çözüldü.
13. Plazmid DNA’ların konsantrasyonları ve saflıkları UV spektrofotometrede 260/280 nm’de ölçüldü. Saf oldukları teyit edilen plazmid DNA örnekleri, mutasyon oluşumunun doğrulanması adına dizi analizine gönderildi.

Kullanılan Çözeltiler

LB Broth Besiyeri: 12,5 g LB Broth tartılarak 500 mL ddH₂O ile çözüldü ve 15 dk, 121°C’de otoklavlandı. Otoklavdan sonrası sıcaklığın 50°C’ye inmesi beklendi ve son konsantrasyon 25 µg/mL olacak şekilde stok kanamisin çözeltisinden eklendi. Çalışmada kullanılmak üzere 4°C’de saklandı.

Tris-EDTA Tamponu (pH:8): 2,5 mL 1 M Tris-HCl ve 5 mL 0,5 M EDTA karıştırılarak ddH₂O ile 250 mL’ye tamamlandı. 121°C’de, 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

1 M Tris-HCl: 12,11 g tris baz üzerine, 4,2 μ L HCl ve ~ 90 mL ddH₂O eklenerek çözüldü. Hacim ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti 121°C'de, 15 dk otoklavlanarak steril hale getirildi.

0,5 M EDTA: 18,61 g EDTA 80 mL ddH₂O ile çözüldü. 1 N NaOH ile çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve sonrasında ddH₂O ile hacim 100 mL'ye tamamlandı. Çözelti 121°C'de, 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

%70'lik Etanol: 72,9 mL %96'lık etanol, steril ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı.

P1, P2, P3, QBT, QC ve QF Tamponları: Satın alınan izolasyon kitinin içerisinde hazır olarak yer almaktadır.

3.3.4. Dizi Analizi

Yaratılan *AKT1* ve *CTNNB1* gen mutasyonlarının varlığının dizi analizi ile doğrulanması için, izole edilen DNA örnekleri Ankara'da faaliyet gösteren "RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji" firmasına gönderildi. Firma tarafından DNA örneklerinin dizi analizleri yapılarak tarafımıza gönderildi. Sonuçlar "SnapGene Viewer 3.2.1" programı yardımı ile okunarak "Nucleotide BLAST" programı (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) ile değerlendirildi.

3.3.5. Maxi Kit ile Plazmid DNA İzolasyonu

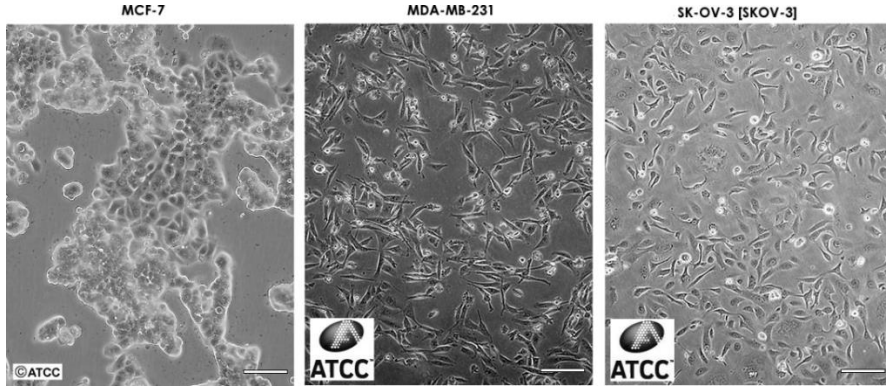
Elde edilen DNA miktarını arttırmak için dizi analizi sonuçlarına göre mutant oldukları doğrulanan başlangıç kültürleri, WT ve boş vektörleri taşıyan başlangıç kültürleri daha büyük hacimde LB Broth besiyeri içinde çoğaltıldı. Çoğaltılan plazmid DNA'lar, Qiagen firması tarafından üretilen "Plazmid Maxi Kit" yardımı ile belirtilen protokole uygun olarak saflaştırıldı.

1. Başlangıç kültürlerinden 100 μ L alınarak içerisinde 100 mL seçici LB besiyeri içeren erlenlere konuldu (1/1000 oranında seyreltildi). Çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 16 saat 300 rpm'de inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrası bakteri hücreleri 4°C'de 6000 g'de 15 dakika santrifüje edilerek toplandı.

3. Bakteri pelletleri üzerine 10 mL P1 tamponu eklenerek süspanse edildi. Ardından üzerlerine 10 mL P2 tamponu ilave edilerek, tüpler 4-6 kez ters-düz yapıldı ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası tüpler üzerine önceden soğutulmuş 10 mL P3 tamponu ilave edilip, 4-6 kez ters-düz yapılarak karıştırıldı ve buz üzerinde 20 dakika bekletildi.
5. Bekleme sonrası tüpler 4°C’de 22000 g’de 30 dakika santrifüje edildi ve plazmid DNA içeren süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı.
6. Aynı adım bir kez daha tekrarlandı.
7. Qiagen-tip 500 kolonları üzerine 10 mL QBT tamponu uygulanarak, yer çekimi ile akışına izin verildi ve bu yolla kolonlar dengelendi.
8. Dengelenmiş Qiagen-500 tip kolonları üzerine süpernatantlar pipetlenerek yer çekimi yardımıyla kolonlara girmeleri beklendi.
9. Kolonlar 2 kez 30 mL QC tamponu ile yıkandı ve ardından 15 mL QF tamponu eklenerek DNA’lar elüe edildi.
10. Elüe edilen DNA’lar üzerine 10,5 mL izopropanol eklenerek DNA’lar çöktürüldü ve ardından 4°C’de 22000 g’de 30 dakika santrifüje edilerek süpernatantlar dikkatlice uzaklaştırıldı.
11. DNA pelletleri 5 mL %70’lik etanol ile yıkandı ve 10 dakika boyunca 22000 g’de santrifüje edildi.
12. DNA pelletleri 5-10 dakika açık havada kurutuldu ve 200 µL TE tamponunda çözüldü.
13. Safılaştırma sonrası plazmid DNA’ların konsantrasyonları ve saflıkları, UV spektrofotometrede 260/280 nm’de ölçülerek ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

3.3.6. Hücre Kültürü

Çalışmamızda, MCF-7 (ATCC; HTB-22) ve MDA-MB-231 (ATCC; HTB-26) meme kanseri hücre serileri ve SKOV-3 (ATCC; HTB-77) yumurtalık kanseri hücre serisi kullanıldı. Hücre serilerinin mikroskopik görüntüleri ve karakteristik özellikleri Şekil 3-3 ve Tablo 3-3’te gösterilmiştir.



Şekil 3-3: Hücre serilerinin yüksek yoğunluktaki mikroskop görüntüleri

<https://www.atcc.org/products/htb-22>, <https://www.atcc.org/products/htb-26>, <https://www.atcc.org/products/htb-77>

Tablo 3-3: Hücre serilerinin karakteristik özellikleri

Hücre	Tür	İrk	Cinsiyet	Yaş	Doku	Kanser Türü	Özellik
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Beyaz	Kadın	69	Meme	Epitelyal adenokarsinom	Adherent/süspansiyon
MDA-MB-231	<i>Homo sapiens</i>	Beyaz	Kadın	51	Meme	Epitelyal adenokarsinom	Adherent
SKOV-3	<i>Homo sapiens</i>	Beyaz	Kadın	64	Yumurtalık	Epitelyal adenokarsinom	Adherent

<https://www.atcc.org/products/htb-22>, <https://www.atcc.org/products/htb-26>, <https://www.atcc.org/products/htb-77>

Hücrelerin çoğaltılması için her hücre serisine özgü besiyerleri hazırlandı ve kullanıldı. MCF-7 hücreleri için %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 U/mL penisilin/100 µg/mL streptomisin ve 0,01 mg/mL rekombinant insan insülinü içeren “Eagle’s Minimum Essential Medium” (EMEM) besiyeri, MDA-MB-231 hücreleri için %10 FBS ve 100 U/mL penisilin/100 µg/mL streptomisin içeren “Roswell Park Memorial Institute” (RPMI) 1640 besiyeri, SK-OV-3 hücreleri için ise %10 FBS ve 100 U/mL penisilin/100 µg/mL streptomisin içeren “McCoy’s 5a Medium Modified” besiyeri kullanıldı.

3.3.6.1. Hücrelerin Çoğaltılması

1. Sıvı azot tankından alınan hücreler hızlıca çözüldü ve 15 mL’lik steril tüplere alındı.
2. Hücrelerin üzerlerine 3 mL besiyeri (her hücre serisine özel olarak hazırlanan) eklendi ve nazikçe pipetlenerek karışmaları sağlandı.

3. Tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüje edilerek santrifüj sonrası süpernatant kısımları atıldı ve hücre pelletleri üzerine taze besiyeri eklendi.
4. Pipetleme yapılarak hücrelerin süspanse hale gelmeleri sağlandı ve steril 75 cm²'lik flasklara alındı.
5. Flasklar 37°C'lik %5 CO₂ içeren nem destekli inkübatöre konuldu.
6. Hücreler her gün invert mikroskop altında kontrol edilerek gelişimleri izlendi ve çoğalmalarının devamını sağlamak üzere iki gün ara ile besiyerleri tazelandı.
7. Flasklardaki hücrelerin doluluk oranı % 70-80'e ulaştığında, hücreler pasajlandı.

3.3.6.2. Hücrelerin Pasajlanması

1. Pasajlanacak flaskların medyumları pipet yardımı ile aspire edildi ve besiyeri kalıntılarından arındırmak için her bir flaska 3 mL DPBS tamponu eklenerek hücrelere zarar vermeden flasklar nazikçe yıkandı.
2. Her bir flaska 2-3 mL Tripsin-EDTA çözeltisi (%0,25) eklenerek 4-5 dakika 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Tripsin-EDTA etkisi ile hücrelerin flask yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılıp ayrılmadığı invert mikroskop altında kontrol edildi.
3. Her bir flaska 3 mL besiyeri eklenerek Tripsin-EDTA çözeltisinin etkisi durduruldu.
4. Hücreler 15 mL'lik tüplere alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi. Süpernatant kısımları atıldı.
5. Hücre pelletleri üzerine 6 mL besiyeri eklenerek pelletler süspanse hale getirildi. 6 mL'lik hücre-besiyeri karışımı 3 farklı flaska bölündü ve üzerlerine 12 mL besiyeri eklenerek çoğalmalarını sağlamak üzere inkübatöre konuldu.
6. Bu şekilde her bir pasaj sonrası her flask, 3'e bölünerek flask sayısı arttırılarak hücreler çoğaltıldı.

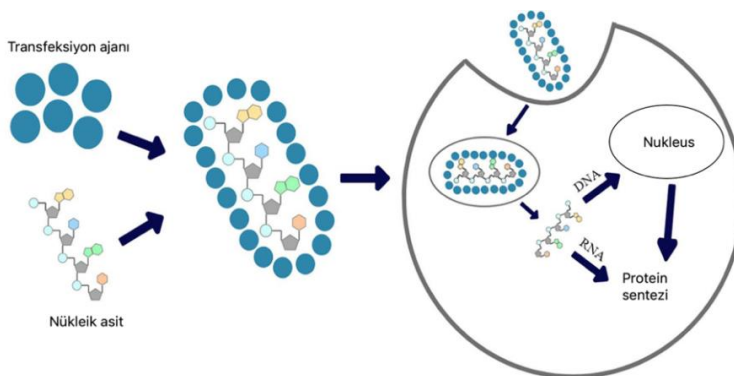
3.3.6.3. Hücrelerin Stoklanması

1. %70-80 doluluk oranına sahip flasklardaki hücreler, yukarıda anlatıldığı şekilde tripsinize edildi ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüje edildi.

2. Süpernatant kısımları atılan hücre pelletleri üzerine %5 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren besiyeri eklenerek hücre pelleti süspanse edildi.
3. Her 1 mL hücre-DMSO'lu besiyeri karışımı, bir steril kriyo tüpe konularak hücreler kademeli olarak (her bir dakikada 1°C düşüş) donduruldu ve sıvı azot tankında saklandı.

3.3.7. Transfeksiyon

Transfeksiyon, konakçı hücrenin genetik yapısını değiştirmek amacı ile DNA, RNA gibi yabancı nükleik asit moleküllerinin ökaryotik bir hücreye kimyasal veya fiziksel metotlar yardımı ile transfer edilmesi işlemidir. Genel olarak transfeksiyon, stabil ve geçici olmak üzere iki tipe ayrılır. Stabil transfeksiyonda, yabancı nükleik asitin konakçı nükleer genomuna entegre edilmesi veya konakçı çekirdeğindeki bir epizomal vektörün kromozom dışı bir element olarak muhafaza edilmesi yoluyla, bir transgenin uzun süreli ekspresyonunun sürdürülmesi sağlanır. Geçici transfeksiyonda ise yabancı DNA bir plazmid formunda veya oligonükleotidler halinde hücre genomuna entegre edilmeden kısa süreli ekspresyonuna (hücreler çoğaldıkça transgen ekspresyonu kaybolacaktır) imkan sağlanması söz konusudur (Chong ve ark., 2021). Transfeksiyonda en çok kullanılan metotlar kimyasal metotlardır ve bu metotların ana prensibi, pozitif yüke sahip transfeksiyon ajanlarının (katyonik lipidler, polimerler, kalsiyum fosfat vb.) negatif yüklü nükleik asit molekülleri ile kompleks oluşturması ve bu yolla negatif yüke sahip hücre membranı ile birleşmesidir (Kim ve Eberwine, 2010) (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: Nükleik asitin hücreye geçici transfeksiyonu-Fus Kujawa ve ark., 2021'den.

Çalışmamızda, “Origene” firması tarafından üretilen “MegaTran 2.0” plazmid DNA transfeksiyon ajanı kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak plazmid DNA’ların MCF-7, MDA-MB-231 ve SKOV-3 hücrelerine geçici transfeksiyonu gerçekleştirildi. MegaTran 2.0, endozomal alım yoluyla yüksek verimli gen aktarımı için DNA’yı etkili bir şekilde yoğunlaştıran ve transfekte edilmiş plazmid DNA’yı lizozomal degradasyondan koruyan, polimer bazlı bir transfeksiyon ajanıdır.

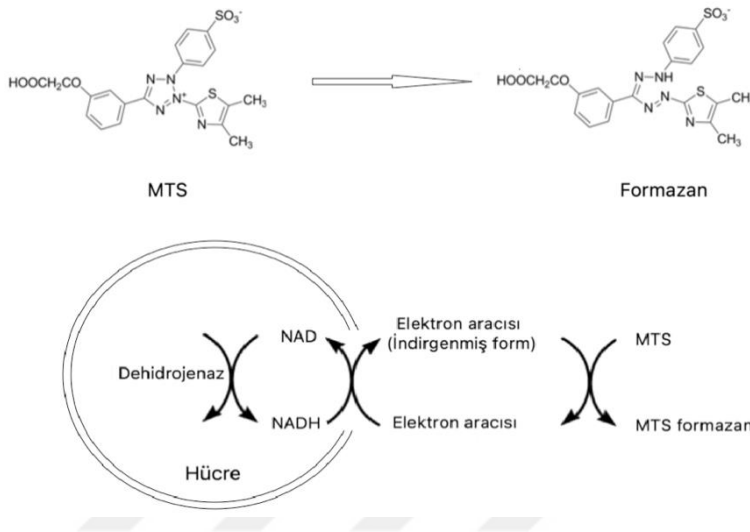
Yöntem

1. Transfeksiyon sırasında petrillerdeki hücre yoğunluğunun %70-80 olması göz önüne alınarak uygun sayıda hücre 100 mm’lik petrilere ekildi ve yapışmaları için 24 saat beklendi.
2. Ertesi gün, transfeksiyondan 30-60 dakika önce, hücrelerin besiyerleri aspire edilerek üzerlerine 5 mL taze besiyer eklendi.
3. Her bir petri için, 1,5 mL’lik deney tüpleri içerisinde 5 µg plazmid DNA ve 500 µL DMEM besiyeri (serum ve antibiyotik içermeyen) kısa süre vorteks ile karıştırıldı.
4. Ardından üzerlerine 15 µL MegaTran 2.0 ajanı eklenerek kısa süre vorteks ile karıştırıldı ve transfeksiyon komplekslerinin oluşmasına izin vermek adına oda sıcaklığında 10-15 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası karışım, hücreler üzerine damla damla verildi ve petrilere 2-3 kez nazikçe, yukarı aşağı hareket ettirilerek karışımın besiyerine dağılması sağlandı.
6. Petrilere transfeksiyonun gerçekleşmesi için %5 CO₂ destekli, 37°C’lik etüvde 17-18 saat inkübe edildi.
7. Bu sürenin sonunda transfeksiyon kompleksi içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine 12 mL taze besiyeri eklendi ve hücrelere çoğalmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı.
8. 24 saatin sonunda hücreler, istenilen analizleri (MTS, Western-Blot) yapmak için tripsinize edilerek toplandı.

3.3.8. MTS Hücre Canlılık Deneyi

MTS, MTT, XTT ve WST hem adherent hem de süspanse hücrelere uygulanabilen, hücre canlılığının kolorimetrik ölçümünde sıklıkla kullanılan

tetrazolyum tuzlarıdır. MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfenil)-2H-tetrazolyum] hücre kültürü ortamında, PMS (fenazin metil sülfat) veya PES (fenazin etil sülfat) gibi ara elektron alıcı reaktiflerin varlığında, doğrudan çözünebilir formazan ürünleri üretmek üzere, canlı hücreler tarafından indirgenir (Terry ve ark. 2016 pp. 1-31). Çalışmamızda, hücre canlılık analizi, MTS deneyi ile gerçekleştirildi. Canlı hücreler tarafından MTS'in indirgenmesi sonucu oluşan rengin (sarı→kahverengi) absorbanşı spektrofotometrik olarak ölçüldü.



Şekil 3-5: MTS'in formazana indirgenmesi

<https://www.creative-bioarray.com/support/comparison-of-different-methods-to-measure-cell-viability.htm>

Yöntem

1. Hücreler sayılarak istenilen sayıda hücre 96 kuyucuklu plaklara, kuyucuk başına toplam hacim 90 μ L olacak şekilde ekildi ve yapışmaları için %5 CO₂ destekli inkübatörde 37°C'de bir gece inkübe edildi.

Hücrelerin sayılması:

- Tripsinize edilerek toplanan hücreler santrifüje edilerek süpernatant kısımları uzaklaştırıldı ve hücre pelletleri üzerine 10 mL taze besiyeri konularak hücreler süspanse hale getirildi.
- Hücre süspansiyonu ve %0,04'lük tripan mavisini eşit hacimde karıştırılarak ölü hücrelerin maviye boyanması sağlandı.
- Bu karışımdan 20 μ L alınarak "Neubauer Improved" hemositometre lamına pipetlendi.

- Mikroskopta 4 alan sayılarak aşağıda yer alan denklem yardımıyla 1 mL hücre süspansiyonunun içerdiği hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Hücre Sayısı} = \frac{4 \text{ Alandaki Toplam Hücre Sayısı} \times \text{Seyreltme Faktörü}}{\text{Sayılan Alan Sayısı}} \times 10^4$$

2. Paklitaksel, besiyeri ile yarı yarıya seyreltilerek 16 farklı ilaç dozu elde edildi ve hücreler üzerine 10 µL ilaç pipetlenerek 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.
3. İnkübasyon süreleri sonunda her kuyuya 20 µL MTS/PMS karışımı (MTS son konsantrasyon: 0,33 mg/mL) eklendi ve plakalar 37°C’de 1-4 saat inkübe edildi.
4. Ardından plakaların absorbanları, mikro-plaka okuyucu ile 490 nm’de ölçüldü.
5. Ölçülen absorban değerleri aşağıda yer alan denklemde yerine konularak hücre ölümü, % inhibisyon cinsinden hesaplandı.

$$\text{Hücre ölümü (\% inhibisyon)} = \left(1 - \frac{\text{Deneyin } 490 \text{ nm'deki Absorbanı}}{\text{Kontrolün } 490 \text{ nm'deki Absorbanı}}\right) \times 100$$

Kullanılan Çözeltiler

%0,04'lük Tripan Mavisi: 40 mg tripan mavisi 100 mL DPBS içerisinde çözüldü ve 0,2 µm por çapına sahip filtreden süzülerek steril hale getirildi.

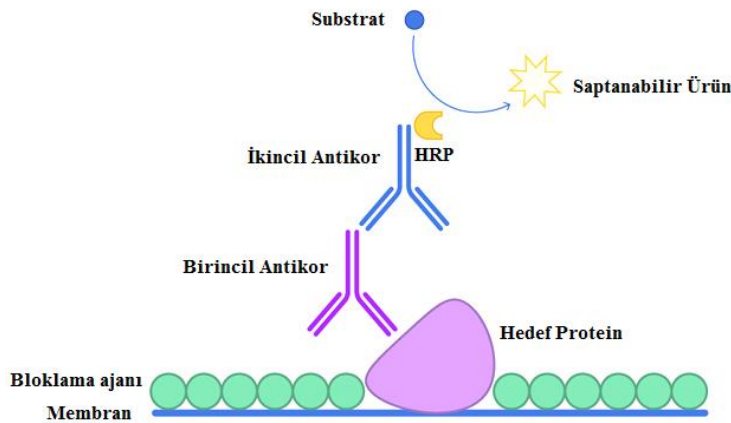
MTS Çözeltisi: 50 mg MTS, 37°C’ye ısıtılmış 25 mL DPBS ile ışıktan korunarak çözüldü. 0,2 µm por çaplı filtre ile sterilize edildi ve daha küçük hacimlere bölünerek -20°C’de saklandı.

PMS Çözeltisi: 4,6 mg PMS, 5 mL DPBS içinde çözüldü. Sterilizasyon için filtreden (0,2 µm) geçirildi ve -20°C’de saklandı.

MTS/PMS Çözeltisi: Deney öncesi 20:1 (MTS:PMS) oranında karıştırılarak kullanıldı.

3.3.9. Western Blot Analizi

İmmünoiblotlama olarak da bilinen Western blot, moleküler biyoloji ve proteomik alanında, bir protein karışımı içerisindeki hedef proteinleri tespit etmek amacıyla kullanılan en yaygın analitik yöntemlerden biridir. Western blot tekniği tipik olarak denatüre edilen proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre jel elektroforezi yoluyla ayrılması, ayrılan proteinlerin membrana (PVDF, nitroselüloz) aktarımı, süt tozu veya BSA ile membranın bloklanması, spesifik antikorların ilgili proteinlere bağlanması ve floresan veya kemilüminesan substratlar ile antijen/antikor bağlanmasını yansıtan bir sinyalin ölçülmesine dayanan çok aşamalı bir tekniktir (Şekil 3-6) (Sule ve ark., 2023). Çalışmamızda, *AKT1* ve *CTNNB1* genlerini taşıyan plazmidlerin, kanser hücre serilerine transfeksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamak için, indirekt Western blot analizi yapıldı.



Şekil 3-6: İndirekt Western blot

HRP (Horseradish Peroxidase): Bayır turbu peroksidazı

<https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/western-blot-procedures-analysis-and-purpose-353918>

3.3.9.1. Hücre Lizatı Elde Edilmesi

1. Hücrelerin besiyerleri aspire edildi ve hücreler DPBS ile yıkandı.
2. Hücreler üzerine Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek, hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkması sağlandı ve temiz bir tüpe toplandı.

3. Toplanan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüje edilerek çöktürüldü ve süpernatant kısımları atıldı.
4. Hücre pelletleri DPBS ile süspanse edilerek yıkandı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüje edilerek çöktürüldü, süpernatantları uzaklaştırıldı.
5. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
6. Hücre pelletleri önceden soğutulmuş 250 µL RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) Tamponu (Lizis Tamponu) ile süspanse edildi ve buz üzerinde 20 dakika bekletildi.
7. 20 dakikanın sonunda tüpler, 4°C'de 20000 g'de 30 dakika santrifüje edildi.
8. Süpernatantlar temiz tüplere alındı ve Western-Blot çalışmasında kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.3.9.2. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

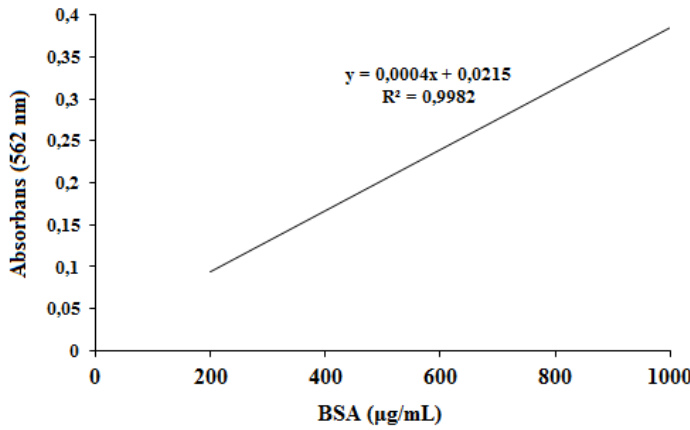
BCA, alkali bir ortamda Cu^{+1} iyonları ile yoğun mor renkli bir kompleks oluşturabilen, stabil, suda çözünebilen bir bileşiktir. BCA yöntemi, proteinlerin alkali ortamda Cu^{+2} ile reaksiyonu sonucu üretilen bakır iyonunu (biüre reaksiyonu) izleyebilen analitik bir yöntemdir. Bu reaksiyon sonucu oluşan mor renk stabildir ve bu mor renk, artan protein konsantrasyonu ile orantılı bir şekilde artar. Hassasiyet oranı oldukça yüksek olan bu yöntemde, basit tampon tuzları ve iyonik olmayan deterjanlar ile girişim oranı ise düşüktür (Smith ve ark., 1985).

Çalışmamızda, hücre lizatlarının protein miktarı Sigma firması tarafından üretilen BCA kiti kullanılarak, üretici firma tarafından belirtilen protokole uygun olarak 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirildi.

Yöntem

1. Her bir örnekten 10 µL 96'lık plakanın kuyucuklarına pipetlendi, üzerlerine 80 µL BCA çalışma çözeltisi eklendi ve 96 kuyucuklu plaka karanlıkta 60°C'de 15 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrası kuyuların absorbansı mikro-plaka okuyucuda 562 nm'de ölçüldü.

3. Kontrol olarak 5 farklı konsantrasyonda (1000-800-600-400-200 µg/mL) sığır serum albumin (BSA) çözeltisi kullanıldı ve BSA standart eğrisi (absorbansa karşı konsantrasyon eğrisi) çizildi (Şekil 3-7).
4. Elde edilen standart eğri denklemi yardımı ile örneklerin protein miktarları hesaplandı.



Şekil 3-7: Sığır serum albumini (BSA) standart eğrisi

3.3.9.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

1. Örnekler RIPA tamponu ile son konsantrasyon 20 µg protein olacak şekilde seyreltildi.
2. Seyreltilen örnekler 1:1 oranında yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 100 °C’lik ısı bloğunda 5 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası denatüre olan örnekler, AnykD SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklendi.
4. Jel yürütme tamponu (Tris/Glisin/SDS) içerisinde, 100 voltta 1 saat yürütüldü ve örneklerin moleküler ağırlıklarına bağlı olarak birbirinden ayrılması sağlandı.

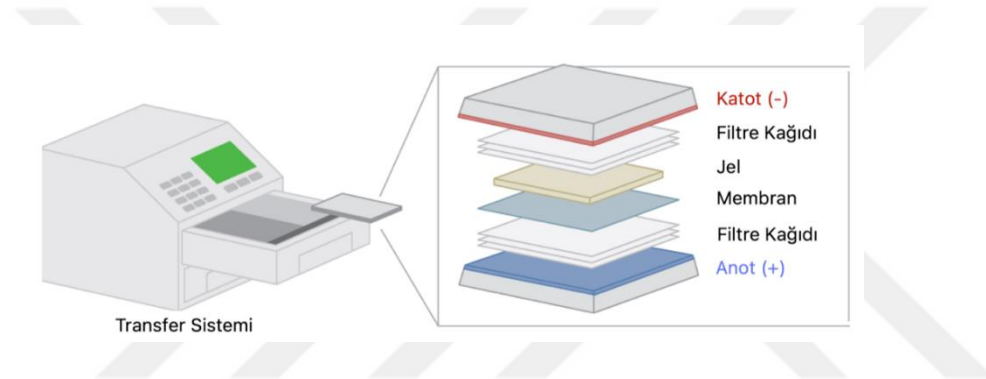
3.3.9.4. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi (Blotlama)

Birbirinden ayrılan proteinlerin PVDF (Poliviniliden Florür) membrana aktarılmasında, “Yarı-Kuru (Semi-Dry) Yöntem” kullanıldı ve Bio-Rad firması tarafından üretilen “Trans-Blot Turbo” transfer sistemi ile PVDF Transfer Kiti

kullanıldı. Firma tarafından belirtilen protokole uyulurak transfer işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3-8).

Yöntem

1. PVDF membran absöü metanol içerisinde 5 dakika bekletildi.
2. 5 dakika sonunda membran ve filtre kağıtları, transfer tamponu içerisinde 5 dakika inkübe edildi.
3. Transfer tamponu ile doygun hale gelen filtre kağıtları arasına, membran ve jel yerleştirilerek “Trans-Blot Turbo” sistemi içine yerleştirildi ve sistem çalıştırılarak elektrik akımı ile jeldeki proteinlerin PVDF membrana aktarılması sağlandı.



Şekil 3-8: Yarı-kuru transfer

<https://www.labconscious.com/green-lab-tips/the-pros-and-cons-of-wet-semi-dry-and-dry-transfer-for-western-blots>

3.3.9.5. Membranın Bloklanması

Antikorların PVDF membranına non-spesifik bağlanmalarını en aza indirmek için, membran 10 mL %5’lik yağsız süt tozu içerisinde orbital çalkalayıcı yardımıyla (150 rpm), oda ısısında 1 saat inkübe edilerek bloklandı.

3.3.9.6. Membrana Birincil Antikorum Bağlanması

Birincil antikorlar (anti-DDK ve anti-beta aktin) 10 mL %5’lik yağsız süt tozu çözeltisi içerisinde uygun miktarlarda pipetlenerek karıştırıldı ve bloklanmış membran hazırlanan bu karışım ile 4°C’de 1 gece boyunca orbital çalkalayıcı yardımı ile (150 rpm) inkübe edildi. Ertesi sabah, antikorlu karışım membrandan uzaklaştırılarak, membran çalkalayıcı üzerinden 10 mL TBS-T tamponu ile 5 dk boyunca 5 kez yıkandı. Bu yıkamalar ile membran, primer antikor kalıntılarından arındırılmış oldu.

3.3.9.7. Membrana Sekonder Antikörün Bağlanması

Birincil antikör bağlı membran, 10 mL %5'lik süt tozu içerisindeki “horseradish” peroksidaz (HRP) içeren ikincil antikörler (anti-rabbit ve anti-mouse) ile oda sıcaklığında 1 saat orbital çalkalayıcıda (150 rpm) inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında membran üzerindeki antikör karışımı uzaklaştırıldı ve membranın ikincil antikörden arındırılması için membran, 10 mL TBS-T tamponu ile 5 kez 5 dk boyunca yıkandı.

3.3.9.8. Kemilüminesans Substrat ile Inkübasyon ve Görüntüleme

“Horseradish” peroksidaz (HRP) ile katalize edilerek geliştirilmiş kemilüminesans, Western blot analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hedef proteine bağlanmış birincil antiköre güçlü bir şekilde bağlanan ikincil antikör HRP ile konjuge haldedir. HRP etkisi ile luminol (kemilüminesans) substrat hidrojen peroksit ile oksidasyona uğrar. Ortaya çıkan oksidasyon ürünü 3-aminofitalattır ve karanlık ortamda ışığa yapar (kemilüminesans) (Alegria-Schaffer ve ark., 2009).

Çalışmamızda ikincil antikörden arındırılmış membran üzerine 2 mL kemilüminesans substrat karışımı eklendi ve 5 dk boyunca pipetleme yapılarak membran tüm yüzeyinin karışım ile temas etmesi sağlandı. Ardından membran jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi ve protein bant görüntüleri kaydedildi. Protein bant yoğunlukları, “Image J” programı yardımı ile analiz edildi.

3.3.9.9. Antikörlerin Membrandan Ayrılması

Aynı membran üzerinde ikinci bir proteinin görüntülenebilmesi için, antikörlerin bağlı bulundukları membran yüzeyinden uzaklaştırılmaları ve yeni antikörlerin membrana bağlanması gerekir. Çalışmamızda görüntüleme sonrasında membran yüzeyine bağlı antikörlerin ayrılması amacı ile kuvvetli ayırma (stripping) tamponu kullanıldı.

Yöntem

1. 20 mL ayırma tamponu 50°C'ye ısıtılarak, membran üzerine eklendi ve membran 50°C'ye ayarlanmış çalkalamalı inkübatörde (150 rpm) 30 dk inkübeasyona bırakıldı.

2. İnkübasyon sonunda ayırma tamponu uzaklaştırıldı ve membran çalkalamalı inkübatör (150 rpm) üzerinde ultra saf su ile 5 dakikada bir suyu tazelenerek, oda ısısında 1 saat boyunca yıkandı.
3. Yıkamanın ardından membran 5 kez 5 dakika süresince 10 mL TBS-T tamponu ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı.
4. Yukarıda anlatılan bloklama-görüntüleme arasındaki basamaklar yeni proteinin görüntülenmesi için takip edildi.

Kullanılan Çözeltiler

BCA Çalışma Çözeltisi: Deney öncesinde BCA solüsyonu ve %4'lük bakır (II) sülfat pentahidrat çözeltisi 50:1 oranında karıştırıldı.

Stok BSA Çözeltisi (1000 µg/mL): 1 g BSA, 1 mL ddH₂O'da çözülde.

RIPA Tamponu: 10 mL 1,5 M NaCl, 5 mL 1 M Tris-HCl (pH:8), 50 mL %1'lik sodyum deoksikolat, 20 mL %0,5'lik SDS ve 1 mL Nonidet P-40 karıştırılarak ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı.

1 M Tris-HCl (pH:8): 12,11 g Tris, 80 mL ddH₂O ile çözülerek HCl ilavesi ile pH'sı 8'e ayarlandı ve ardından ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı.

1,5 M NaCl: 8,76 g NaCl son hacim 100 mL olacak şekilde ddH₂O ile çözülde.

%1 Sodyum Deoksikolat: 1g sodyum deoksikolat tartılarak 100 mL ddH₂O'da çözülde.

%0,5'lik SDS: 0,5 g SDS 100 mL ddH₂O ile çözülde.

Yürütme Tamponu: 3,03 g Tris, 14,26 g glisin ve 1 g SDS son hacim 1 L olacak ddH₂O ile çözülde.

TBS-T (Tris Buffered Saline with Tween 20) Tamponu (pH 7,5): 100 mM Tris çözeltisinden 200 mL, 750 mM NaCl çözeltisinden 200 mL ve Tween 20'den 1 mL alınarak karıştırıldı, hacim ddH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.

100 mM Tris: 12,1 g Tris ddH₂O içerisinde son hacim 1 L olacak şekilde çözülde.

750 mM NaCl: 3,83 g NaCl ddH₂O ile çözülde ve 1 L'ye tamamlandı.

Yağsız Süt Tozu (%5): 2,5 g yağsız süt tozu, 50 mL TBS-T tamponu içerisinde çözülerek filtre kağıdı yardımı ile süzüldü ve 4°C’de saklandı.

Kemilüminesans Substrat Karışımı: Bio-Rad firması tarafından üretilen kemilüminesans kiti (Clarity™ Western ECL Substrate) kullanıldı. Kit içeriğinde yer alan Luminal substrat ve hidrojen peroksit, 1:1 oranında karıştırıldı.

Kuvvetli Ayırma Tamponu: 40 mL %10’luk SDS, 25 mL 0,5 M Tris-HCl (pH:6,8), 133,4 mL ddH₂O içerisinde çözüldü ve karışıma 1,6 mL β-merkaptoetanol ilave edildi.

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8): 6,057 g Tris çözülerek HCl ile pH ayarı yapıldıktan sonra ddH₂O ile 100 mL’ye tamamlandı.

%10 SDS: 10 g SDS son hacim 100 mL olacak şekilde ddH₂O ile çözüldü.

3.3.10. İstatistiksel Analiz

Bulguların istatistiksel analizleri, IBM SPSS Statistics versiyon 21 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı analizler, normal dağılıma sahip değişkenler için ortalama ve standart sapma kullanılarak verildi. İki den fazla grup arasındaki istatistiksel değerlendirmelerde, tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunduğunda, farklılığa neden olan grup veya grupların tespit edilmesinde, ikili post-hoc karşılaştırmalar Tukey testi kullanıldı. $p < 0,05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Mini Kit ile İzole Edilen Plazmid DNA'lar

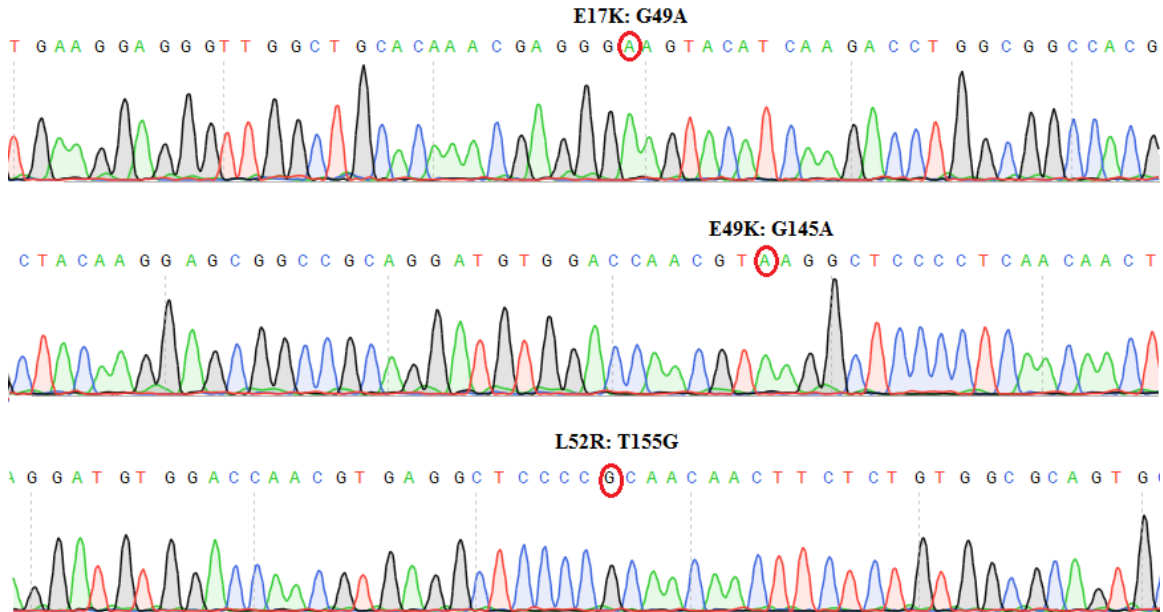
Mini izolasyon kiti kullanılarak izole edilen plazmid DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları ölçüldü, ölçümlere ait değerler Tablo 4-1'de verildi.

Tablo 4-1: Plazmid DNA konsantrasyonları ve saflıkları (Mini kit)

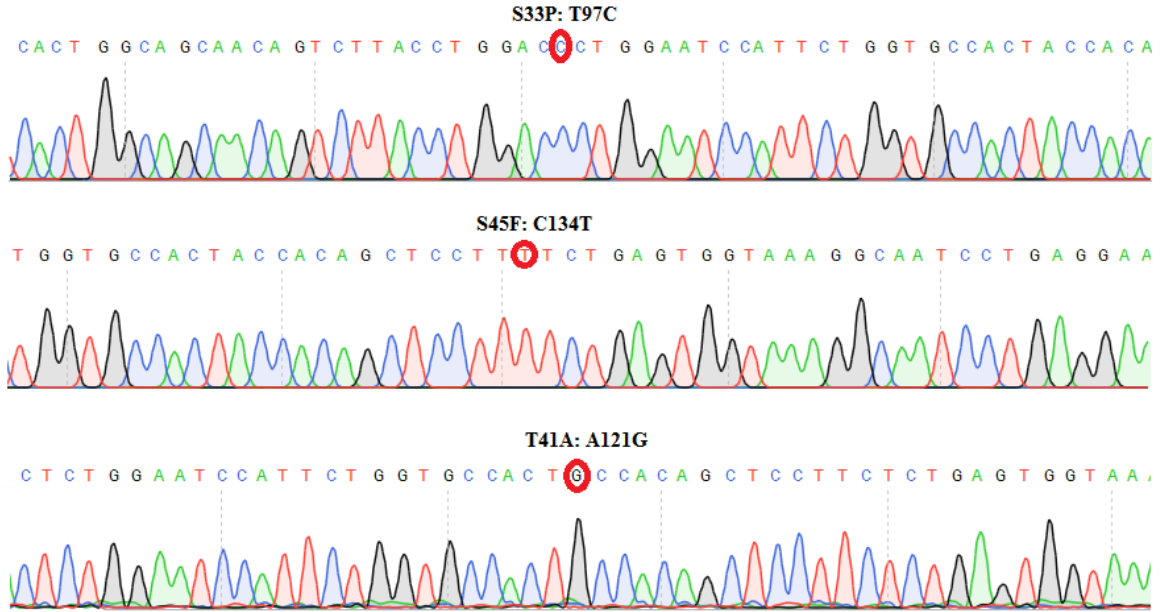
DNA	Konsantrasyon (ng/μL)	Saflık (A260/280)
<i>AKT1</i> WT	547,839	1,853
<i>AKT1</i> E17K	724,396	1,892
<i>AKT1</i> E49K	649,145	1,841
<i>AKT1</i> L52R	798,328	1,875
<i>CTNNB1</i> WT	653,577	1,849
<i>CTNNB1</i> S33P	552,602	1,927
<i>CTNNB1</i> S45F	830,346	1,854
<i>CTNNB1</i> T41A	692,346	1,847

4.2. Dizi Analizi

AKT1 ve *CTNNB1* gen mutasyonlarının doğruluğunu gösteren dizi analizi sonuçları Şekil 4-1 ve Şekil 4-2'de verildi.



Şekil 4-1: *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonlarına ait kromatogramlar.



Şekil 4-2: *CTNNB1* S33P, S45F ve T41A mutasyonlarına ait kromatogramlar.

4.3. Maxi Kit ile İzole Edilen Plazmid DNA'lar

Maxi izolasyon kiti kullanılarak izole edilen plazmid DNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflıkları ölçüldü, ölçümlere ait değerler Tablo 4-2'de verildi.

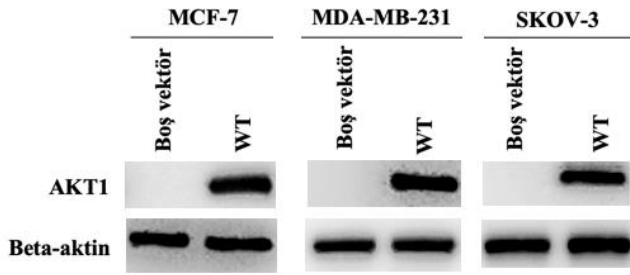
Tablo 4-2: Plazmid DNA konsantrasyonları ve saflıkları (Maxi kit)

DNA	Konsantrasyon (ng/μL)	Saflık (A260/280)
<i>AKT1</i> WT	3502,55	1,855
<i>AKT1</i> E17K	2909,57	1,846
<i>AKT1</i> E49K	2776,28	1,879
<i>AKT1</i> L52R	3454,59	1,869
<i>CTNNB1</i> WT	3409,17	1,851
<i>CTNNB1</i> S33P	2885,24	1,875
<i>CTNNB1</i> S45F	3369,61	1,834
<i>CTNNB1</i> T41A	2785,6	1,891

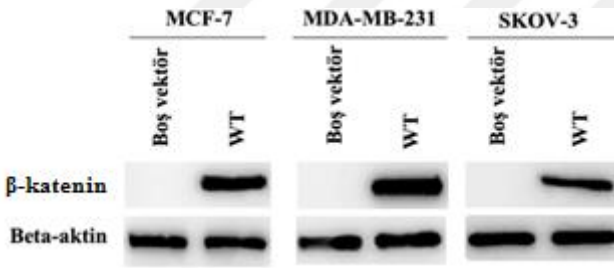
4.4. Western Blot Analizi

Boş vektör, *AKT1/CTNNB1* WT ve mutant genleri taşıyan plazmidler ile transfekte edilen hücrelerin lizatları, Anti-Myc DDK antikoru kullanılarak Western Blot ile analiz edildi. Analizler sonucunda beklenildiği gibi, boş vektör içeren hücre

örneklerinde herhangi bir bant gözlenmezken, *AKT1* ve *CTNNB1* WT genleri içeren hücre örneklerinde immünoreaktif protein bantları gözlemlendi (Şekil 4-3 ve Şekil 4-4). WT ile transfekte hücre örneklerinde immünoreaktif protein bantlarının görülmesi, transfeksiyon işleminin başarılı olduğunu gösterdi.



Şekil 4-3: MCF-7, MDA-MB-231 ve SKOV-3 hücrelerinde boş vektör ve AKT1 WT'ye ait immünoreaktif protein bantları.

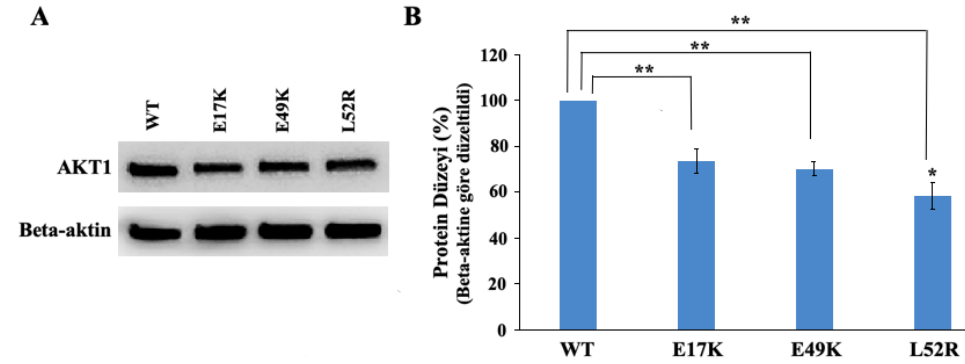


Şekil 4-4: MCF-7, MDA-MB-231 ve SKOV-3 hücrelerinde boş vektör ve β-katenin WT'ye ait immünoreaktif protein bantları.

AKT1 WT ile mutasyonlarını ve CTNNB1 WT ile mutasyonlarını içeren hücre örneklerine ait immünoreaktif protein bantlarının yoğunlukları “Image J” programı kullanılarak hesaplandı. AKT1 ve CTNNB1 WT proteinlere ait bant yoğunlukları, mutant protein bant yoğunlukları ile, ikili post-hoc analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

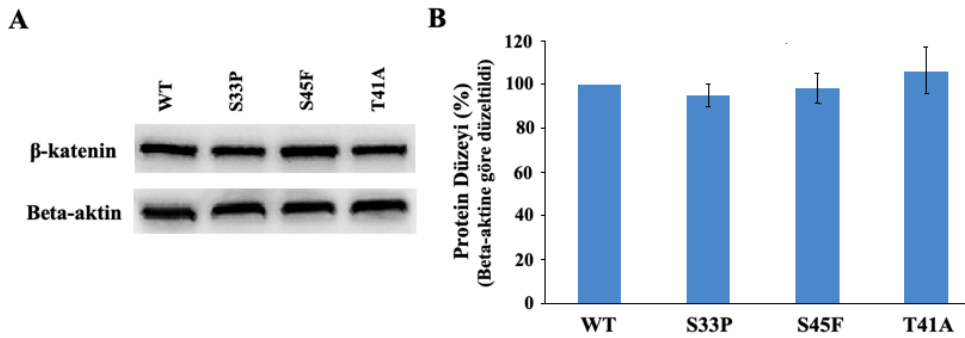
Analiz sonuçlarına göre, MCF-7 hücrelerinde AKT1 WT ile AKT1 E17K, E49K ve L52R mutasyonlarına ait immünoreaktif protein düzeyleri karşılaştırıldığında, üç mutasyona ait immünoreaktif protein düzeyleri WT'ninkinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($p < 0,005$). Mutant immünoreaktif protein düzeyleri kendi arasında kıyaslandığında ise, AKT1 L52R'ye ait protein düzeyi AKT1

E17K ve E49K'ninkilerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4-5). MCF-7 hücrelerinde CTNNB1 WT ile CTNNB1 S33P, S45F ve T41A mutasyonlarına ait immünoaktif protein düzeyleri karşılaştırıldığında ise, protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-5: MCF-7 hücrelerinde AKT1 ve beta-aktin immünoaktif protein bantları (A) ve AKT1 WT, E17K, E49K ve L52R immünoaktif protein düzeyleri (B).

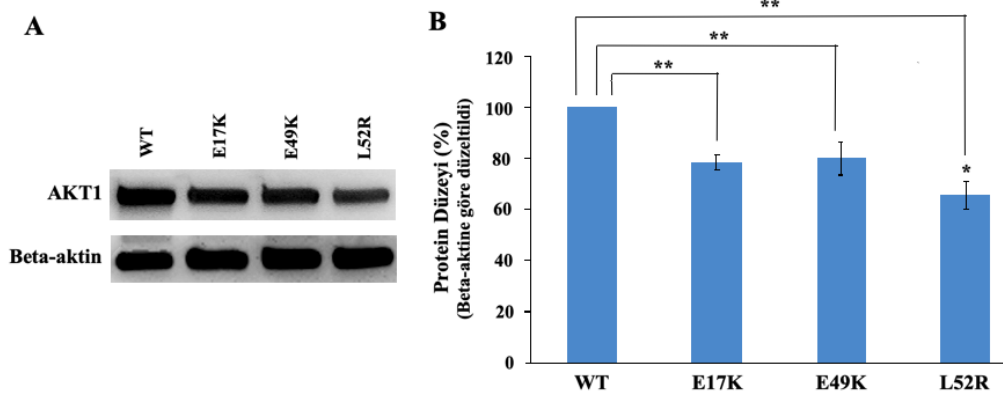
* L52R immünoaktif protein düzeyi , E17K ve E49K immünoaktif protein düzeyleri ile kıyaslanmıştır ($p<0,05$), ** $p<0,005$.



Şekil 4-6: MCF-7 hücrelerinde beta-katenin ve beta-aktin immünoaktif protein bantları (A) ve beta-katenin WT, S33P, S45F ve T41A immünoaktif protein düzeyleri (B).

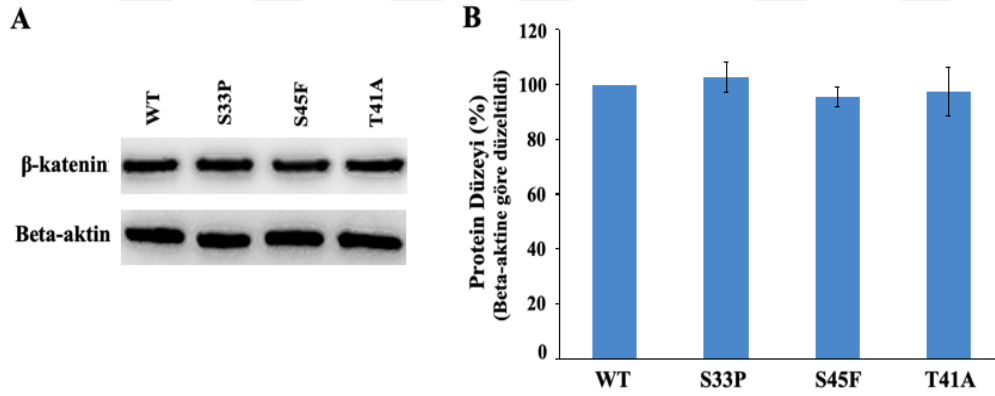
MDA-MB-231 hücrelerinde AKT1 WT ile AKT1 E17K, E49K ve L52R mutasyonlarına ait immünoaktif protein düzeyleri karşılaştırıldığında, üç mutasyona ait immünoaktif protein düzeyleri WT'ninkinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($p<0,005$). Mutant immünoaktif protein düzeyleri kendi arasında kıyaslandığında ise, AKT1 L52R'ye ait protein düzeyi AKT1 E17K ve E49K'ninkilerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı

($p < 0,05$) (Şekil 4-7). MDA-MB-231 hücrelerinde CTNNB1 WT ile CTNNB1 S33P, S45F ve T41A mutasyonlarına ait immünoreaktif protein düzeyleri karşılaştırıldığında ise, protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmadı ($p > 0,05$) (Şekil 4-8).



Şekil 4-7: MDA-MB-231 hücrelerinde AKT1 ve beta-aktin immünoreaktif protein bantları (A) ve AKT1 WT, E17K, E49K ve L52R immünoreaktif protein düzeyleri (B).

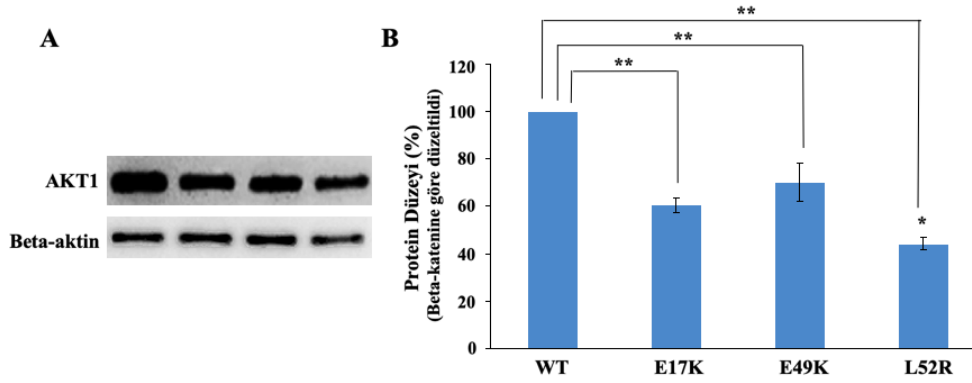
* L52R immünoreaktif protein düzeyi , E17K ve E49K immünoreaktif protein düzeyleri ile kıyaslanmıştır ($p < 0,05$), ** $p < 0,005$.



Şekil 4-8: MDA-MB-231 hücrelerinde beta-katenin ve beta-aktin immünoreaktif protein bantları (A) ve beta-katenin WT, S33P, S45F ve T41A immünoreaktif protein düzeyleri (B).

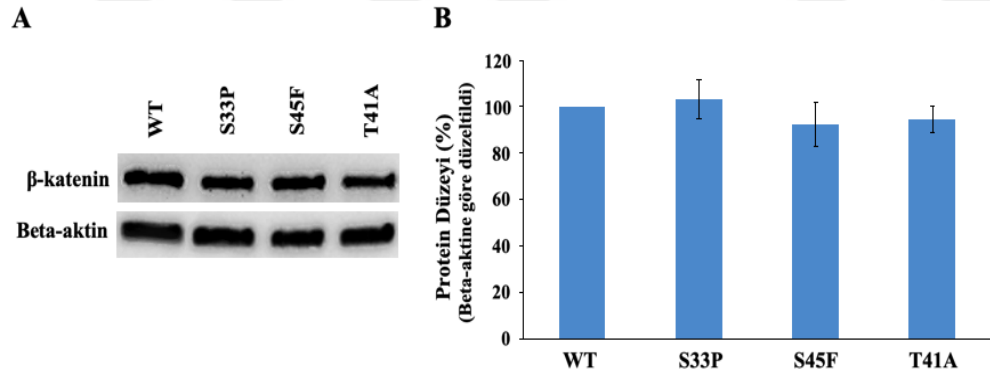
SKOV-3 hücrelerinde AKT1 WT ile AKT1 E17K, E49K ve L52R mutasyonlarına ait immünoreaktif protein düzeyleri karşılaştırıldığında, üç mutasyona ait immünoreaktif protein düzeyleri WT'ninkinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($p < 0,005$). Mutant immünoreaktif protein düzeyleri kendi arasında kıyaslandığında ise, AKT1 L52R'ye ait protein düzeyi AKT1 E17K ve E49K'ninkilerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptandı

($p<0,005$) (Şekil 4-9). Aynı hücrelerde CTNNB1 WT ile CTNNB1 S33P, S45F ve T41A mutasyonlarına ait immünoaktif protein düzeyleri karşılaştırıldığında ise, protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-10).



Şekil 4-9: SKOV-3 hücrelerinde AKT1 ve beta-aktin immünoaktif protein bantları (A) ve AKT1 WT, E17K, E49K ve L52R immünoaktif protein düzeyleri (B).

* L52R immünoaktif protein düzeyi, E17K ve E49K immünoaktif protein düzeyleri ile kıyaslanmıştır ($p<0,005$), ** $p<0,005$.



Şekil 4-10: SKOV-3 hücrelerinde β -katenin ve beta-aktin immünoaktif protein bantları (A) ve β -katenin WT, S33P, S45F ve T41A immünoaktif protein düzeyleri (B).

4.5. MCF-7 Hücrelerinde AKT1 ve CTNNB1 Mutasyonlarının Paklitaksel Direnci Üzerine Etkisi

4.5.1. MCF-7 Hücrelerinde AKT1 WT ve Mutasyonlarının Paklitaksel Direnci Üzerine Etkisi

AKT1 WT ve mutasyonlarını (E17K, E49K ve L52R) taşıyan MCF-7 hücreleri, paklitaksel ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek hücre ölüm yüzdeleri MTS analiz ile

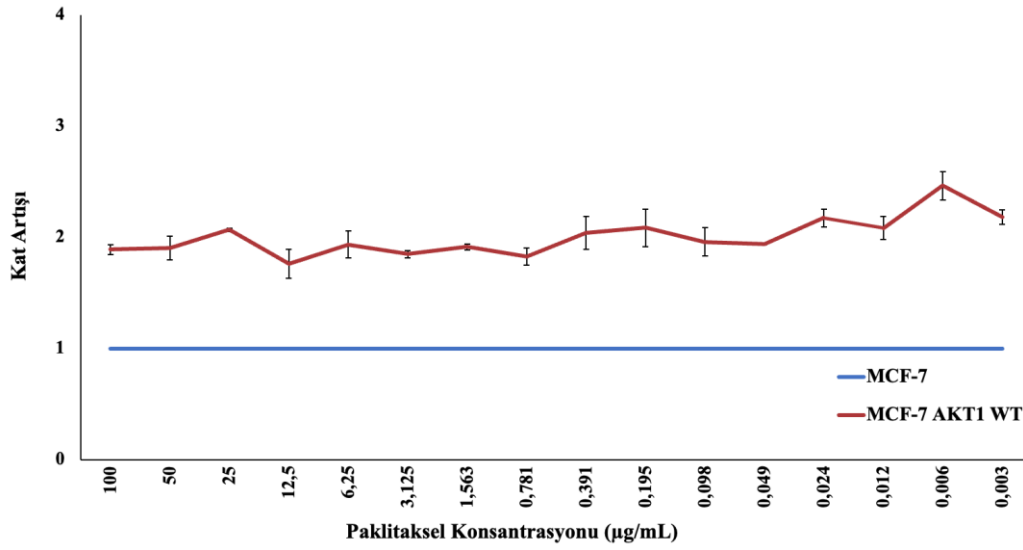
belirlendi. 24. ve 48. saatler sonunda, paklitakselin çalışılan tüm dozları için (100-0,003 $\mu\text{g/mL}$), *AKT1* WT ve mutasyonlarını taşıyan MCF-7 hücrelerinde herhangi bir hücre ölümü saptanmadı. 72 saatlik inkübasyon sonunda ise, paklitakselin çalışılan tüm dozları için, *AKT1* E17K ve E49K mutasyonlarını taşıyan MCF-7 hücrelerinde hücre ölümü görülmezken, *AKT1* WT (en yüksek dozda %50,00) ve L52R mutasyonuna (en yüksek dozda %48,60) sahip MCF-7 hücrelerinde hücre ölümü görüldü (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat)

Paklitaksel ($\mu\text{g/mL}$)	Hücre Ölümü-72 saat (% İnhibisyon)			
	WT	E17K	E49K	L52R
100	50,00 $\pm$ 1,00	-	-	48,60 $\pm$ 3,24
50	47,91 $\pm$ 2,50	-	-	48,97 $\pm$ 3,55
25	43,35 $\pm$ 0,56	-	-	41,07 $\pm$ 0,90
12,5	38,80 $\pm$ 2,99	-	-	38,67 $\pm$ 1,53
6,25	35,03 $\pm$ 1,95	-	-	35,67 $\pm$ 2,08
3,125	37,90 $\pm$ 1,55	-	-	36,77 $\pm$ 1,66
1,563	37,80 $\pm$ 1,84	-	-	34,07 $\pm$ 2,73
0,781	40,57 $\pm$ 1,25	-	-	36,00 $\pm$ 2,65
0,391	36,94 $\pm$ 2,75	-	-	38,87 $\pm$ 3,38
0,195	35,71 $\pm$ 2,35	-	-	35,12 $\pm$ 2,55
0,098	38,27 $\pm$ 2,37	-	-	36,77 $\pm$ 1,50
0,049	38,67 $\pm$ 0,25	-	-	36,10 $\pm$ 3,06
0,024	34,33 $\pm$ 1,15	-	-	35,43 $\pm$ 3,31
0,012	33,11 $\pm$ 1,49	-	-	29,23 $\pm$ 2,30
0,006	21,80 $\pm$ 1,61	-	-	24,50 $\pm$ 2,17
0,003	21,33 $\pm$ 1,22	-	-	19,02 $\pm$ 1,51

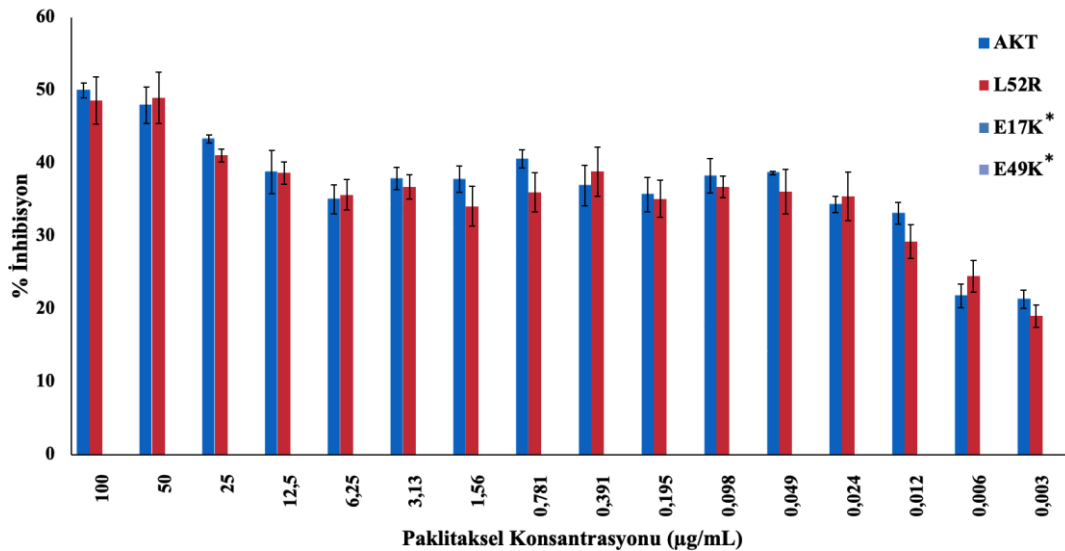
Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3). “-” hücre ölümünün olmadığını ifade etmektedir.

AKT1 WT ile transfekte edilen ve edilmeyen (sadece “housekeeping” *AKT1* içeren) MCF-7 hücrelerinin hücre ölüm yüzdeleri karşılaştırıldığında, 72. saatte, çalışılan tüm ilaç dozlarında (100-0,003 $\mu\text{g/mL}$), *AKT1* WT ile transfekte hücrelerin hücre ölüm yüzdesinin, *AKT1* WT ile transfekte edilmeyen hücrelerininkinden, istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) derecede düşük olduğu görüldü. Bu sonuçlar, *AKT1* ifade edilişindeki artışın, ilaç direnci ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. 72. saatteki, artmış *AKT1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-11’de gösterilmiştir.



Şekil 4-11: MCF-7 hücrelerinde *AKT1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).

AKT1 WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 72. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *AKT1* WT ile L52R arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$), *AKT1* WT ile E17K ve *AKT1* WT ile E49K arasında ise istatistiksel olarak belirgin bir farklılık olduğu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).

“*” Bu mutasyonlarda hücre ölümü (% inhibisyon) görülmüdü.

Bu bulgular, *AKT1* E17K ve E49K mutasyonlarının, WT’ye göre daha fazla paklitaksel direncine neden olduğunu ve bu direncin her iki mutasyon için benzer

olduğunu gösterdi. Ayrıca, *AKT1* L52R mutasyonunun *AKT1* WT'ye benzer bir ilaç direncine neden olduğu saptandı.

4.5.2. MCF-7 Hücrelerinde *CTNNB1* Mutasyonları ve Paklitaksel Direnci

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını (S33P, S45F ve T41A) taşıyan MCF-7 hücreleri, paklitaksel ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek hücre ölümleri yüzdeleri MTS analizi ile belirlendi. 24. saatte, çalışılan 12,5-0,003 µg/mL doz aralığında, paklitakselin *CTNNB1* WT ve mutasyonları üzerinde herhangi bir hücre ölümüne neden olmadığı görüldü. 100-25 µg/mL dozlarında ise, *CTNNB1* S45F ve T41A mutasyonlarını taşıyan hücrelerde paklitakselin herhangi bir etkisi gözlenmezken, *CTNNB1* WT ve S33P mutasyonunu taşıyan hücrelerde hücre ölümü görüldü (Tablo 4-4).

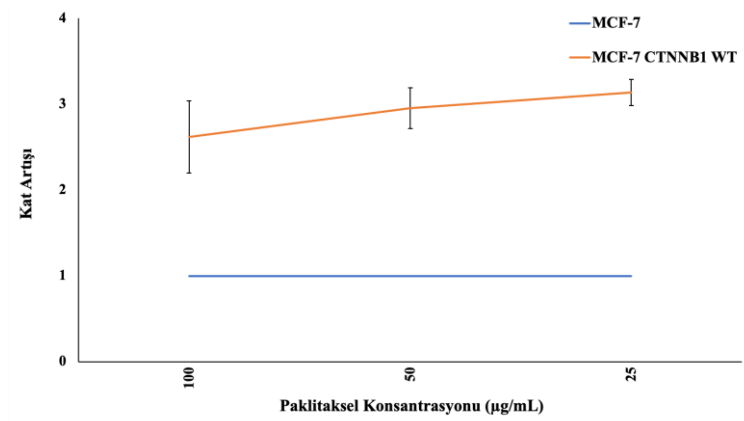
Tablo 4-4: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-24 saat (% İnhibisyon)			
	WT	S33P	S45F	T41A
100	11,63 ± 1,48	12,71 ± 1,14	-	-
50	8,29 ± 1,54	9,00 ± 0,92	-	-
25	6,14 ± 1,39	6,67 ± 1,14	-	-
12,5	-	-	-	-
6,25	-	-	-	-
3,125	-	-	-	-
1,563	-	-	-	-
0,781	-	-	-	-
0,391	-	-	-	-
0,195	-	-	-	-
0,098	-	-	-	-
0,049	-	-	-	-
0,024	-	-	-	-
0,012	-	-	-	-
0,006	-	-	-	-
0,003	-	-	-	-

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3). “-” hücre ölümünün olmadığını ifade etmektedir.

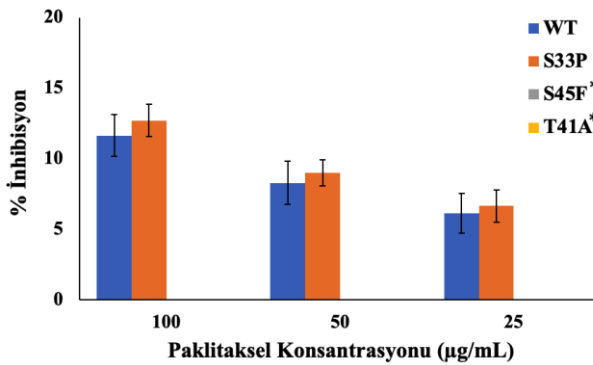
CTNNB1 WT ile transfekte MCF-7 hücreleri, transfekte edilmemiş MCF-7 hücreleri (“housekeeping” *CTNNB1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 24. saatte, 100-25 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* WT ile transfekte MCF-7 hücrelerinin hücre ölüm yüzdelerinin, transfekte edilmemiş MCF-7 hücrelerininkinden, istatistiksel olarak

anlamlı ($p<0,05$) derecede düşük olduğu görüldü. Bu sonuçlar, *CTNNB1* ifade edilişindeki artışın ilaç direnci ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. 24. saatteki, artmış *CTNNB1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-13'te gösterilmiştir.



Şekil 4-13: MCF-7 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 24. saatte, 100-25 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* WT ile S33P arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$), *CTNNB1* WT ile S45F ve *CTNNB1* WT ile T41A arasında ise istatistiksel olarak belirgin bir farklılık olduğu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4-14).



Şekil 4-14: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).

“*” Bu mutasyonlarda hücre ölümü (% inhibisyon) görülmedi.

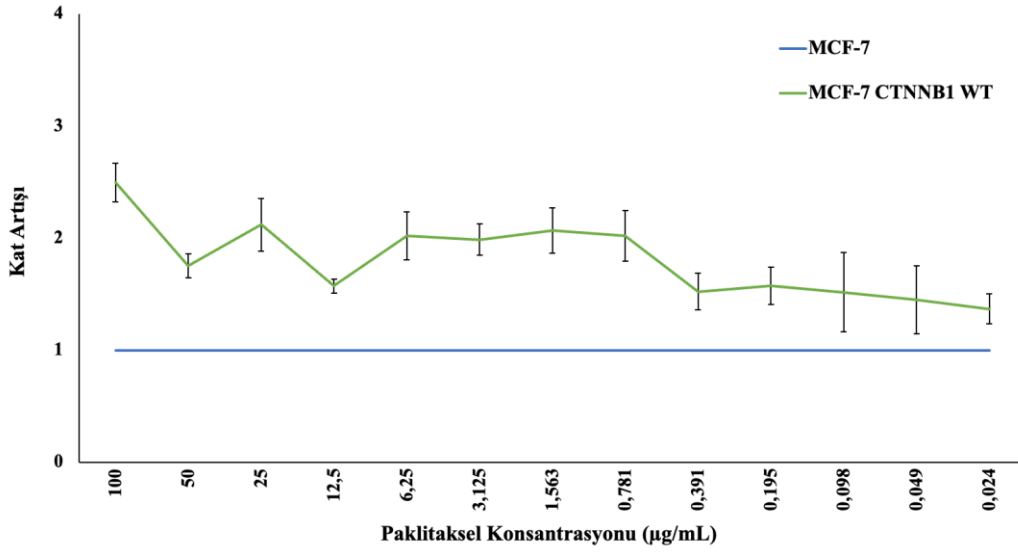
48. saatte, çalışılan 0,012-0,003 µg/mL doz aralığında, paklitakselin *CTNNB1* WT ve mutasyonları üzerinde herhangi bir hücre ölümüne neden olmadığı saptandı. Çalışılan 100-0,024 µg/mL doz aralığında ise, *CTNNB1* S45F ve T41A mutasyonlarını taşıyan hücrelerde paklitakselin hücre ölümü üzerine herhangi bir etkisi olmadığı, *CTNNB1* WT ve S33P mutasyonunu taşıyan hücrelerde ise hücre ölümüne neden olduğu gözlemlendi (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-48 saat (% İnhibisyon)			
	WT	S33P	S45F	T41A
100	24,76 ± 0,67	25,70 ± 1,47	-	-
50	24,03 ± 1,84	25,49 ± 0,40	-	-
25	17,81 ± 2,39	19,56 ± 1,29	-	-
12,5	12,08 ± 0,43	12,94 ± 0,60	-	-
6,25	7,43 ± 0,78	9,73 ± 2,63	-	-
3,125	6,98 ± 0,14	8,31 ± 2,83	-	-
1,563	6,24 ± 1,14	8,03 ± 1,07	-	-
0,781	8,53 ± 0,96	10,67 ± 3,44	-	-
0,391	11,39 ± 1,28	11,00 ± 3,12	-	-
0,195	8,58 ± 1,27	9,67 ± 4,37	-	-
0,098	7,65 ± 2,09	8,87 ± 0,27	-	-
0,049	8,83 ± 1,58	8,24 ± 1,08	-	-
0,024	9,11 ± 1,40	7,12 ± 0,89	-	-
0,012	-	-	-	-
0,006	-	-	-	-
0,003	-	-	-	-

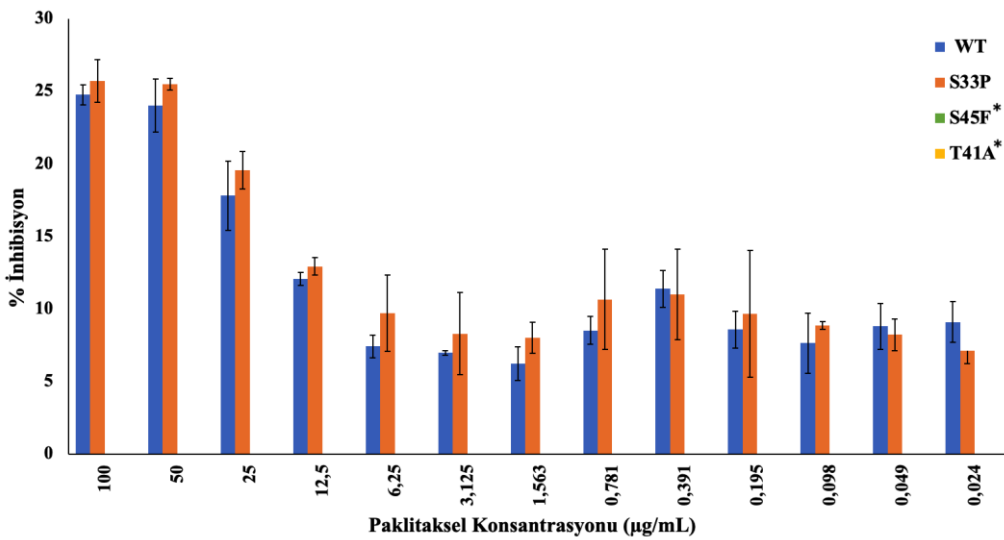
Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3). “-” hücre ölümünün olmadığını ifade etmektedir.

CTNNB1 WT ile transfekte MCF-7 hücreleri, transfekte edilmemiş MCF-7 hücreleri (“housekeeping” *CTNNB1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 48. saatte 100-0,024 µg/mL aralığındaki dozlarda, *CTNNB1* WT ile transfekte MCF-7 hücrelerinin hücre ölüm yüzdesinin, transfekte edilmemiş MCF-7 hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) derecede düşük olduğu görüldü. Bu sonuçlar, *CTNNB1* ifade edilişindeki artışın ilaç direnci ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. 48. saatteki, artmış *CTNNB1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-15’te gösterilmiştir.



Şekil 4-15: MCF-7 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 48. saatte, 100-0,024 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* WT ile S33P arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$), *CTNNB1* WT ile S45F ve *CTNNB1* WT ile T41A arasında ise istatistiksel olarak belirgin bir farklılık olduğu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4-16).



Şekil 4-16: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).

“*” Bu mutasyonlarda hücre ölümü (% inhibisyon) görülmedi.

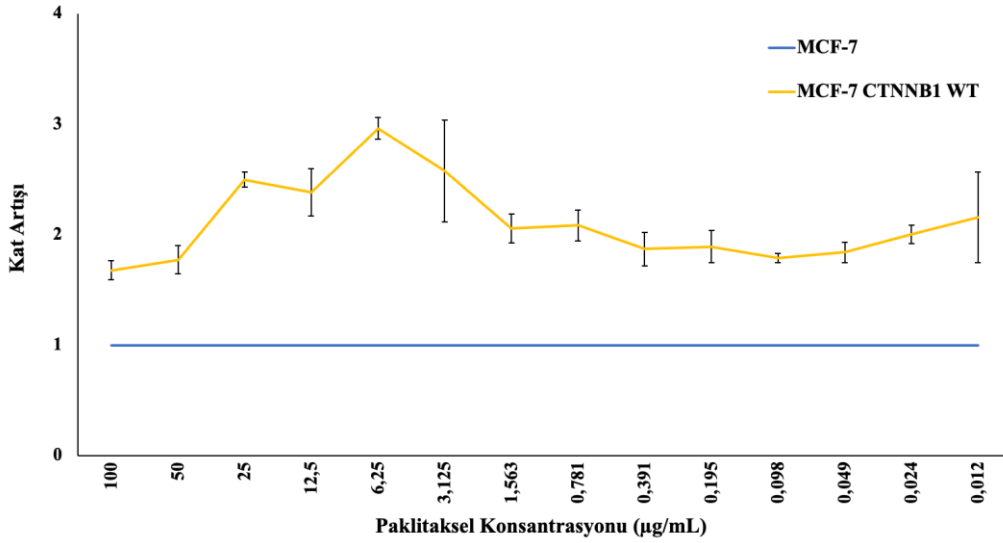
72. saatte çalışılan 0,006 ve 0,003 µg/mL doz aralığında, paklitakselin *CTNNB1* WT ve mutasyonları üzerinde herhangi bir hücre ölümüne neden olmadığı saptandı. Çalışılan 100-0,012 µg/mL doz aralığında ise, paklitakselin *CTNNB1* WT ve mutasyonlarında hücre ölümüne neden olduğu görüldü (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-72 saat (% İnhibisyon)			
	WT	S33P	S45F	T41A
100	56,45 ± 2,79	57,91 ± 1,77	20,93 ± 1,11	28,93 ± 3,10
50	49,68 ± 2,92	52,08 ± 1,93	22,15 ± 0,64	29,84 ± 1,68
25	29,29 ± 0,26	30,38 ± 1,63	22,15 ± 1,84	18,29 ± 0,84
12,5	20,17 ± 2,36	23,48 ± 1,84	10,54 ± 1,86	11,00 ± 1,00
6,25	18,17 ± 0,76	19,95 ± 1,77	11,27 ± 1,31	7,71 ± 1,46
3,125	22,69 ± 3,41	25,38 ± 0,24	10,14 ± 1,37	10,66 ± 1,52
1,563	29,16 ± 1,63	32,09 ± 1,08	9,08 ± 0,87	7,97 ± 1,13
0,781	30,08 ± 1,44	34,19 ± 2,06	13,33 ± 3,89	16,20 ± 2,68
0,391	32,50 ± 2,92	35,23 ± 2,29	18,06 ± 2,33	16,27 ± 1,61
0,195	31,92 ± 3,21	35,56 ± 1,93	16,11 ± 1,91	15,40 ± 2,81
0,098	34,01 ± 1,08	32,78 ± 2,21	15,63 ± 1,26	14,00 ± 3,31
0,049	32,24 ± 1,34	34,09 ± 0,80	16,80 ± 2,07	14,07 ± 3,64
0,024	30,17 ± 0,15	30,96 ± 1,06	17,73 ± 2,80	12,92 ± 1,96
0,012	19,18 ± 2,52	21,78 ± 1,16	13,21 ± 1,61	8,04 ± 2,08
0,006	-	-	-	-
0,003	-	-	-	-

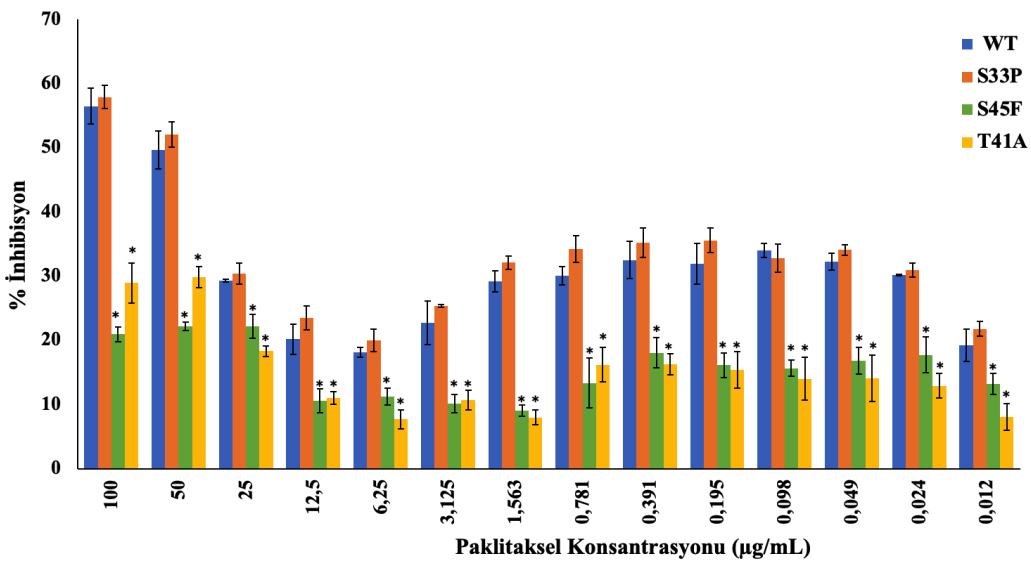
Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3). “-” hücre ölümünün olmadığını ifade etmektedir.

CTNNB1 WT ile transfekte MCF-7 hücreleri, transfekte edilmemiş MCF-7 hücreleri (“housekeeping” *CTNNB1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 72. saatte 100-0,012 µg/mL aralığındaki dozlarda, *CTNNB1* WT ile transfekte MCF-7 hücrelerinin hücre ölüm yüzdesinin, transfekte edilmemiş MCF-7 hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) derecede düşük olduğu görüldü. Bu sonuçlar, *CTNNB1* ifade edilişindeki artışın ilaç direnci ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. 72. saatteki, artmış *CTNNB1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-17’de gösterilmiştir.



Şekil 4-17: MCF-7 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 72. saatte, 100-0,012 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* WT ile S33P arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0,05$), *CTNNB1* WT ile S45F ve *CTNNB1* WT ile T41A arasında ise istatistiksel olarak belirgin bir farklılık olduğu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4-18).



Şekil 4-18: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MCF-7 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).

“*” WT ve mutasyonlar arasındaki istatistiksel anlamlılığı ($p<0,05$) ifade etmektedir.

Bu bulgular, çalışılan tüm saatlerde, *CTNNB1* S45F ve T41A mutasyonlarının *CTNNB1* WT'ye göre daha fazla, *CTNNB1* S33P mutasyonunun ise *CTNNB1* WT ile benzer derecede paklitaksel direncine neden olduğunu gösterdi.

4.6. MDA-MB-231 Hücrelerinde *AKT1* ve *CTNNB1* Mutasyonlarının İlaç Direncine Etkisi

4.6.1. MDA-MB-231 Hücrelerinde *AKT1* Mutasyonları ve Paklitaksel Direnci

AKT1 WT ve mutasyonlarını (E17K, E49K ve L52R) taşıyan MDA-MB-231 hücreleri, paklitaksel ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek hücre ölümleri MTS analizi ile belirlendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda, paklitakselin çalışılan tüm ilaç dozlarında (100-0,003 µg/mL), *AKT1* WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, hücre ölümü görüldü (Tablo 4-7).

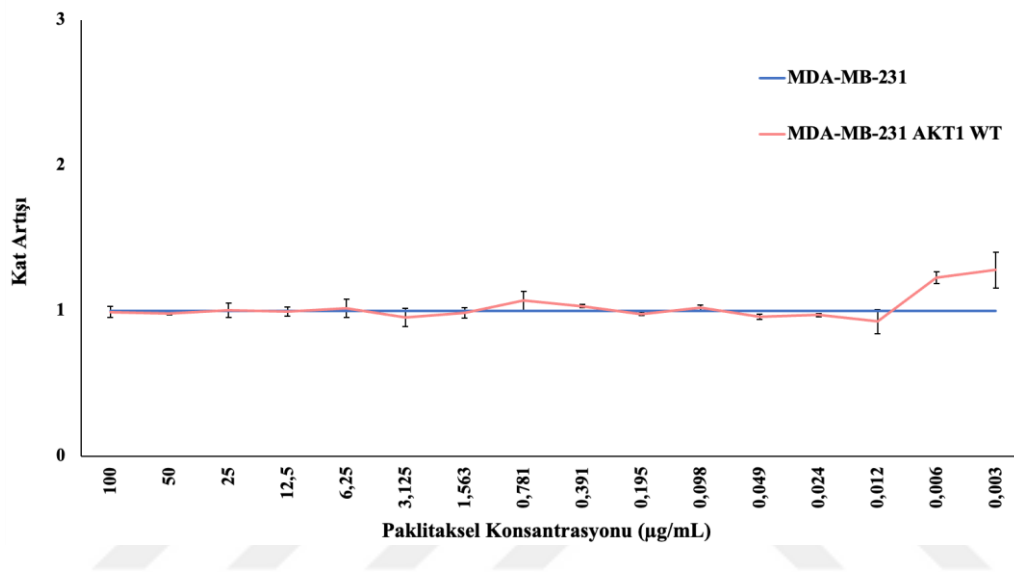
Tablo 4-7: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-24 saat (% İnhibisyon)			
	WT	E17K	E49K	L52R
100	50,50 ± 0,78	41,87 ± 1,19	39,03 ± 1,70	27,32 ± 1,01
50	49,30 ± 1,10	41,79 ± 0,48	41,23 ± 1,55	29,99 ± 0,28
25	45,98 ± 0,43	38,97 ± 0,55	40,58 ± 1,17	28,11 ± 1,93
12,5	46,30 ± 0,69	38,75 ± 1,52	40,04 ± 1,72	30,77 ± 1,50
6,25	39,43 ± 0,90	33,33 ± 2,43	34,37 ± 1,62	26,92 ± 2,62
3,125	38,40 ± 1,36	31,13 ± 1,30	32,42 ± 1,81	25,20 ± 2,76
1,563	38,62 ± 1,97	31,98 ± 2,20	31,76 ± 1,42	26,01 ± 1,30
0,781	36,44 ± 0,58	31,06 ± 0,46	33,01 ± 1,28	25,44 ± 1,37
0,391	40,68 ± 0,61	32,76 ± 1,37	33,80 ± 0,05	27,00 ± 1,00
0,195	37,79 ± 1,06	32,51 ± 1,11	32,73 ± 1,44	27,60 ± 1,12
0,098	37,16 ± 0,83	31,13 ± 0,96	31,43 ± 0,18	26,83 ± 0,49
0,049	36,06 ± 1,26	29,77 ± 0,74	29,96 ± 0,61	26,15 ± 1,78
0,024	30,87 ± 0,91	25,66 ± 0,68	26,89 ± 0,27	20,10 ± 1,54
0,012	27,58 ± 0,96	20,35 ± 0,76	20,53 ± 1,19	16,33 ± 2,11
0,006	21,72 ± 0,05	16,13 ± 1,72	15,86 ± 0,92	13,13 ± 1,02
0,003	18,97 ± 1,61	9,89 ± 0,19	12,09 ± 0,64	10,28 ± 0,39

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

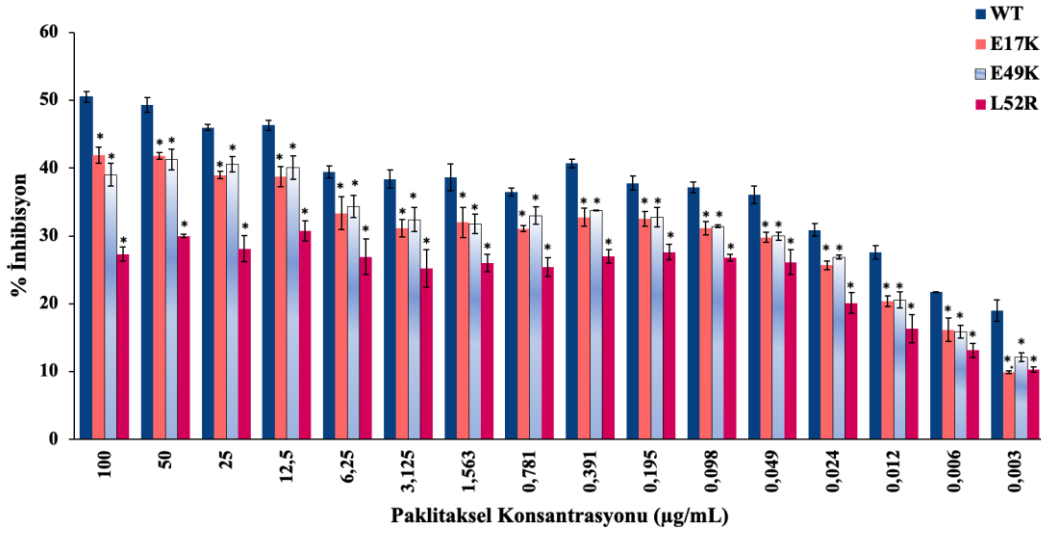
AKT1 WT ile transfekte MDA-MB-231 hücreleri, transfekte edilmemiş MDA-MB-231 hücreleri ("housekeeping" *AKT1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 24. saatte, 100-0,012 µg/mL doz aralığında, *AKT1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesinin, transfekte edilmemiş hücrelerininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir

şekilde farklı olmadığı ($p>0,05$) görüldü. 0,006 ve 0,003 $\mu\text{g/mL}$ dozlarında ise, istatistiksel bir anlamlılık saptandı ($p<0,05$). Bu sonuçlar, *AKT1* ifade edilişindeki artışı, 24. saatte, sadece 0,006 ve 0,003 $\mu\text{g/mL}$ dozlarında, ilaç direnci ile ilişkili olduğunu göstermektedir. 24. saatteki, artmış *AKT1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-19’da gösterilmiştir.



Şekil 4-19: MDA-MB-231 hücrelerinde *AKT1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).

AKT1 WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 24. saatte, 100-0,003 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında, *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde görülen hücre ölüm yüzdelerinin, *AKT1* WT ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinininkinden istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) derecede düşük olduğu saptandı (Şekil 4-20).



Şekil 4-20: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).

“*” WT ve mutasyonlar arasındaki istatistiksel anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

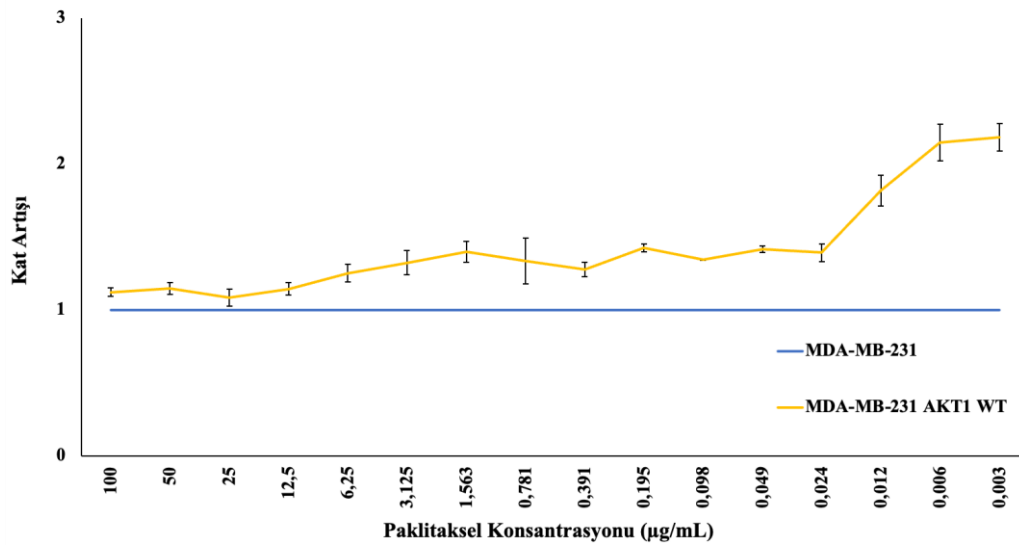
AKT1 WT ve mutasyonlarını taşıyan MDA-MB-231 hücrelerinin paklitaksel ile 48 saatlik inkübasyonları sonrasında, çalışılan tüm ilaç dozlarında hücre ölümü görüldü (Tablo 4-8).

Tablo 4-8: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-48 saat (% İnhibisyon)			
	WT	E17K	E49K	L52R
100	39,99 ± 1,99	27,22 ± 1,29	29,09 ± 2,18	17,5 ± 0,69
50	37,48 ± 0,44	29,31 ± 2,15	30,62 ± 1,46	19,04 ± 0,13
25	37,69 ± 0,96	26,14 ± 0,17	26,97 ± 0,50	18,72 ± 0,61
12,5	38,96 ± 1,17	31,56 ± 1,10	32,72 ± 0,71	24,33 ± 1,56
6,25	35,92 ± 0,46	30,86 ± 0,60	31,85 ± 0,85	24,36 ± 2,18
3,125	33,39 ± 1,51	24,93 ± 2,44	28,46 ± 0,51	20,91 ± 2,14
1,563	32,19 ± 1,40	23,99 ± 1,72	27,67 ± 1,29	21,15 ± 0,62
0,781	33,57 ± 1,17	25,31 ± 1,27	30,13 ± 1,17	21,00 ± 0,77
0,391	35,76 ± 1,29	27,46 ± 0,62	28,37 ± 1,99	22,44 ± 1,38
0,195	30,16 ± 1,51	24,38 ± 2,10	23,01 ± 2,08	17,15 ± 1,62
0,098	32,96 ± 0,09	24,79 ± 1,29	23,68 ± 1,21	17,52 ± 0,28
0,049	29,87 ± 0,72	21,87 ± 0,60	18,43 ± 0,76	18,23 ± 0,68
0,024	25,00 ± 1,92	16,30 ± 0,64	16,56 ± 1,58	14,25 ± 1,71
0,012	18,41 ± 0,76	11,86 ± 1,63	11,36 ± 0,94	9,49 ± 1,36
0,006	14,78 ± 0,87	9,25 ± 0,94	7,38 ± 1,01	8,66 ± 0,45
0,003	10,59 ± 1,51	6,18 ± 0,59	7,38 ± 0,67	6,44 ± 0,55

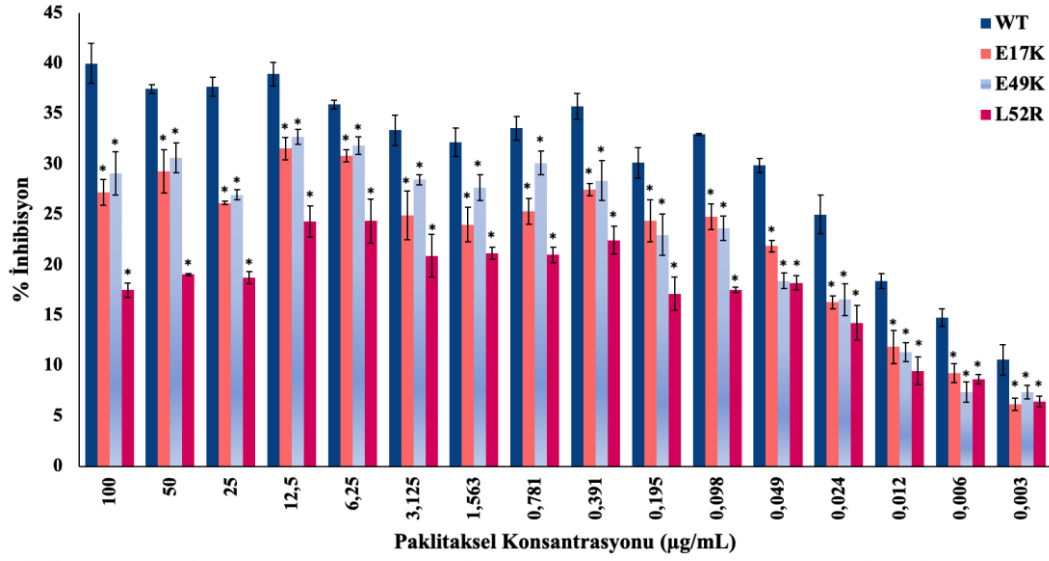
Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

AKT1 WT ile transfekte MDA-MB-231 hücreleri, transfekte edilmemiş MDA-MB-231 hücreleri (“housekeeping” *AKT1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 48. saatte 100-0,003 $\mu\text{g/mL}$ aralığındaki dozlarda, *AKT1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesinin, transfekte edilmemiş hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğu ($p<0,05$), bu farkın düşük dozlarda daha belirgin olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, *AKT1* ifade edilişindeki artışın, ilaç direnci ile ilişkili olduğunu göstermektedir. 48. saatteki, artmış *AKT1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-21’de gösterilmiştir.



Şekil 4-21: MDA-MB-231 hücrelerinde *AKT1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).

AKT1 WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 48. saatte, 100-0,003 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında, *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde görülen hücre ölüm yüzdelерinin, *AKT1* WT ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinininkinden istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) derecede düşük olduğu saptandı (Şekil 4-22).



Şekil 4-22: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).

“*” WT ve mutasyonlar arasındaki istatistiksel anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

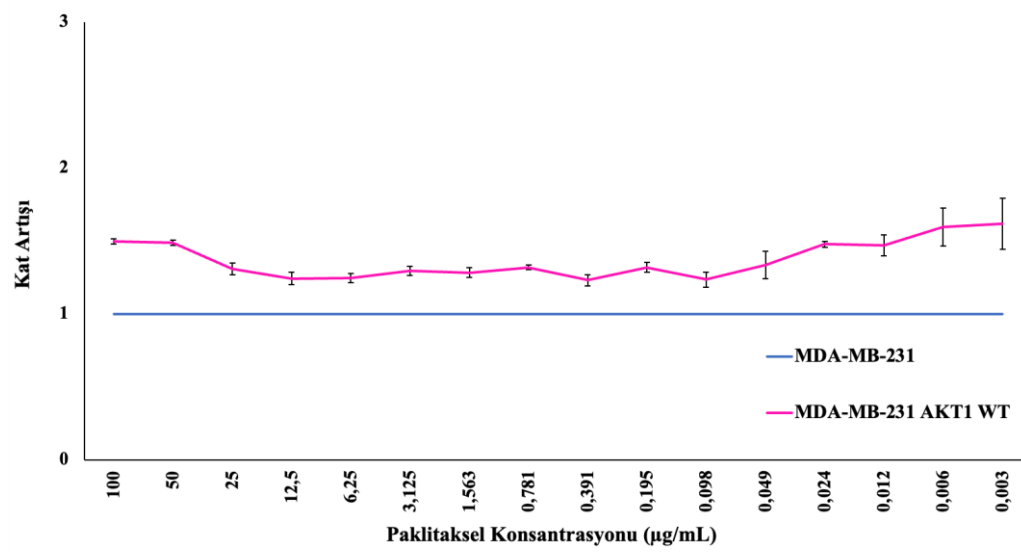
AKT1 WT ve mutasyonlarını taşıyan MDA-MB-231 hücrelerinin paklitaksel ile 72 saatlik inkübasyonları sonrasında, çalışılan tüm ilaç dozlarında hücre ölümü görüldü (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-72 saat (% İnhibisyon)			
	WT	E17K	E49K	L52R
100	35,78 ± 0,73	33,28 ± 0,13	32,09 ± 1,02	23,36 ± 0,49
50	36,07 ± 0,56	33,04 ± 0,54	29,40 ± 1,15	21,47 ± 1,23
25	33,94 ± 1,06	28,64 ± 0,97	25,36 ± 1,63	21,43 ± 1,07
12,5	41,38 ± 0,83	37,14 ± 1,25	35,63 ± 1,03	28,22 ± 0,22
6,25	42,51 ± 1,20	38,03 ± 0,19	36,32 ± 1,30	26,93 ± 1,23
3,125	39,33 ± 0,93	36,21 ± 0,85	33,70 ± 1,37	24,67 ± 1,03
1,563	38,96 ± 0,53	35,39 ± 1,12	30,48 ± 1,65	23,85 ± 0,86
0,781	39,19 ± 0,15	36,56 ± 0,37	36,37 ± 0,44	25,04 ± 0,56
0,391	41,94 ± 1,45	38,06 ± 1,13	34,37 ± 0,19	28,94 ± 1,36
0,195	39,23 ± 1,26	35,56 ± 0,89	31,93 ± 0,32	25,34 ± 1,28
0,098	40,61 ± 1,26	33,32 ± 0,50	30,59 ± 0,28	24,27 ± 0,58
0,049	37,32 ± 1,49	32,32 ± 2,13	29,48 ± 2,20	24,43 ± 1,04
0,024	30,91 ± 0,26	28,59 ± 0,51	23,88 ± 1,24	21,56 ± 1,13
0,012	26,47 ± 1,08	22,62 ± 1,51	20,71 ± 0,76	18,80 ± 0,92
0,006	23,78 ± 1,67	22,02 ± 0,84	18,73 ± 1,58	16,13 ± 0,19
0,003	21,72 ± 1,21	21,65 ± 1,18	20,48 ± 1,07	17,33 ± 0,60

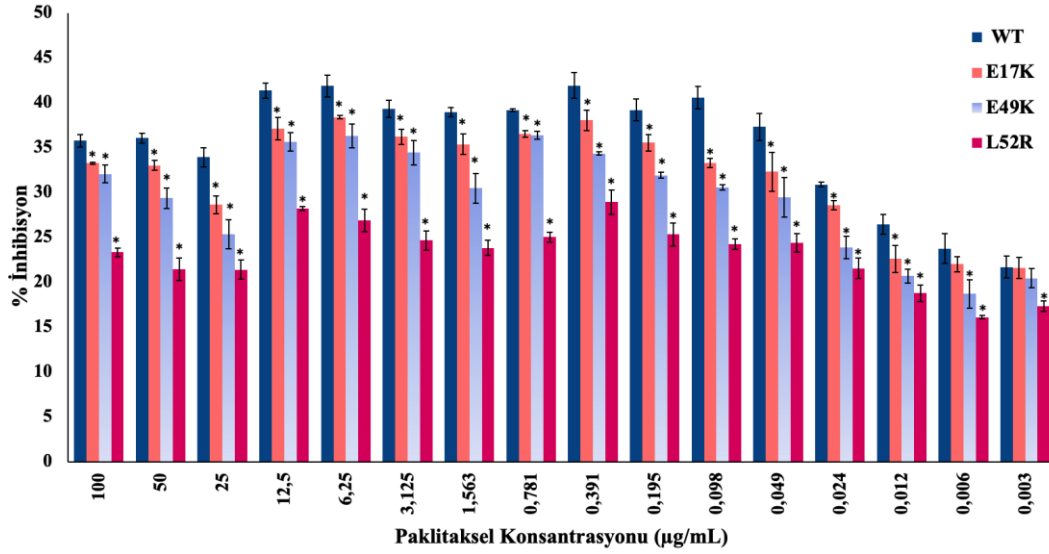
Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

AKT1 WT ile transfekte MDA-MB-231 hücreleri, transfekte edilmemiş MDA-MB-231 hücreleri (“housekeeping” *AKT1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 72. saatte 100-0,003 µg/mL aralığındaki dozlarda, *AKT1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesinin, transfekte edilmemiş hücrelerininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğu ($p<0,05$) gözlemlendi. Bu sonuçlar, *AKT1* ifade edilişindeki artışın, ilaç direnci ile ilişkili olduğunu göstermektedir. 72. saatteki, artmış *AKT1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-23’de gösterilmiştir.



Şekil 4-23: MDA-MB-231 hücrelerinde *AKT1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).

AKT1 WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 72. saatte, çalışılan tüm ilaç dozlarında, *AKT1* L52R mutasyonunu taşıyan MDA-MB-231 hücrelerinde görülen hücre ölüm yüzdelерinin, *AKT1* WT taşıyan MDA-MB-231 hücrelerininkinden istatistiksel olarak anlamlı derece ($p<0,05$) düşük olduğu saptandı. Ayrıca, 0,003 µg/mL dışındaki tüm ilaç dozlarında E49K mutasyonunu taşıyan, 0,006 ve 0,003 µg/mL dışındaki ilaç dozlarında ise, E17K mutasyonunu taşıyan MDA-MB-231 hücrelerinin hücre ölüm yüzdeleri, *AKT1* WT’ninkilerden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4-24).



Şekil 4-24: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).

“*” WT ve mutasyonlar arasındaki istatistiksel anlamlılığı ($p < 0,05$) ifade etmektedir.

Bu sonuçlar, çalışılan tüm saatlerde, *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonlarının *AKT1* WT’ye göre daha fazla paklitaksel direncine neden olduğunu gösterdi.

4.6.2. MDA-MB-231 Hücrelerinde *CTNNB1* Mutasyonları ve Paklitaksel Direnci

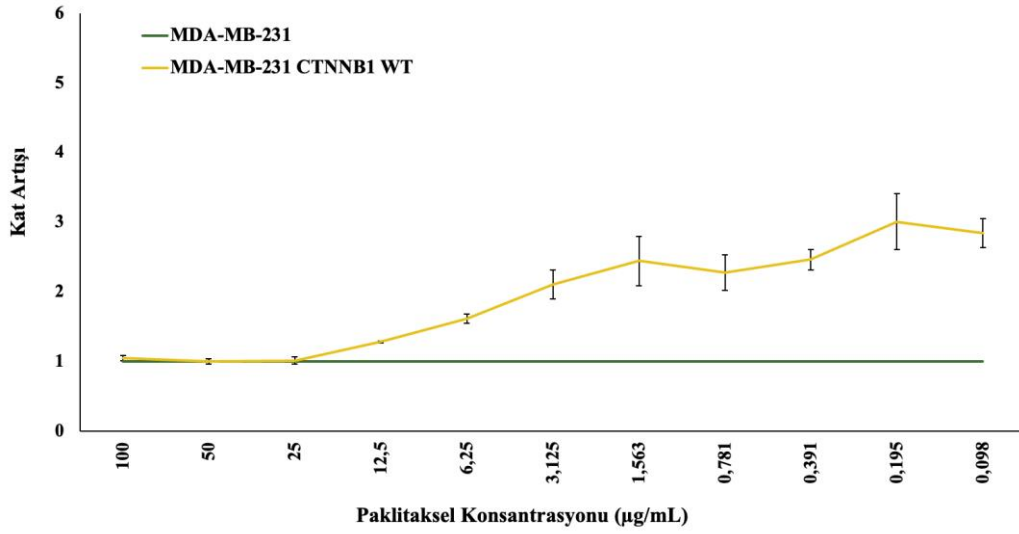
CTNNB1 WT ve mutasyonlarını (S33P, S45F ve T41A) taşıyan MDA-MB-231 hücreleri, paklitaksel ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek hücre ölümleri MTS analizi ile belirlendi. 24 saatlik inkübasyon sonunda, paklitakselin 100-0,098 µg/mL aralığındaki dozlarında, *CTNNB1* WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, hücre ölümü görüldü (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat)

Paklitaksel ($\mu\text{g/mL}$)	Hücre Ölümü-24 saat (% İnhibisyon)			
	WT	S33P	S45F	T41A
100	44,77 $\pm$ 1,57	43,00 $\pm$ 2,65	41,54 $\pm$ 2,14	45,8 $\pm$ 0,76
50	45,07 $\pm$ 1,01	41,80 $\pm$ 1,93	42,33 $\pm$ 1,71	44,75 $\pm$ 1,33
25	42,94 $\pm$ 2,69	40,62 $\pm$ 1,20	39,72 $\pm$ 1,38	39,82 $\pm$ 1,42
12,5	34,67 $\pm$ 0,37	34,51 $\pm$ 0,90	33,57 $\pm$ 1,03	33,08 $\pm$ 0,99
6,25	24,31 $\pm$ 0,86	26,00 $\pm$ 2,06	25,48 $\pm$ 0,75	24,99 $\pm$ 2,85
3,125	16,63 $\pm$ 1,58	19,08 $\pm$ 1,57	18,59 $\pm$ 0,88	19,17 $\pm$ 0,93
1,563	13,77 $\pm$ 1,47	15,37 $\pm$ 1,45	16,57 $\pm$ 1,87	14,36 $\pm$ 2,72
0,781	14,46 $\pm$ 1,12	15,37 $\pm$ 2,54	15,41 $\pm$ 1,50	15,31 $\pm$ 0,86
0,391	15,17 $\pm$ 0,11	13,82 $\pm$ 1,43	15,06 $\pm$ 2,53	15,82 $\pm$ 0,71
0,195	10,72 $\pm$ 1,97	13,64 $\pm$ 0,53	10,23 $\pm$ 2,66	11,32 $\pm$ 1,21
0,098	11,35 $\pm$ 0,79	9,65 $\pm$ 2,04	10,71 $\pm$ 1,01	8,57 $\pm$ 3,44
0,049	-	-	-	-
0,024	-	-	-	-
0,012	-	-	-	-
0,006	-	-	-	-
0,003	-	-	-	-

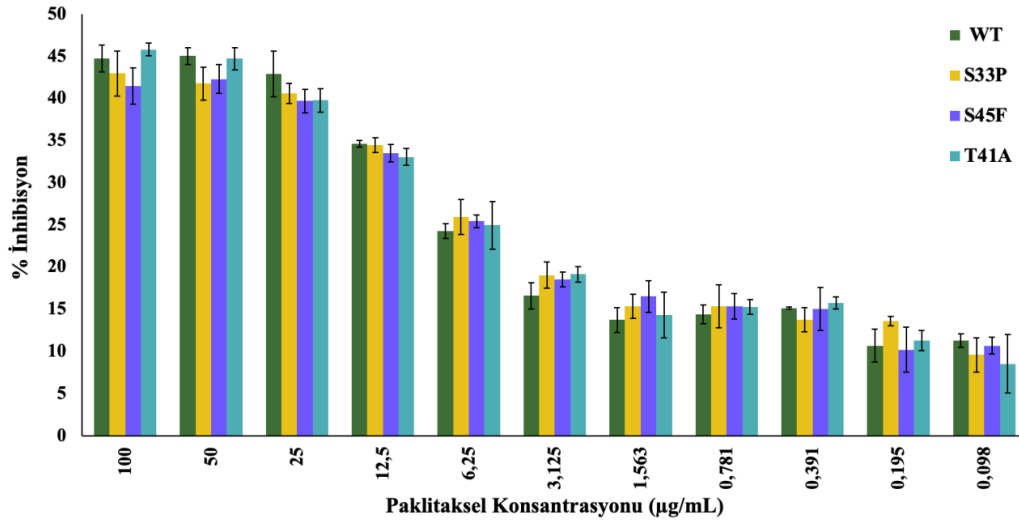
Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3). “-” hücre ölümünün olmadığını ifade etmektedir.

CTNNB1 WT ile transfekte MDA-MB-231 hücreleri, transfekte edilmemiş MDA-MB-231 hücreleri (“housekeeping” *CTNNB1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 24. saatte 12,5-0,098 $\mu\text{g/mL}$ aralığındaki dozlarda, *CTNNB1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesinin, transfekte edilmemiş hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğu ($p < 0,05$), diğer dozlarda (100-25 $\mu\text{g/mL}$) ise herhangi bir farklılık olmadığı ($p > 0,05$) gözlemlendi. Bu sonuçlar, *CTNNB1* ifade edilişindeki artışın, ilaç direnci ile ilişkili olduğunu göstermektedir. 24. saatteki, artmış *CTNNB1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-25’te gösterilmiştir.



Şekil 4-25: MDA-MB-231 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını taşıyan MDA-MB-231 hücrelerinde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 24. saatte, 100-0,098 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* mutasyonları ile *CTNNB1* WT arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-26).



Şekil 4-26: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).

48. saatte, çalışılan 100-0,012 µg/mL doz aralığında, paklitakselin *CTNNB1* WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, hücre ölümüne neden olduğu görüldü. Son iki ilaç

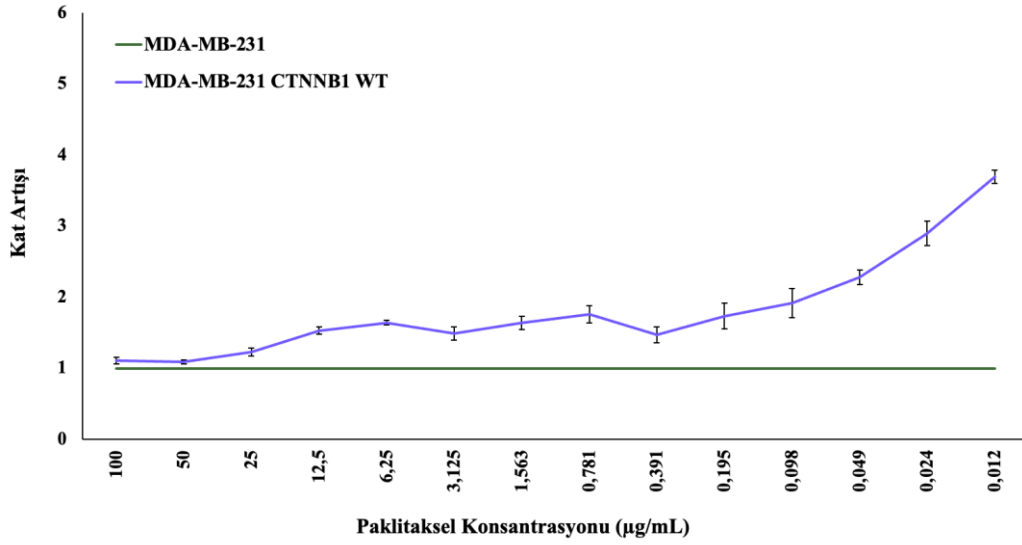
dozunda ise, *CTNNB1* WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, herhangi bir hücre ölümü görülmedi (Tablo 4-11).

Tablo 4-11: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-48 saat (% İnhibisyon)			
	WT	S33P	S45F	T41A
100	46,50 ± 1,56	44,53 ± 2,33	46,06 ± 2,16	45,93 ± 1,19
50	49,28 ± 1,28	47,30 ± 2,23	46,12 ± 2,31	46,90 ± 3,06
25	41,68 ± 1,76	40,59 ± 0,27	38,86 ± 2,21	39,10 ± 2,47
12,5	36,15 ± 1,68	34,39 ± 1,28	32,67 ± 2,02	32,23 ± 2,55
6,25	31,53 ± 1,23	30,71 ± 2,19	31,61 ± 0,59	29,33 ± 1,01
3,125	31,31 ± 1,75	28,92 ± 1,01	29,81 ± 0,92	29,08 ± 0,89
1,563	27,28 ± 1,38	25,66 ± 2,03	26,34 ± 0,92	24,37 ± 2,47
0,781	26,55 ± 0,52	25,50 ± 1,06	27,37 ± 0,97	26,29 ± 1,62
0,391	30,98 ± 1,83	28,98 ± 1,00	30,58 ± 3,35	29,50 ± 1,50
0,195	26,89 ± 3,47	23,38 ± 2,97	23,84 ± 2,73	22,56 ± 3,03
0,098	23,14 ± 3,21	20,14 ± 1,80	24,16 ± 1,54	20,17 ± 1,85
0,049	19,30 ± 0,60	17,46 ± 0,25	20,66 ± 1,10	16,57 ± 2,26
0,024	15,29 ± 2,16	12,84 ± 0,82	15,24 ± 1,06	13,94 ± 3,10
0,012	12,08 ± 1,73	10,31 ± 0,88	11,94 ± 1,95	9,33 ± 1,53
0,006	-	-	-	-
0,003	-	-	-	-

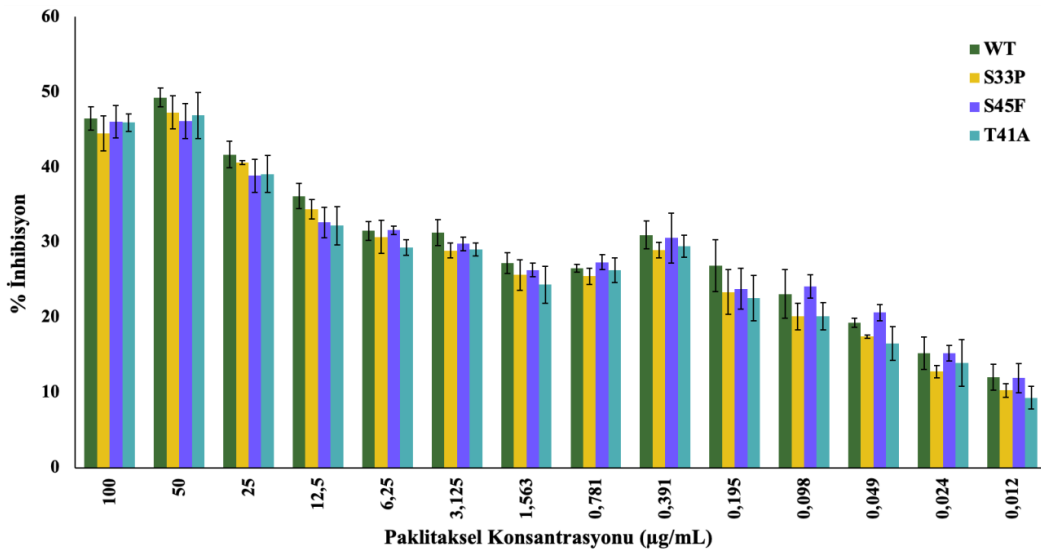
Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3). “-” hücre ölümünün olmadığını ifade etmektedir.

CTNNB1 WT ile transfekte MDA-MB-231 hücreleri, transfekte edilmemiş MDA-MB-231 hücreleri (“housekeeping” *CTNNB1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 48. saatte çalışılan 100-0,012 µg/mL dozlarında, *CTNNB1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesinin, transfekte edilmemiş hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğu ($p < 0,05$) gözlemlendi. Bu sonuçlar, *CTNNB1* ifade edilişindeki artışın, ilaç direnci ile ilişkili olduğunu göstermektedir. 48. saatteki, artmış *CTNNB1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-27’de gösterilmiştir.



Şekil 4-27: MDA-MB-231 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını taşıyan MDA-MB-231 hücrelerinde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 48. saatte, 100-0,012 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* mutasyonları ile *CTNNB1* WT arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-28).



Şekil 4-28: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).

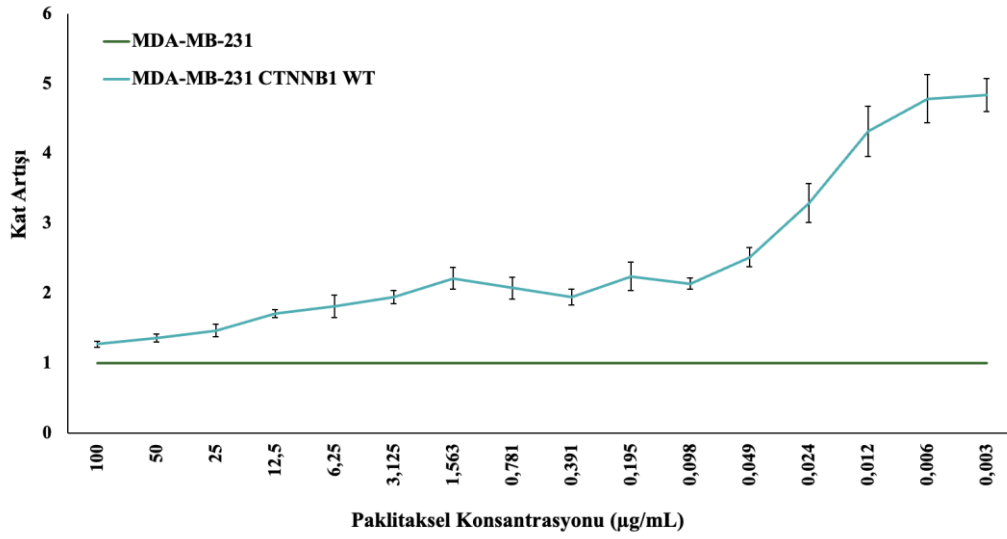
72. saatte, çalışılan 100-0,003 µg/mL doz aralığında, paklitakselin *CTNNB1* WT ve mutasyonlarını taşıyan hücrelerde, hücre ölümüne neden olduğu görüldü (Tablo 4-12).

Tablo 4-12: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-72 saat (% İnhibisyon)			
	WT	S33P	S45F	T41A
100	48,20 ± 1,71	48,16 ± 1,76	49,44 ± 0,51	49,00 ± 1,78
50	47,25 ± 0,68	46,39 ± 0,54	48,09 ± 1,14	48,24 ± 1,41
25	40,91 ± 2,50	39,91 ± 1,81	40,01 ± 1,44	38,56 ± 2,50
12,5	35,90 ± 1,58	36,88 ± 1,06	36,75 ± 0,82	33,41 ± 1,96
6,25	33,77 ± 2,73	36,15 ± 1,28	35,84 ± 1,01	32,83 ± 2,47
3,125	30,27 ± 0,98	31,47 ± 1,96	32,18 ± 1,96	30,39 ± 0,59
1,563	26,47 ± 1,60	28,35 ± 0,43	28,67 ± 2,08	26,57 ± 1,44
0,781	27,65 ± 1,84	31,20 ± 2,16	31,13 ± 1,03	29,07 ± 0,47
0,391	29,26 ± 1,75	29,82 ± 1,35	31,00 ± 1,00	31,09 ± 1,89
0,195	25,47 ± 2,43	25,69 ± 1,96	28,00 ± 2,00	27,83 ± 2,75
0,098	26,18 ± 0,80	26,96 ± 1,87	29,24 ± 2,13	27,74 ± 1,38
0,049	22,63 ± 1,33	24,80 ± 1,22	25,56 ± 1,91	25,58 ± 0,49
0,024	17,47 ± 1,36	20,47 ± 1,90	20,54 ± 1,86	19,94 ± 1,73
0,012	11,15 ± 2,88	13,47 ± 1,54	13,38 ± 2,38	14,69 ± 1,62
0,006	11,33 ± 1,53	11,92 ± 1,43	12,67 ± 1,15	11,76 ± 1,03
0,003	9,67 ± 0,58	11,11 ± 1,15	11,74 ± 2,21	11,52 ± 1,78

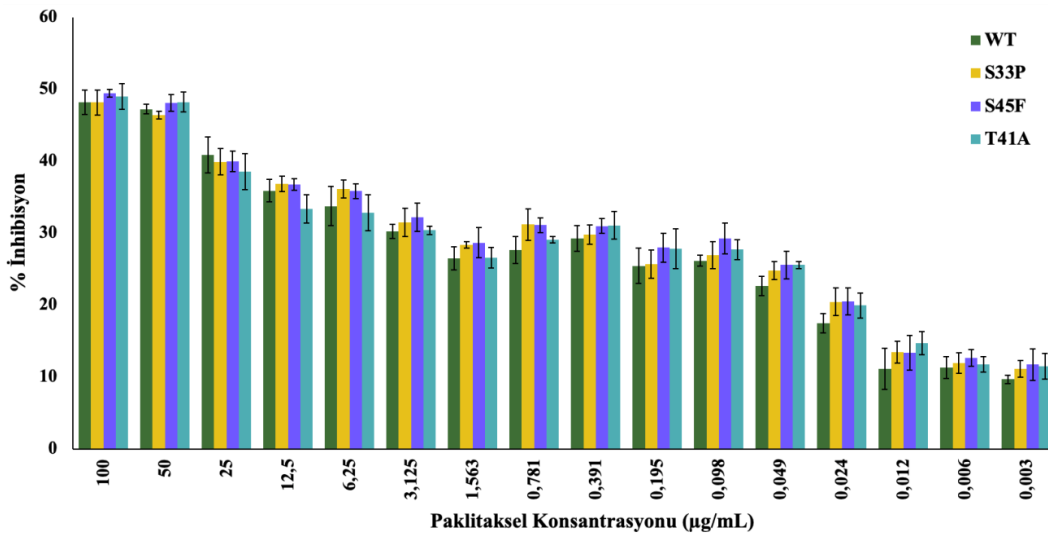
Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

CTNNB1 WT ile transfekte MDA-MB-231 hücreleri, transfekte edilmemiş MDA-MB-231 hücreleri (“housekeeping” *CTNNB1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 72. saatte çalışılan tüm ilaç dozlarında, *CTNNB1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesinin, transfekte edilmemiş hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı olduğu ($p < 0,05$) gözlemlendi. Bu sonuçlar, *CTNNB1* ifade edilişindeki artışın, ilaç direnci ile ilişkili olduğunu göstermektedir. 72. saatteki, artmış *CTNNB1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-29’da gösterilmiştir.



Şekil 4-29: MDA-MB-231 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını taşıyan MDA-MB-231 hücrelerinde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 72. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* mutasyonları ile *CTNNB1* WT arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-30).



Şekil 4-30: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte MDA-MB-231 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).

Bu sonuçlar, çalışılan tüm saatlerde ve ilaç dozlarında, *CTNNB1* S33P, S45F ve T41A mutasyonlarının *CTNNB1* WT'ye göre paklitaksel direncine neden olmadığını gösterdi.

4.7. SKOV-3 Hücrelerinde *AKT1* ve *CTNNB1* Mutasyonlarının İlaç Direncine Etkisi

4.7.1. SKOV-3 Hücrelerinde *AKT1* Mutasyonları ve İlaç Direnci

AKT1 WT ve mutasyonlarını (E17K, E49K ve L52R) taşıyan SKOV-3 hücreleri, paklitaksel ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek hücre ölümleri MTS analizi ile belirlendi. 24. saatte, çalışılan tüm ilaç dozlarında (100-0,003 $\mu\text{g/mL}$), paklitakselin *AKT1* WT ve mutasyonlarını taşıyan SKOV-3 hücrelerinde, hücre ölümüne neden olduğu görüldü (Tablo 4-13).

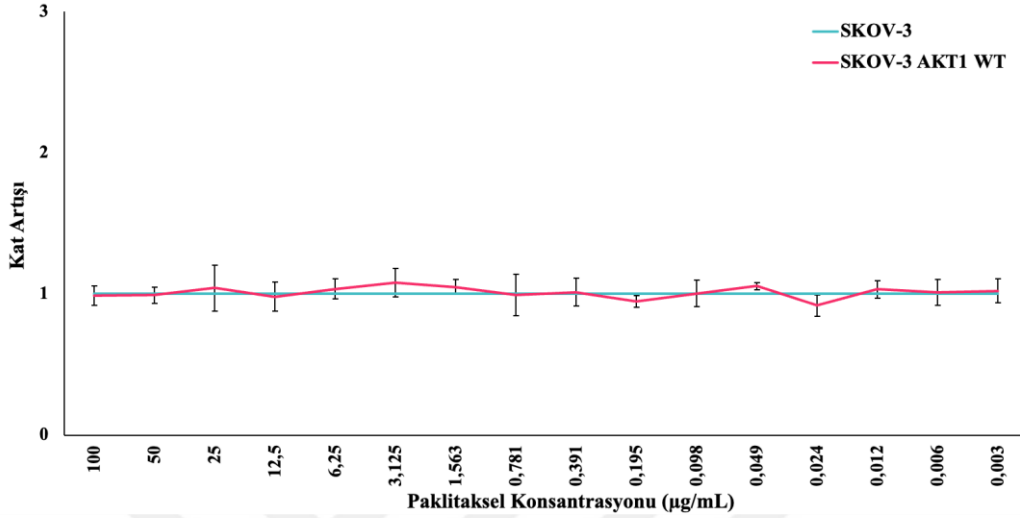
Tablo 4-13: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat)

Paklitaksel ($\mu\text{g/mL}$)	Hücre Ölümü-24 saat (% İnhibisyon)			
	WT	E17K	E49K	L52R
100	31,55 $\pm$ 1,37	33,32 $\pm$ 0,71	30,23 $\pm$ 2,45	31,40 $\pm$ 1,77
50	24,15 $\pm$ 0,92	22,03 $\pm$ 2,07	24,18 $\pm$ 0,48	25,35 $\pm$ 1,41
25	20,25 $\pm$ 1,38	19,30 $\pm$ 1,12	20,02 $\pm$ 1,34	21,72 $\pm$ 1,63
12,5	19,85 $\pm$ 2,11	19,31 $\pm$ 0,96	19,09 $\pm$ 1,05	20,14 $\pm$ 2,10
6,25	18,41 $\pm$ 1,22	18,21 $\pm$ 1,34	19,16 $\pm$ 1,59	19,81 $\pm$ 1,95
3,125	20,47 $\pm$ 1,47	18,99 $\pm$ 1,49	20,19 $\pm$ 1,43	18,60 $\pm$ 0,60
1,563	21,27 $\pm$ 1,98	23,00 $\pm$ 1,14	22,00 $\pm$ 1,84	21,92 $\pm$ 1,38
0,781	22,29 $\pm$ 2,46	22,10 $\pm$ 1,74	21,86 $\pm$ 1,07	22,62 $\pm$ 2,54
0,391	24,68 $\pm$ 1,51	23,05 $\pm$ 1,40	23,51 $\pm$ 0,74	22,89 $\pm$ 1,02
0,195	23,46 $\pm$ 0,79	20,82 $\pm$ 1,61	22,49 $\pm$ 1,49	22,66 $\pm$ 1,12
0,098	22,27 $\pm$ 0,68	21,45 $\pm$ 2,18	22,33 $\pm$ 1,01	21,10 $\pm$ 1,22
0,049	21,82 $\pm$ 1,86	21,82 $\pm$ 1,90	21,61 $\pm$ 0,47	21,57 $\pm$ 1,52
0,024	20,39 $\pm$ 1,45	18,35 $\pm$ 0,83	18,77 $\pm$ 2,09	21,13 $\pm$ 1,53
0,012	19,21 $\pm$ 0,88	19,91 $\pm$ 1,25	17,41 $\pm$ 0,85	19,37 $\pm$ 0,71
0,006	15,97 $\pm$ 1,46	17,23 $\pm$ 0,67	18,13 $\pm$ 1,39	16,65 $\pm$ 1,75
0,003	13,34 $\pm$ 0,80	11,37 $\pm$ 1,58	13,72 $\pm$ 1,52	12,27 $\pm$ 1,91

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

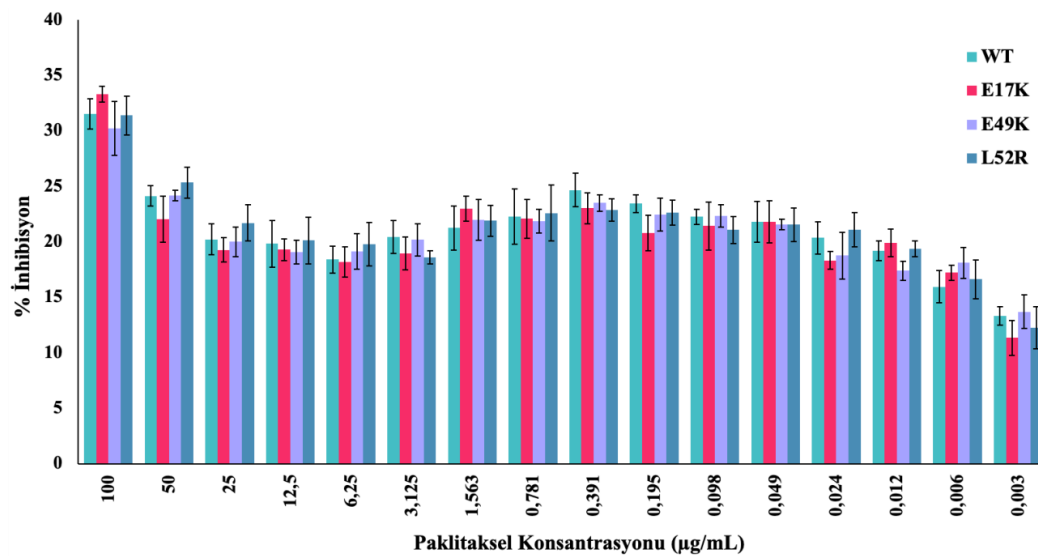
AKT1 WT ile transfekte SKOV-3 hücreleri, transfekte edilmemiş SKOV-3 hücreleri ("housekeeping" *AKT1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 24. saatte, 100-0,003 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında, *AKT1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesi, transfekte edilmemiş hücrelerininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0,05$). Bu sonuçlar, *AKT1* ifade edilişindeki artışın, 24. saatte, ilaç

direnci ile ilişkili olmadığını göstermektedir. 24. saatteki, artmış *AKT1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-31’de gösterilmiştir.



Şekil 4-31: SKOV-3 hücrelerinde *AKT1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).

AKT1 WT ve mutasyonlarını taşıyan SKOV-3 hücrelerinde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 24. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *AKT1* WT ve mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-32).



Şekil 4-32: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).

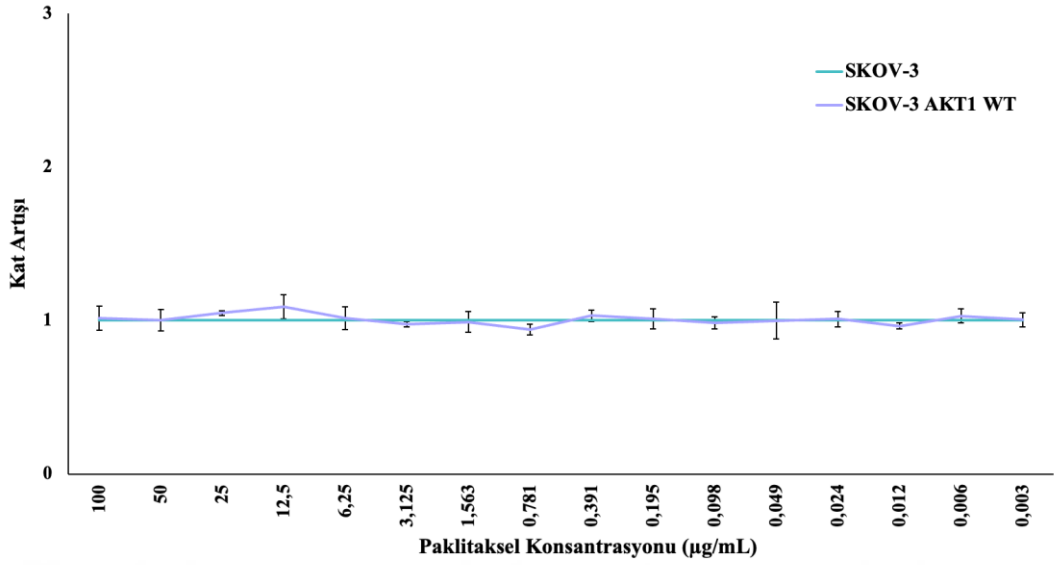
48. saatte, çalışılan tüm ilaç dozlarında (100-0,003 $\mu\text{g/mL}$), paklitakselin *AKT1* WT ve mutasyonlarını taşıyan SKOV-3 hücrelerinde, hücre ölümüne neden olduğu görüldü (Tablo 4-14).

Tablo 4-14: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat)

Paklitaksel ($\mu\text{g/mL}$)	Hücre Ölümü-48 saat (% İnhibisyon)			
	WT	E17K	E49K	L52R
100	49,53 $\pm$ 2,37	52,23 $\pm$ 2,46	48,38 $\pm$ 1,63	49,48 $\pm$ 2,45
50	36,64 $\pm$ 1,59	37,11 $\pm$ 2,02	35,11 $\pm$ 2,16	37,30 $\pm$ 1,38
25	29,39 $\pm$ 2,16	30,46 $\pm$ 0,73	30,17 $\pm$ 1,51	28,95 $\pm$ 1,81
12,5	25,02 $\pm$ 1,03	24,40 $\pm$ 2,40	26,55 $\pm$ 2,22	23,90 $\pm$ 1,45
6,25	29,35 $\pm$ 0,85	27,61 $\pm$ 1,86	28,47 $\pm$ 0,95	29,14 $\pm$ 1,30
3,125	29,02 $\pm$ 2,32	28,92 $\pm$ 1,84	28,15 $\pm$ 1,52	27,91 $\pm$ 1,35
1,563	30,62 $\pm$ 0,98	33,32 $\pm$ 0,58	31,91 $\pm$ 2,50	32,83 $\pm$ 2,29
0,781	34,35 $\pm$ 2,00	35,27 $\pm$ 1,40	31,61 $\pm$ 2,37	36,00 $\pm$ 1,27
0,391	36,65 $\pm$ 0,87	36,66 $\pm$ 1,06	38,14 $\pm$ 1,11	37,44 $\pm$ 3,56
0,195	36,07 $\pm$ 1,16	34,78 $\pm$ 1,35	35,78 $\pm$ 1,30	35,39 $\pm$ 1,15
0,098	34,05 $\pm$ 1,07	32,31 $\pm$ 0,92	33,42 $\pm$ 1,37	33,37 $\pm$ 2,14
0,049	31,08 $\pm$ 1,62	30,07 $\pm$ 1,41	32,40 $\pm$ 2,07	30,76 $\pm$ 1,69
0,024	30,86 $\pm$ 2,41	31,55 $\pm$ 0,83	31,64 $\pm$ 1,61	29,60 $\pm$ 1,02
0,012	29,91 $\pm$ 1,10	30,27 $\pm$ 1,23	31,41 $\pm$ 2,55	29,80 $\pm$ 0,58
0,006	23,66 $\pm$ 1,50	22,38 $\pm$ 2,34	24,43 $\pm$ 1,33	25,97 $\pm$ 2,57
0,003	21,58 $\pm$ 1,15	19,93 $\pm$ 1,26	19,44 $\pm$ 1,19	20,95 $\pm$ 1,83

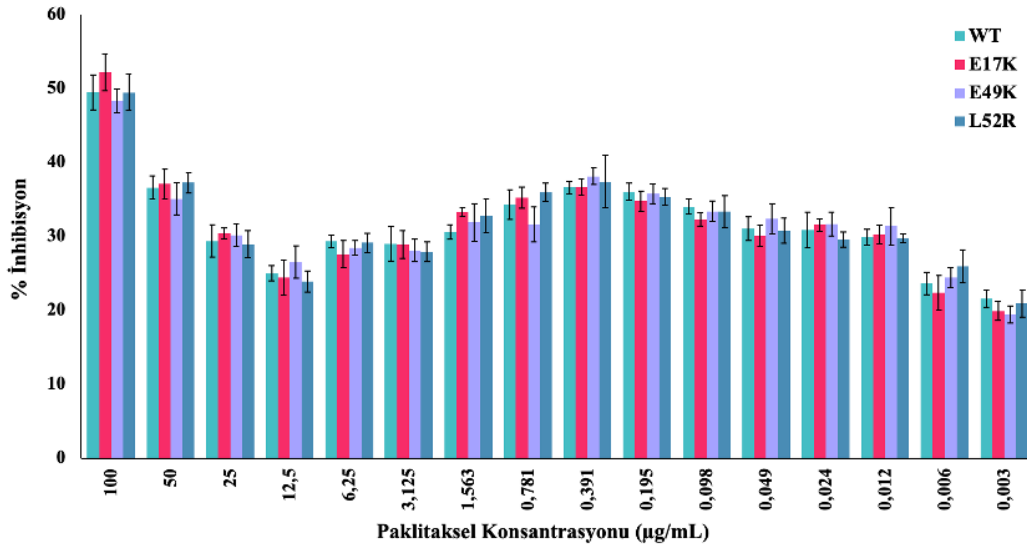
Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

AKT1 WT ile transfekte SKOV-3 hücreleri, transfekte edilmemiş SKOV-3 hücreleri (“housekeeping” *AKT1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 48. saatte, 100-0,003 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında, *AKT1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesi, transfekte edilmemiş hücrelerininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0,05$). Bu sonuçlar, *AKT1* ifade edilişindeki artışın, 48. saatte, ilaç direnci ile ilişkili olmadığını göstermektedir. 48. saatteki, artmış *AKT1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-33’de gösterilmiştir.



Şekil 4-33: SKOV-3 hücrelerinde *AKT1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).

AKT1 WT ve mutasyonlarını taşıyan SKOV-3 hücrelerinde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 48. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *AKT1* WT ve mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-34).



Şekil 4-34: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).

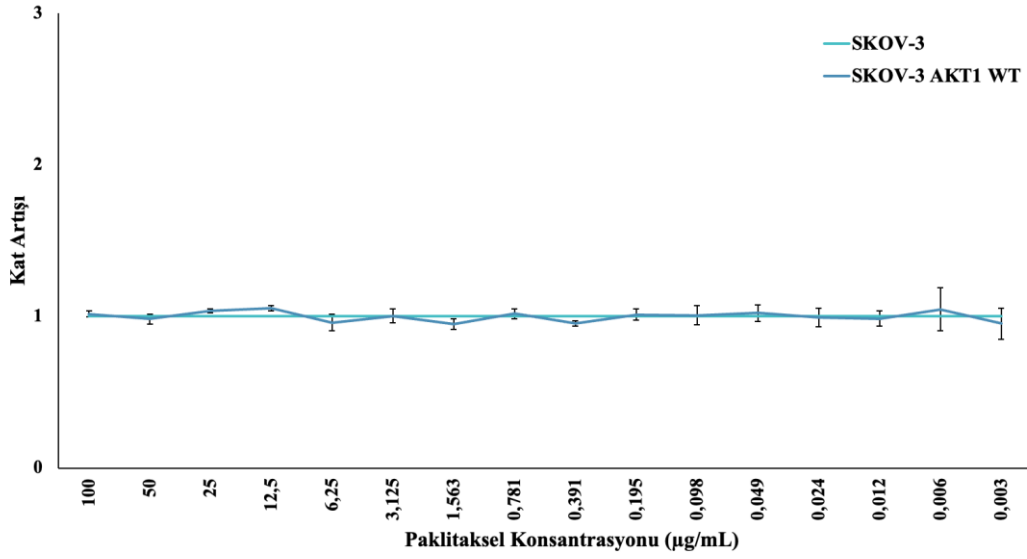
72. saatte, çalışılan tüm ilaç dozlarında (100-0,003 µg/mL), paklitakselin *AKT1* WT ve mutasyonlarını taşıyan SKOV-3 hücrelerinde, hücre ölümüne neden olduğu görüldü (Tablo 4-15).

Tablo 4-15: *AKT1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-72 saat (% İnhibisyon)			
	WT	E17K	E49K	L52R
100	53,65 ± 1,27	54,85 ± 1,34	55,87 ± 1,03	55,47 ± 1,47
50	38,14 ± 1,03	37,38 ± 1,63	38,40 ± 1,44	37,96 ± 0,57
25	32,52 ± 1,51	31,06 ± 2,31	31,62 ± 1,64	31,16 ± 2,59
12,5	33,71 ± 1,35	33,11 ± 0,41	35,36 ± 4,13	33,56 ± 2,28
6,25	41,86 ± 1,88	43,22 ± 0,97	42,81 ± 1,68	40,51 ± 0,70
3,125	43,04 ± 1,17	42,93 ± 1,59	45,07 ± 0,86	45,32 ± 1,60
1,563	46,03 ± 1,02	46,24 ± 1,82	45,97 ± 1,23	45,83 ± 1,28
0,781	46,80 ± 0,71	46,29 ± 0,87	47,75 ± 1,68	46,74 ± 1,99
0,391	47,51 ± 1,57	48,65 ± 2,38	48,87 ± 1,24	50,58 ± 2,61
0,195	49,53 ± 0,66	49,15 ± 1,79	50,38 ± 0,87	49,41 ± 1,03
0,098	50,59 ± 1,24	49,94 ± 1,01	51,13 ± 0,76	49,26 ± 1,83
0,049	44,26 ± 0,92	43,68 ± 1,74	44,86 ± 1,00	44,18 ± 2,05
0,024	41,37 ± 1,46	40,32 ± 1,55	40,77 ± 1,37	39,76 ± 0,59
0,012	37,56 ± 0,58	37,42 ± 1,22	35,42 ± 1,89	36,05 ± 1,26
0,006	29,12 ± 2,91	28,47 ± 2,10	30,39 ± 0,94	30,45 ± 1,40
0,003	20,24 ± 1,89	21,48 ± 1,63	20,78 ± 1,61	22,10 ± 1,51

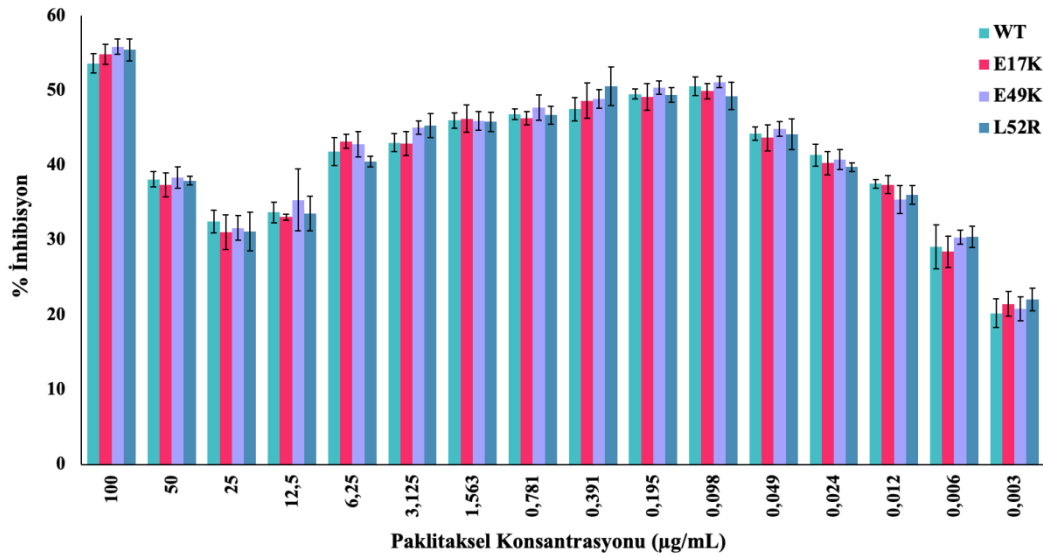
Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

AKT1 WT ile transfekte SKOV-3 hücreleri, transfekte edilmemiş SKOV-3 hücreleri (“housekeeping” *AKT1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 72. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *AKT1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesi, transfekte edilmemiş hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0,05$). Bu sonuçlar, *AKT1* ifade edilişindeki artışın, 72. saatte, ilaç direnci ile ilişkili olmadığını göstermektedir. 72. saatteki, artmış *AKT1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-35’de gösterilmiştir.



Şekil 4-35: SKOV-3 hücrelerinde AKT1 WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).

AKT1 WT ve mutasyonlarını taşıyan SKOV-3 hücrelerinde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 72. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, AKT1 WT ve mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-36).



Şekil 4-36: AKT1 WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).

Bu sonuçlar, *AKT1* WT ve E17K, E49K ve L52R mutasyonlarının paklitaksel direncine neden olmadığını gösterdi.

4.7.2. SKOV-3 Hücrelerinde *CTNNB1* Mutasyonları ve İlaç Direnci

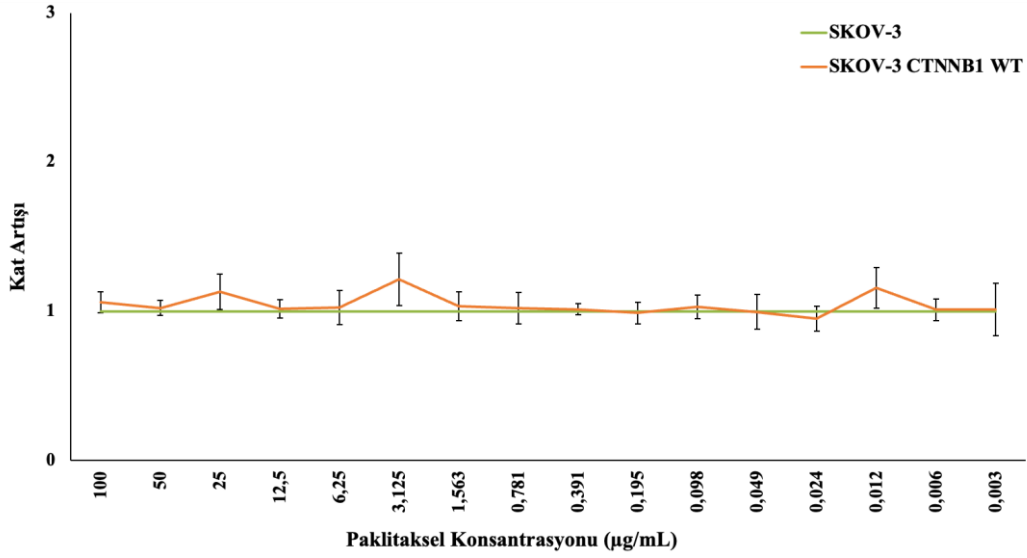
CTNNB1 WT ve mutasyonları (S33P, S45F ve T41A) taşıyan SKOV-3 hücreleri, paklitaksel ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilerek hücre ölümleri MTS analizi ile saptandı. 24. saatte, çalışılan tüm ilaç dozlarında (100-0,003 µg/mL), paklitakselin *CTNNB1* WT ve mutasyonlarında hücre ölümüne neden olduğu görüldü (Tablo 4-16).

Tablo 4-16: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (24 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-24 saat (% İnhibisyon)			
	WT	S33P	S45F	T41A
100	29,37 ± 0,92	28,68 ± 1,57	28,04 ± 1,00	28,59 ± 0,96
50	23,37 ± 0,37	22,21 ± 1,64	22,77 ± 1,67	23,30 ± 0,88
25	18,52 ± 0,54	17,23 ± 1,39	19,22 ± 0,99	18,34 ± 0,76
12,5	19,02 ± 1,59	18,22 ± 1,22	19,80 ± 1,37	19,14 ± 1,03
6,25	18,57 ± 0,20	18,17 ± 1,71	19,36 ± 0,57	18,95 ± 1,34
3,125	18,87 ± 2,01	18,15 ± 2,60	19,01 ± 2,50	20,39 ± 2,31
1,563	21,59 ± 0,88	20,09 ± 1,70	20,83 ± 1,80	21,04 ± 0,94
0,781	21,52 ± 1,69	21,45 ± 2,09	21,36 ± 1,15	22,41 ± 1,08
0,391	24,57 ± 1,20	24,64 ± 0,34	24,87 ± 1,81	26,57 ± 2,12
0,195	22,51 ± 1,22	22,32 ± 1,51	23,41 ± 2,12	22,33 ± 2,08
0,098	21,75 ± 2,34	20,49 ± 1,22	21,59 ± 0,95	22,15 ± 2,11
0,049	23,13 ± 0,26	22,12 ± 1,37	23,63 ± 2,34	23,37 ± 1,00
0,024	19,67 ± 1,07	19,89 ± 2,01	21,11 ± 1,44	21,89 ± 1,99
0,012	17,19 ± 1,03	18,14 ± 1,90	19,10 ± 2,10	19,11 ± 1,93
0,006	16,01 ± 2,65	15,51 ± 2,20	16,25 ± 2,16	17,47 ± 2,06
0,003	14,63 ± 2,02	14,10 ± 2,12	16,55 ± 1,73	16,06 ± 1,97

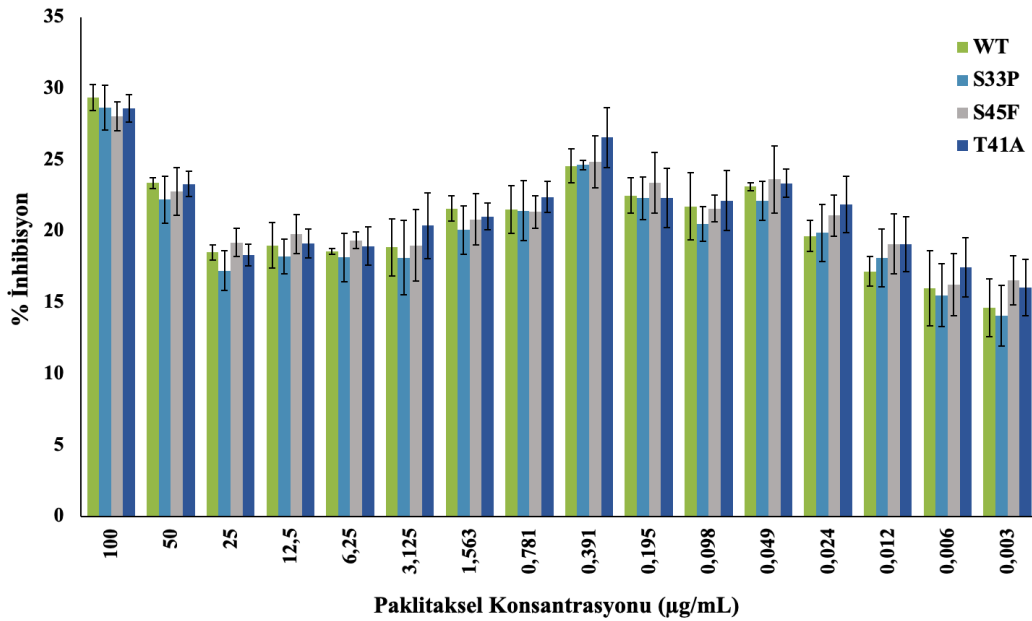
Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

CTNNB1 WT ile transfekte SKOV-3 hücreleri, transfekte edilmemiş SKOV-3 hücreleri (“housekeeping” *CTNNB1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 24. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesi, transfekte edilmemiş hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0,05$). Bu sonuçlar, *CTNNB1* ifade edilişindeki artışın, 24. saatte, ilaç direnci ile ilişkili olmadığını göstermektedir. 24. saatteki, artmış *CTNNB1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-37’de gösterilmiştir.



Şekil 4-37: SKOV-3 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (24 saat).

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını taşıyan SKOV-3 hücrelerinde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 24. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* WT ve mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-38).



Şekil 4-38: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (24 saat).

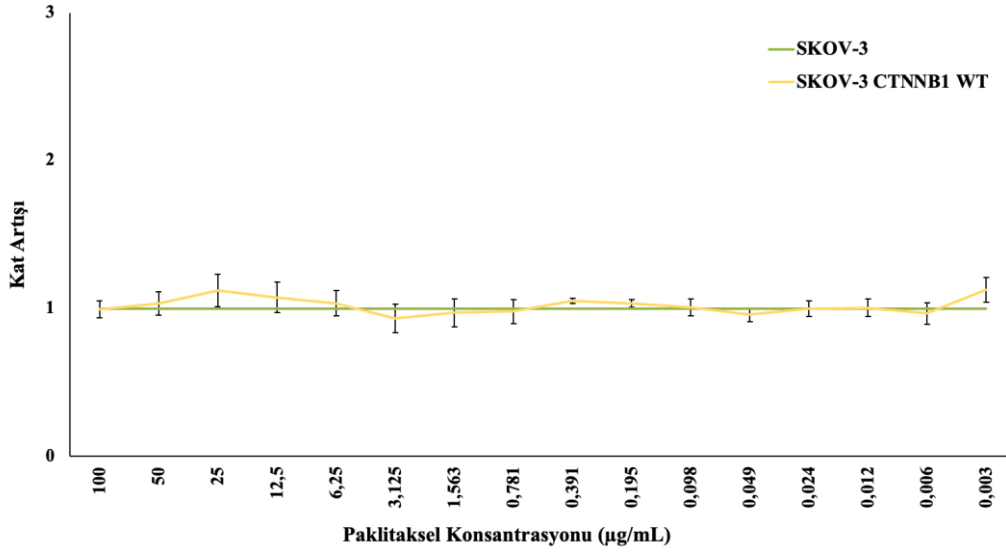
48. saatte, çalışılan tüm ilaç dozlarında (100-0,003 $\mu\text{g/mL}$), paklitakselin *CTNNB1* WT ve mutasyonlarında hücre ölümüne neden olduğu görüldü (Tablo 4-17).

Tablo 4-17: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (48 saat)

Paklitaksel ($\mu\text{g/mL}$)	Hücre Ölümü-48 saat (% İnhibisyon)			
	WT	S33P	S45F	T41A
100	50,57 $\pm$ 2,88	49,91 $\pm$ 2,61	47,74 $\pm$ 1,20	47,5 $\pm$ 1,43
50	35,63 $\pm$ 3,26	35,25 $\pm$ 2,66	33,48 $\pm$ 1,23	35,9 $\pm$ 2,81
25	27,48 $\pm$ 1,62	26,70 $\pm$ 0,26	28,01 $\pm$ 1,36	29,7 $\pm$ 1,56
12,5	25,39 $\pm$ 1,59	25,21 $\pm$ 1,82	26,63 $\pm$ 3,02	25,9 $\pm$ 2,50
6,25	28,82 $\pm$ 1,30	27,15 $\pm$ 2,83	29,83 $\pm$ 2,55	29,7 $\pm$ 2,02
3,125	30,45 $\pm$ 1,77	29,41 $\pm$ 1,29	32,94 $\pm$ 3,53	31,4 $\pm$ 2,76
1,563	31,35 $\pm$ 2,12	32,31 $\pm$ 1,52	32,19 $\pm$ 2,04	30,8 $\pm$ 2,62
0,781	32,93 $\pm$ 1,01	31,54 $\pm$ 2,39	32,08 $\pm$ 3,12	34,8 $\pm$ 2,10
0,391	35,91 $\pm$ 0,90	36,01 $\pm$ 1,65	35,22 $\pm$ 4,13	35,5 $\pm$ 2,44
0,195	35,16 $\pm$ 1,20	33,49 $\pm$ 0,91	34,36 $\pm$ 2,99	36,1 $\pm$ 2,19
0,098	33,32 $\pm$ 0,74	31,57 $\pm$ 2,69	32,99 $\pm$ 3,36	31,5 $\pm$ 1,85
0,049	32,6 $\pm$ 1,28	32,17 $\pm$ 2,41	33,43 $\pm$ 3,69	33,0 $\pm$ 2,60
0,024	31,19 $\pm$ 1,94	29,60 $\pm$ 1,16	30,16 $\pm$ 1,16	31,7 $\pm$ 2,75
0,012	28,80 $\pm$ 2,53	26,65 $\pm$ 1,37	29,70 $\pm$ 2,39	28,9 $\pm$ 1,41
0,006	25,19 $\pm$ 1,30	24,82 $\pm$ 2,10	25,81 $\pm$ 3,89	25,9 $\pm$ 2,43
0,003	19,29 $\pm$ 0,80	17,94 $\pm$ 2,00	21,10 $\pm$ 2,60	18,8 $\pm$ 1,34

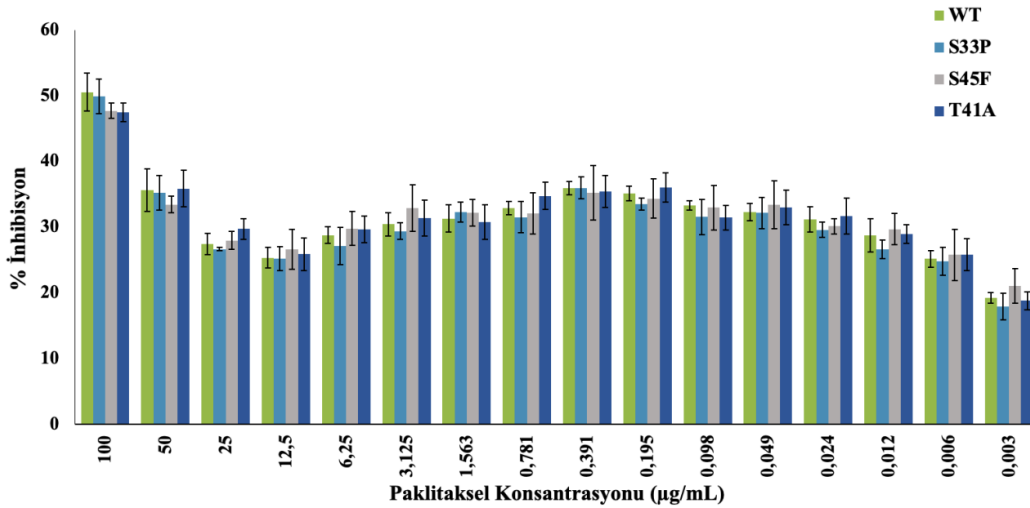
Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

CTNNB1 WT ile transfekte SKOV-3 hücreleri, transfekte edilmemiş SKOV-3 hücreleri (“housekeeping” *CTNNB1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 48. saatte, 100-0,003 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında, *CTNNB1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesi, transfekte edilmemiş hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0,05$). Bu sonuçlar, *CTNNB1* ifade edilişindeki artışın, 48. saatte, ilaç direnci ile ilişkili olmadığını göstermektedir. 48. saatteki, artmış *CTNNB1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-39’da gösterilmiştir.



Şekil 4-39: SKOV-3 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (48 saat).

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını taşıyan SKOV-3 hücrelerinde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 48. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* WT ve mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-40).



Şekil 4-40: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (48 saat).

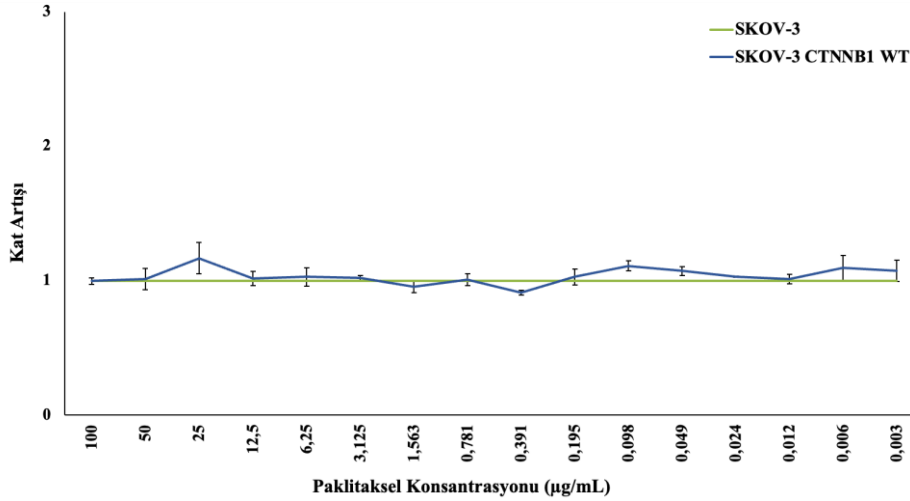
72. saatte, çalışılan tüm ilaç dozlarında (100-0,003 µg/mL), paklitakselin *CTNNB1* WT ve mutasyonlarında hücre ölümüne neden olduğu görüldü (Tablo 4-18).

Tablo 4-18: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölüm yüzde değerleri (72 saat)

Paklitaksel (µg/mL)	Hücre Ölümü-72 saat (% İnhibisyon)			
	WT	S33P	S45F	T41A
100	54,72 ± 2,17	53,38 ± 2,60	54,73 ± 1,17	54,69 ± 1,54
50	37,18 ± 2,67	38,09 ± 1,54	37,23 ± 0,75	38,10 ± 0,85
25	29,07 ± 2,09	28,43 ± 1,40	28,45 ± 1,38	30,48 ± 1,50
12,5	34,97 ± 0,87	33,96 ± 1,87	36,58 ± 2,19	33,35 ± 2,36
6,25	39,08 ± 1,10	38,38 ± 0,82	40,51 ± 2,70	38,30 ± 1,87
3,125	42,34 ± 0,45	41,77 ± 1,68	44,24 ± 0,72	44,17 ± 2,46
1,563	45,74 ± 0,59	45,78 ± 2,75	47,26 ± 1,32	48,26 ± 3,20
0,781	47,39 ± 1,27	46,70 ± 0,30	48,57 ± 2,53	47,41 ± 1,86
0,391	49,72 ± 2,14	47,14 ± 1,36	50,92 ± 2,97	49,31 ± 0,97
0,195	48,74 ± 0,97	47,34 ± 1,27	50,11 ± 1,35	48,65 ± 1,32
0,098	45,90 ± 1,16	44,73 ± 2,15	46,48 ± 2,18	46,69 ± 2,98
0,049	42,19 ± 1,10	40,49 ± 1,79	43,44 ± 1,47	44,39 ± 3,39
0,024	39,89 ± 1,22	39,72 ± 2,01	41,88 ± 2,74	43,40 ± 3,17
0,012	36,60 ± 1,7	36,66 ± 1,52	36,85 ± 2,01	34,42 ± 2,23
0,006	27,67 ± 0,86	25,35 ± 2,64	29,11 ± 1,43	29,76 ± 1,81
0,003	17,85 ± 0,49	17,38 ± 1,43	19,56 ± 1,59	18,36 ± 1,19

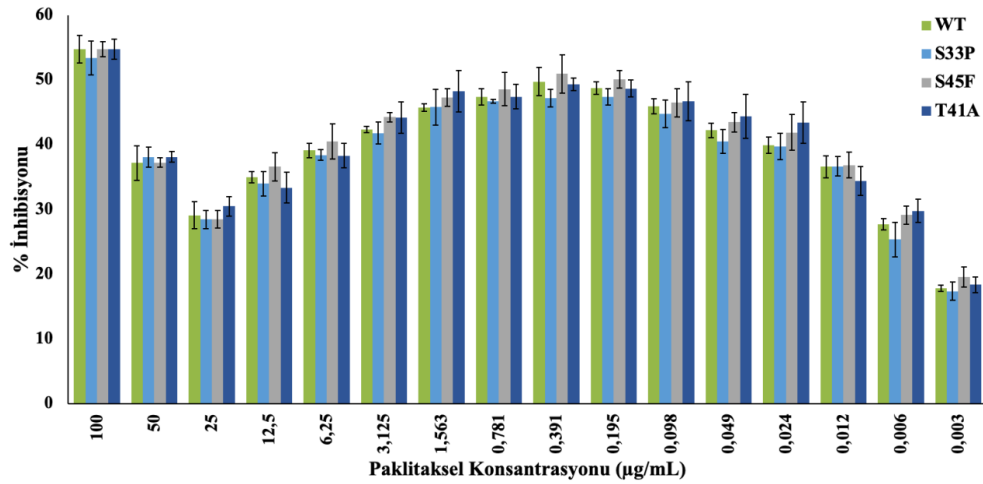
Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3).

CTNNB1 WT ile transfekte SKOV-3 hücreleri, transfekte edilmemiş SKOV-3 hücreleri (“housekeeping” *CTNNB1* içeren) ile karşılaştırıldığında, 72. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* WT ile transfekte edilmiş hücrelerin hücre ölüm yüzdesi, transfekte edilmemiş hücrelerinininkinden, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0,05$). Bu sonuçlar, *CTNNB1* ifade edilişindeki artışın, 72. saatte, ilaç direnci ile ilişkili olmadığını göstermektedir. 72. saatteki, artmış *CTNNB1* WT düzeyinin ilaç direncine etkisi, kat artışı şeklinde Şekil 4-41’de gösterilmiştir.



Şekil 4-41: SKOV-3 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonunun ilaç direncine etkisi (72 saat).

CTNNB1 WT ve mutasyonlarını taşıyan SKOV-3 hücrelerinde, paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi ikili post-hoc analizleri ile kıyaslandığında, 72. saatte, 100-0,003 µg/mL doz aralığında, *CTNNB1* WT ve mutasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4-42).



Şekil 4-42: *CTNNB1* WT ve mutasyonları ile transfekte SKOV-3 hücrelerinde paklitakselin hücre ölümü üzerine etkisi (72 saat).

Bu sonuçlar, *CTNNB1* WT ve S33P, S45F ve T41A mutasyonlarının paklitaksel direncine neden olmadığını gösterdi.

5. TARTIŞMA

Yıllardır jinekolojik maligniteler arasında birinci sırada yer alan meme kanseri, 2020 yılı dünya verilerine göre, akciğer kanserini geride bırakarak tüm kanser türleri içerisinde de en çok teşhis edilen kanser türü olarak birinci sıraya yerleşmiştir. Bu nedenle, halk sağlığı açısından büyük bir yük teşkil etmektedir. Gelecek yirmi yıl içerisinde nüfus artışı ve yaşlanmanın doğal bir sonucu olarak, meme kanseri yükünün 3 milyondan fazla yeni vakaya ve 1 milyon ölüme ulaşması beklenmektedir. Bir diğer önemli jinekolojik malignite olan yumurtalık kanseri, meme kanserine oranla düşük bir vaka sayısına sahip olmakla birlikte, ileri evrelerde teşhis edilebilmesi nedeniyle en ölümcül jinekolojik malignite olmaya devam etmektedir (Stewart ve ark., 2019; Sung ve ark., 2021; Arnold ve ark., 2022).

Kanser hücrelerinin adaptasyon yetenekleri son derece yüksektir ve kanser hücreleri hayatta kalma sinyal yollarının aktivasyonu, ölüm sinyal yollarının inhibisyonu gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla ilaç direnci geliştirir (Holohan ve ark., 2013; Blair ve ark., 2014). Paklitaksel, yumurtalık ve meme kanserlerinin tedavisinde kombine şekilde kullanılan taksan sınıfı trisiklik bir diterpenoiddir. (Zhao ve ark., 2022). Paklitakselin kanser tedavisinde kullanımını sınırlayan ve çözülmesi gereken önemli sorunlardan biri de paklitaksele karşı gelişen ilaç direncidir (Yusuf ve ark., 2003).

Kanser hastalarına sistemik tedavi uygulanmasına yönelik mevcut yaklaşım büyük ölçüde ampiriktir. Kanser tedavisinde, hastaya uygun, doğru ilacın seçimini sağlayacak, spesifik tedavilere yanıtı veya direnci prospektif olarak tahmin etmeye yönelik biyobelirteçlerin varlığına ihtiyaç vardır. Klinikte, yumurtalık kanserlerinin tedavisinde kullanılan herhangi bir biyobelirteç olmamasına karşın meme kanserlerinin tedavisinde, yaygın olarak ER, PR ve HER-2 olmak üzere 3 onkolojik prediktif belirteç kullanılmaktadır. ER ve PR, meme kanserinde endokrin tedavinin seçiminde, HER-2 ise yine meme kanserinde spesifik anti-HER-2 hedefli tedavilerin (trastuzumab gibi) seçiminde kullanılmaktadır (Duffy ve Crown, 2008). Bu üç biyobelirteçten yoksun olan meme kanseri olgularında endokrin veya anti-HER2 tedavi yaklaşımları kullanılmamaktadır. Bu tip genetik profile sahip olgularda temel tedavi yaklaşımı paklitakseli de içeren kemoterapi rejimleridir (Waks ve Winer, 2019). Bunun yanı sıra,

ER(+), PR(+) ve HER2(-) meme kanserlerinde birincil olarak kullanılan endokrin tedaviye direnç gelişmesi veya tedaviye yanıt alınamaması durumunda da lenf nodu tutulumu olan hastalarda paklitaksel içeren kemoterapi rejimleri uygulanmaktadır (Uchida, ve ark.,2013).

İçsel veya kazanılmış ilaç direncinin neden olduğu, kansere yönelik terapötik yaklaşımların başarısızlığı, altta yatan moleküler mekanizmaların ve tümörlerin progresyonu ile ilişkili potansiyel terapötik hedeflerin araştırılmasının önemini her geçen gün arttırmaktadır (Ke ve Shen, 20017). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, çeşitli kanser türlerinde en sık aktive edilen sinyal yollarından biridir ve son yıllarda ilaç direncinin aşılmasında yeni bir hedef olarak görülmektedir (Dong ve ark., 2021).

Yumurtalık kanserlerinde sıklıkla, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun bir veya daha fazla bileşeninde değişiklikler görülmektedir. Bu değişiklikler arasında, *PIK3CA*, *PIK3R1*, *mTOR* mutasyonları, onkogenik tirozin kinaz reseptörlerinin aktivasyonu, *PTEN* ve inositol polifosfat-4-fosfataz, tip III (*INPP4B*) gibi tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı, *AKT1* ve *AKT2*'nin amplifikasyonu ve/veya mutasyonları yer alır (Mabuchi ve ark., 2015). Noske ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, AKT'nin invazif yumurtalık karsinomlarının %58'inde aşırı aktive olduğu bildirilmiştir.

Yumurtalık kanserinin yanı sıra meme kanserinde de, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu bileşenlerinde mutasyonlar gözlenir. Bu mutasyonlar sonucu oluşan aşırı aktivasyon, bu yolun meme kanserinin gelişimindeki önemini ortaya koymaktadır (Carpten ve ark., 2007; Kim ve ark., 2008). HER2, EGFR ve IGF1R gibi reseptör tirozin kinazların genomik amplifikasyonu veya aşırı ekspresyonu, *PIK3CA*'daki ve *AKT1*'in plekstrin homoloji alanındaki aktive edici mutasyonların varlığı, *PIK3R1*, *AKT2* ve *AKT3* mutasyonları, susturucu *PTEN* mutasyonları veya *PTEN* kaybı, meme kanserlerinde sık görülen genetik değişiklikler arasındadır (Lauring ve ark., 2013).

Bir serin/treonin protein kinaz olan AKT, PI3K/AKT sinyal yolunun temel aşağı akış molekülüdür. Transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü inhibitörleri, protein kinazlar, GTPaz aktivasyon proteinleri ve apoptoz indükleyiciler gibi 100'den fazla substarata sahip olan (Arcaro ve Guerreiro, 2007; Manning ve Toker, 2017) AKT'nin aktivasyonu, hücre döngüsünün, büyümenin, çoğalmanın ve enerji metabolizmasının düzenlenmesine aracılık eder (Risso ve ark., 2015). Ayrıca, AKT, GSK-3 β 'nin inhibisyonuna neden olarak β -katenini aktive eder ve bu yönüyle, WNT/ β -katenin yolu

ile de bağlantılıdır (Osaki ve ark., 2004). Üç farklı izoforma sahip AKT'nin çoğu dokuda eksprese edilen izoformu AKT1'dir (Dummler ve Hemmings, 2007). AKT1'in aktivasyonu, "plekstrin" homoloji (PH) alanının fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat bağlanması sonucu membran lokalizasyonu ile başlatılır ve ardından serin 473 ve treonin 308'in fosforilasyonu ile bu aktivasyon tamamlanır (Vivanco ve Sawyers, 2002). Literatürde, meme ve yumurtalık kanserlerinde, AKT1 aktivasyonunun paklitaksel direncine katkı sağladığı ve AKT1'in inhibisyonunun paklitaksele karşı hassasiyeti arttırdığı belirtilmektedir (Liang ve ark., 2006; Kim ve ark., 2007; Lin ve ark., 2015).

AKT1'in aktivasyonuna neden olan mutasyonlardan biri, PH alanında bulunan ve üzerinde en çok çalışılan *AKT1* E17K (49G>A) mutasyonudur. Meme kanseri hastalarının %8'inde, yumurtalık kanseri hastalarının ise %2'sinde, E17K mutasyonunun varlığı rapor edilmiştir. Bu mutasyon sonucu oluşan 17. pozisyondaki lizin (K17), lipid bağlama cebinin elektrostatik etkileşimlerini değiştirmek suretiyle AKT1'in fosfatidilinositol ligandıyla yeni hidrojen bağları oluşturmaya ve bu yolla AKT1'in plazma zarında lokalize olmasına ve aktivasyonunun artmasına neden olur (Carpten ve ark., 2007). Yapılan çalışmalarda, E17K mutasyonunun, PI3K'den bağımsız bir şekilde, AKT1 aktivasyonuna neden olduğu, membrana yerleşerek aktivasyonu indüklediği gösterilmiştir (Brugge ve ark., 2007; Do ve ark., 2008). Mutasyon kaynaklı artmış PI3K/AKT sinyalinin, kontrolsüz hücre çoğalmasına, artmış hayatta kalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Askham ve ark., 2010; Guo ve ark., 2010; Parikh ve ark., 2012; De Marco ve ark., 2015). Başka bir çalışmada, E17K mutasyonu varlığında, AKT1 proteininin hiper-ubikitinasyona uğradığı ve aktivasyonunun arttığı saptanmıştır (Yang ve ark., 2010).

Proteinin PH alanında meydana gelen bir diğer yanlış anlamlı mutasyon, E49K (145G>A) mutasyonudur. E49K mutasyonu, PH alanında yer almasına rağmen, PIP3 bağlama cebinde yer almaz ve bu nedenle, bu mutasyon, AKT1'in PIP3'e bağlanmasını etkilemeyebilir (Yang ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada, bu mutasyon sonucu, AKT1 aktivitesinde artış olduğu ve NIH3T3 hücrelerinin transformasyon aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir (Askham ve ark., 2010). E49K mutasyonu, glutamik asidin lizine dönüşümü ile sonuçlanır, bu değişim, hiper-ubikitinasyona, artmış aktivasyona ve onkogenik potansiyele neden olur (Yang ve ark., 2010).

Literatürde, mesane kanserinde ve akciğer hemanjiyomunda E49K mutasyonunun varlığı bildirilmiş (Askham ve ark., 2010; Jung ve ark., 2016), meme ve yumurtalık kanserlerinde ise bu mutasyonun varlığına ve bulunma sıklığına dair bir bilgi bulunmamaktadır.

PH-kinaz alanı (PH-KD) etkileşimleri, AKT'nin inaktif halde tutulması açısından önemlidir. AKT'nin aktivasyonu, PH alanını, kinaz alanından ayıran konformasyonel değişikliğin ardından gerçekleşir (Calleja ve ark., 2007). L52 bölgesi, PH-KD ara yüzünde yer alır ve kinaz alanındaki V270, V271, Y326 ve R328 bölgeleri ile hidrofobik temaslar kurar. Bu bölgede meydana gelen L52R (155T>G) mutasyonu, PH-KD bağlanmasını zayıflatır (Parikh ve ark., 2012), AKT1'in fosforilasyon düzeyini ve aktivitesini artırır (Parikh ve ark., 2012; Yi ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda, meme kanserinde (Hinz ve Jücker, 2019) ve berrak hücreli yumurtalık kanserinde bu mutasyonun varlığı bildirilmiştir (Caumanns ve ark., 2018).

Paklitaksel çeşitli moleküler hedefler aracılığıyla AKT'nin fosforilasyonunu ve ekspresyonunu azaltarak hücreleri apoptoza sürükler (Zhao ve ark., 2022). *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonları tarafından, PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonu, bu mutasyonların paklitaksel direncine neden olabileceği olasılığını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, PH alanının AKT1 aktivitesindeki önemi göz önüne alınarak, *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonları oluşturuldu ve bu mutasyonların, meme (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve yumurtalık (SKOV-3) kanseri hücrelerine transfeksiyonları sağlanarak paklitaksel direncine olan etkileri *in vitro* olarak incelendi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde, *AKT1* WT transfeksiyonunun tek başına paklitaksel direncine neden olduğu bununla birlikte MCF-7 hücrelerinde, *AKT1* E17K ve E49K mutasyonlarının, MDA-MB-231 hücrelerinde ise *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonlarının *AKT1* WT'ye kıyasla daha fazla paklitaksel direncine yol açtığı görüldü. SKOV-3 yumurtalık kanseri hücresinde ise, *AKT1* WT ve mutasyonlarının herhangi bir paklitaksel direncine neden olmadığı belirlendi.

Literatürde, bu mutasyonların paklitaksel ile ilişkisini inceleyen bir çalışma olmamasına karşın AKT inhibitörlerinin tekli veya paklitaksel ile kombine şekilde kullanımının meme ve yumurtalık kanseri hastalarında olumlu sonuçlar verdiğine dair veriler mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, AKT inhibitörlerinden MK-2206 ve AZD5363 (kapivasertib) kullanımı ile *AKT1* E17K mutasyonuna sahip meme kanseri hayvan

modellerinde, anlamlı bir tümör büyüme inhibisyonu görülmüştür. Yine, aynı çalışmanın faz I klinik bölümünde, kapivasertibin, *AKT1* E17K mutasyonunu içeren meme ve yumurtalık kanserli hastalarda kısmi yanıtları indüklediği bildirilmiştir (Davies ve ark., 2015). Bu çalışmayı destekleyen, kapivasertibin, *AKT1* E17K mutant metastatik meme kanseri ve diğer kanserlerde umut verici aktivitesini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (Hyman ve ark., 2017; Smyth ve ark., 2018; Zimmer ve ark., 2019). Ayrıca, üçlü negatif meme kanserinin birinci basamak paklitaksel tedavisine AKT inhibitörü kapivasertibin eklenmesi, genel ve progresyonsuz hayatta kalma süresini uzatmıştır ve bu olumlu sonuçların, PIK3CA/AKT1/PTEN değişikliklerine sahip hastalarda daha belirgin olduğu ifade edilmektedir (Schmid ve ark., 2020). Yapılan literatür taramasında, *AKT1* E49K ve L52R mutasyonları ve paklitaksel veya *AKT1* inhibitörleri ile ilgili yapılan herhangi bir çalışma olmadığı belirlendi.

Paklitakselin AKT aktivasyonunu azaltarak hücreleri apoptoza sürüklediği (Papadopoulos ve Scorilas, 2015; Wang ve ark., 2016; Li ve ark., 2020; Xin ve ark., 2021) ve *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonlarının *AKT1*'in fosforilasyonu yoluyla *AKT1* aktivasyonunda artışa neden olduğu (Carpten ve ark., 2007; Askham ve ark., 2010; Guo ve ark., 2010; Yang ve ark., 2010; Parikh ve ark., 2012; Yi ve ark., 2013) ve AKT inhibitörlerinin kullanımı ile ilaç cevabında iyileşmelerin sağlandığı (Davies ve ark., 2015; Hyman ve ark., 2017; Smyth ve ark., 2018; Zimmer ve ark., 2019; Schmid ve ark., 2020) göz önünde bulundurulduğunda, mevcut mutasyonlar varlığında *AKT1* aktivasyonunun artmasına bağlı olarak paklitaksel direncinin görülmesine dair bulgularımız, meme kanserindeki sonuçlar açısından literatürle uyumludur. Ayrıca, daha önce yapmış olduğumuz çalışmamızda da (Hasbal-Celikok ve ark., 2021), *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonlarının kolorektal kanserde setuksimab, 5-florourasil, SN-38, oksalipatin ve irinotekan direncine neden olduğu gösterildi. Bu bulgulara, meme kanserindeki bulgularımız ile paralellik göstermektedir.

AKT1 mutasyonlarının SKOV-3 hücreleri üzerindeki etkisini ortaya koyan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, Davies ve ark., (2015) tarafından yapılan faz I çalışmada, endometrioid tipteki yumurtalık kanserinde E17K mutasyonu taşıyan bir (1) hastanın AKT inhibitörüne karşı kısmi cevap verdiği bildirilmiştir. *AKT* E17K mutasyonu-SKOV-3 ile ilgili sonuçlarımız, bu çalışmayı

desteklememekle birlikte yumurtalık kanseri alt türünün farklı olması nedeniyle farklı cevapların oluşabileceği düşünülmektedir.

Kanserle ilişkili sinyal yollarından bir diğeri, çok sayıda yaşamsal süreci yöneten WNT/ β -katenin sinyal yoludur (MacDonald ve ark., 2009). WNT/ β -katenin sinyali normal meme dokusunda, hücre akıbetinin belirlenmesi, hücre çoğalması, embriyonik ve doğum sonrası dönemde meme bezinin gelişimi sırasında hücrel göçün ve yetişkin meme dokusunun homeostazının sağlanması gibi kritik süreçleri kontrol eder (Logan ve Nusse, 2004; Yu ve ark., 2016). Meme kanserinde, WNT antagonist [Dickkopf (DKK)-1, WNT inhibitör faktör 1 (WIF1), DKK3, SFRP5, APC, GSK-3 β , MCC ve CTNNB1 gibi] ve agonistlerinde (FZD1, FZD2, CTNNB1, DVL1, LEF1) sık görülen genetik ve epigenetik değişikliklerin, WNT hedef genlerinin, β -katenin aracılı aktivasyonu ile sonuçlandığını bildiren çok sayıda çalışma vardır (Mukherjee ve Panda, 2020).

Yapılan çalışmalarda, meme kanseri doku örneklerinin çoğunda, immünohistokimyasal boyama ile yüksek nükleer ve/veya sitoplazmik β -katenin seviyeleri tespit edilmiştir ve bu sonuçlar, meme kanserinde WNT/ β -katenin yolunun aktive olduğunun en iyi kanıtıdır (Lin ve ark., 2000; Ryo ve ark., 2001). Lin ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, yüksek β -katenin seviyelerinin meme kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğu ifade edilmektedir. Yine, invaziv meme kanseri olgularının incelendiği bir başka çalışmada, tümörün tüm moleküler alt tiplerinde, anormal derece yüksek seviyede β -katenin ekspresyonu gözlenmiştir ve yine, bu artış kötü klinik sonuçla ilişkilendirilmiştir (Li ve ark., 2014).

İnsan meme kanserinin birçok alt tipinde artmış WNT/ β -katenin sinyali görülür. Üçlü negatif meme karsinomları, diğer alt tiplere (luminal A, luminal B veya HER2(+)) kıyasla, daha yüksek β -katenin seviyelerine sahiptir ve kötü prognozla ilişkilidir (Khramtsov ve ark., 2010). En yüksek β -katenin seviyeleri metaplastik karsinomlarda ve metastaz yapmayan fibromatoziste (iki nadir alt grup) bulunur. Burada tümörlerin %90 kadarı artmış β -katenin seviyelerine sahiptir ve bunların bir kısmı *CTNNB1* geninde aktive edici genetik mutasyonlar içerir (Abraham ve ark., 2002; Hayes ve ark., 2008; Hennessy ve ark., 2009). Çoğunlukla kolorektal kanserde karşılaşılan durumun aksine, meme kanserinde *APC*, *AXIN* veya *CTNNB1*'deki genetik mutasyonlar nadir görülür. Bu tutarsızlık muhtemelen WNT/ β -katenin sinyallemesine duyarlılıktaki dokuya özgü farklılıklarla açıklanabilir (Gaspar ve Fodde, 2004; Gaspar ve ark., 2009).

WNT-4'ün, yumurtalığın embriyonik gelişimindeki rolü ve WNT-7a'nın üreme sisteminin cinsiyete özgü farklılaşmasındaki etkilerinin keşfedilmesi ile birlikte, WNT/ β -katenin yolunun yumurtalığın normal gelişiminde, kritik bir rol oynadığı anlaşılmıştır (Parr ve McMahon, 1998; Vainio ve ark., 1999). Ricken ve ark., (2002) tarafından yapılan çalışmada, yumurtalık kanseri hücre serilerinde (SKOV-3 dahil) üç farklı WNT transkriptinin (Wnt-2b, Wnt-5a, Wnt-11) ifade edildiği bildirilmiş ve yumurtalık tümörünün oluşumunda anormal WNT ekspresyonunun rol oynayabileceği gösterilerek, bu yolun önemine dikkat çekilmiştir.

Epitelyal yumurtalık kanserinde, WNT/ β -katenin sinyal yolunda görevli çok sayıda bileşende değişikliklerin meydana geldiği görülür. Bu değişikliklere, *CTNNB1*, *AXIN*, *GSK3 β* , *APC* mutasyonları, *WNT-5a*, *WNT-7a* ve *WNT-7b* ligandlarının ve *PYGO2*'nin ekspresyonunda artış, *DKK1*, *DKK2*, *SFRP4* gibi WNT antagonistlerinin ekspresyonlarında azalma örnek verilebilir. Ayrıca, bu yolun anormal aktivasyonu meme kanserlerine benzer bir şekilde yumurtalık kanserlerinde de kötü prognozla ilişkilidir (Nguyen ve ark., 2019).

CTNNB1 mutasyonları, yumurtalık kanserinde görülmekle birlikte özellikle, endometrioid yumurtalık kanseri alt tipinde yaygındır ve bu alt tipe sahip vakalarda %54'e varan oranlarda *CTNNB1* mutasyonlarının varlığı söz konusudur (Wu ve ark., 2001). Ayrıca, endometrioid yumurtalık kanserinde, *CTNNB1* mutasyonlarının varlığı artmış nükleer β -katenin birikimi ile de ilişkilidir (Zyla ve ark., 2021).

WNT/ β -katenin sinyal yolu, meme ve yumurtalık kanserlerindeki, yüksek aktivasyonu nedeniyle dikkatleri üzerine toplamaktadır. Genetik mutasyonların önemi de bu noktada ortaya çıkmaktadır. Bu sinyal yolu bileşenleri üzerindeki genetik mutasyonların yolun aktivasyonunu etkileyerek hastalığın ilerlemesine veya tedavinin seyrine katkıda bulunmaktadır. WNT/ β -katenin sinyal yolunun merkezinde yer alan β -katenin proteini için temel düzenleyici mekanizmaya bakıldığında, N-terminal bölgesinde görülen sıralı fosforilasyon ve ardından ubiquitin aracılı proteolizin önemli olduğu görülmektedir. Bu anlamda, CK1 α , S45 kalıntısını fosforile edererek, GSK-3 β tarafından T41/S37/S33 üzerindeki fosforilasyonun başlamasına ve ubiquitin E3 ligaz β -transdusin tekrarlarını içeren proteinlerin (β -TrCP) N-terminal bölgesine (D32 ila S37) bağlanmasına yol açar (Liu ve ark., 2002). N-terminal bölgesi, β -katenin proteininin fonksiyonunda önemli bir yere sahiptir. Bu bölgede meydana gelen mutasyonlar

aktiviteyi değiştirebilir. Bu bölge, *CTNNB1* ekzon 3 tarafından kodlanır ve dolayısıyla N-terminal bölgesinde meydana gelen mutasyonlar, ekzon 3 mutasyonları olarak adlandırılır (Kim ve Jeong, 2019). S33P (97T>C), S45F (134C>T) ve T41A (121A>G) mutasyonları, *CTNNB1* ekzon 3 bölgesinde meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlardır. Yapılan çok sayıda çalışmada, bu mutasyonların varlığında, β -kateninin ubiquitinasyon aracılı proteolizinin azaldığı, β -kateninin nükleer birikiminin ve β -katenin bağımlı transkripsiyonun arttığı ifade edilmektedir (Van Nhieu ve ark., 1999; Tanaka ve ark., 2001; Machin ve ark., 2002; Lévy ve ark., 2002; Austinat ve ark., 2008; Hamada ve ark., 2014; An ve ark., 2021; Oulès ve ark., 2022).

Meme kanserinde, *CTNNB1* S45F ve T41A mutasyonlarının varlığı, meme kanserinin nadir bir türü olan memenin desmoid tip fibromatozisinde rapor edilmiştir (Norkowski ve ark., 2020). S33P mutasyonunun, meme kanserindeki varlığı hakkında ise herhangi bir bilgiye ulaşılmamıştır. Yumurtalık kanserinde ise, her üç *CTNNB1* mutasyonunun (S33P, S45F ve T41A) varlığı bildirilmiştir (Catasús ve ark., 2004; Growdon ve ark., 2011; Bi ve ark., 2015; Krishna ve ark., 2023).

Çalışmamızda, *CTNNB1* S33P, S45F ve T41A mutasyonları oluşturularak, nükleer β -katenin birikimi ve buna bağılı olarak *WNT* hedef genlerinde transkripsiyon artışına neden olduğu belirtilen bu mutasyonların, meme (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve yumurtalık (SKOV-3) kanseri hücrelerine transfeksiyonları sağlandı ve paklitaksel direncine olan etkileri *in vitro* olarak incelendi. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde, *CTNNB1* WT transfeksiyonunun tek başına paklitaksel direncine neden olduğu, *CTNNB1* S45F ve T41A mutasyonlarının ise, *CTNNB1* WT'ye kıyasla daha fazla paklitaksel direncine neden olduğu görüldü. Ayrıca, üçlü negatif MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde ise *CTNNB1* WT transfeksiyonu, paklitaksel direncine neden olmakla birlikte, *CTNNB1* S33P, S45F ve T41A mutasyonları *CTNNB1* WT'ye kıyasla paklitaksel cevabında herhangi bir değişikliğe yol açmadı.

Her iki meme kanseri hücre serisinde de *CTNNB1* transfeksiyonu ile ilaç direncinin gelişmiş olması, insan meme kanserinin birçok alt tipinde artmış *WNT*/ β -katenin sinyalinin varlığı, artmış β -katenin seviyeleri ve β -katenin birikiminin kötü prognozla ilişkisi (Lin ve ark., 2000; Ryo ve ark., 2001; Khramtsov ve ark., 2010; Li ve ark., 2014) göz önünde bulundurulduğunda, literatürle uyumluluk göstermektedir.

Nükleer β -katenin birikimine ve buna bağlı olarak *WNT* hedef genlerinde transkripsiyon artışına neden olduğu belirtilen S45F ve T41A mutasyonlarının, MCF-7 hücrelerinde paklitaksel direncine neden olurken, MDA-MB-231 hücrelerinde dirence neden olmaması bu hücre serileri arasındaki farklılıkların ne olduğu sorusunu akla getirmektedir. MCF-7 hücreleri ER ile PR'yi eksprese ederken HER2'yi eksprese etmez. Birçok açıdan insan meme kanserinin luminal alt tipinin tipik bir örneğidir, *PIK3CA* E545K ve *GATA3* çerçeve kayması mutasyonlarını taşır ve TP53 vahşi tiptir (WT) (Beaver ve ark., 2013). Bir diğer meme kanseri hücre serisi olan MDA-MB-231'in üretici firma ATCC tarafından, ER (-) olduğu, *EGF* ve *TGF α* 'yı eksprese ettiği ve ayrıca *BRAF* G646V, *KRAS* G13D ve *TP53* R28OK mutasyonlarına sahip olduğu bildirilmiştir. Bu hücre, ER negatifliğinin yanı sıra PR ve HER2 açısından da negatiftir ve üçlü negatif olarak bilinir (Welsh 2013 pp. 997-1018.). Ayrıca, EGFR'yi aşırı eksprese ettiği bilinmektedir (Biswas ve ark., 2000).

Gupta ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışmada, β -katenin ve ER α sinyali arasındaki etkileşime dikkat çekilerek β -kateninin, ER α mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin ve ER α aktivitesinin pozitif bir düzenleyicisi olduğu ifade edilmiştir. Guo ve ark., (2015) tarafından yapılan başka bir çalışmada da, β -kateninin artmış ekspresyonu ile siklin D1 ve ER β 'nın pozitif ekspresyonu arasında, meme kanseri gelişimine katkıda bulunabilecek bir ilişki olduğu ifade edilmektedir. Taksanlara karşı hassasiyet ile meme kanseri hücre serilerinde ER α 'nın ekspresyonu arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada ise, ER'nin BCL-2 ailesinin düzenlenmesi yoluyla paklitaksel cevabını olumsuz etkilediği ve yolun düzenlenmesinin, taksanların ER-pozitif meme kanserindeki etkinliğini arttırmak için çok önemli olabileceği ifade edilmektedir (Tabuchi ve ark., 2009).

ER sinyali ile β -katenin (Gupta ve ark., 2011; Guo ve ark., 2015) ve taksan direnci arasındaki ilişki (Tabuchi ve ark., 2009) göz önünde bulundurulduğunda, S45F ve T41A mutasyonları β -katenin birikimine neden olduğundan (Van Nhieu ve ark., 1999; Lévy ve ark., 2002; Austinat ve ark., 2008; Hamada ve ark., 2014; An ve ark., 2021), ER(+) MCF-7 hücrelerinde, bu iki mutasyonun paklitaksel direncine katkı sağlaması ile ilgili bulgularımız literatürle benzerlik göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızda kullandığımız MCF-7 hücrelerinin (MDA'dan farklı olarak) aktive edici *PIK3CA* E545K mutasyonuna sahip olması (Beaver ve ark., 2013), *PIK3CA* E545K

mutasyonun AKT aktive edici etkisi ve AKT'nin de β -katenin birikimine yol açması nedeniyle (Arjumand ve ark., 2016) da bu direnci destekliyor olabilir. Geyer ve ark., (2011) tarafından yapılan çalışmada, WNT/ β -katenin yolu aktivasyonun özellikle üçlü negatif/bazal benzeri meme karsinomlarında belirgin olduğu ve kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğu ancak bu aktivasyonun *CTNNB1* mutasyonları tarafından tetiklenmesinin pek olası olmadığını ifade etmişlerdir. Bu ifade, MDA-MB-231 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonu sonrası paklitaksel direnci gelişmesine rağmen, mutasyon varlığının dirence neden olmaması bulgularımızı desteklemektedir.

Buna ek olarak, daha önce yapmış olduğumuz çalışmamızda (Hasbal-Celikok ve ark., 2021), *CTNNB1* S33P, S45F ve T41A mutasyonlarının kolorektal kanserde, setuksimab, 5-florourasil, SN-38, oksalipatin ve irinotekan direncine neden olduğunu gösterildi. MCF-7 kanser hücrelerindeki bulgularımız önceki bulgularla (Hasbal-Celikok ve ark., 2021) karşılaştırıldığında, bu mutasyonların ilaç direncine neden olmuş olması bakımından paralellik göstermektedir.

SKOV-3 yumurtalık kanseri hücreleri ile ilgili bulgularımız ise, *CTNNB1* WT ve S33P, S45F ve T41A mutasyonlarının paklitaksel direncine neden olmadığını gösterdi.

Yapılan çalışmalarda, endometrioid yumurtalık karsinomunda, *CTNNB1* ekson 3 mutasyonları ve bu mutasyonlar varlığında nükleer β -katenin birikimi rapor edilmiştir (Palacios ve Gamallo, 1998; Gamallo ve ark., 1999; Wright ve ark., 1999; Wu ve ark., 2001; Moreno-Bueno ve ark., 2001). Endometrioid yumurtalık karsinomları, sıklıkla β -katenin geninde mutasyonlar içerir, ancak bu mutasyonlar seröz, berrak hücreli ve müsinöz yumurtalık karsinomlarında daha nadirdir (Dubeau, 2008) ve seröz de dahil olmak üzere diğer alt tiplerde baskın anormal ekspresyon modeli sitoplazmik β -katenin birikimidir (Rask ve ark., 2003; Kildal ve ark., 2005). β -katenin ekspresyon düzeyi ile yumurtalık kanserinin patolojik özellikleri veya klinik sonuçları arasındaki ilişki araştırılmış ancak hasta sayılarında azlık ve histolojik alt tiplerdeki farklılıklar genellemeyi zorlaştırmıştır. Gamallo ve ark., (1999) tarafından nükleer β -katenin ekspresyonunun epitelyal yumurtalık kanserinde iyi prognozun bir göstergesi olduğu ve yalnızca membranöz β -katenin ekspresyonuna sahip olanların, daha kötü prognoza sahip olduğu ifade edilmiştir. Yine, Kildal ve ark., (2005) ve Faleiro-Rodrigues ve ark., (2004) tarafından yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar bildirilmiştir. Lee ve ark., (2003) tarafından ise, nükleer β -katenin ekspresyonu ile HGSOc arasında istatistiksel

olarak anlamlı bir korelasyon olduğu ve hayatta kalma oranının azalması yönünde bir eğilim olduğu ifade edilmiştir.

Yumurtalık kanseri ile ilgili çalışmalarda en yaygın kullanılan hücre serisi (Barnes ve ark., 2020) olan SKOV-3'ün hangi epitelyal yumurtalık kanseri alt tipine ait olduğu, birincil literatür kaynağı olan ATCC tarafından belirtilmemiştir. Literatürde uzun süre HGSOE'nin bir örneği olduğu kabul edilmesine rağmen (Barnes ve ark., 2020; Parashar ve ark., 2022), Domcke ve ark., (2013), en yaygın yumurtalık kanseri türü olan HGSOE'nin birkaç özelliğini taşımakla birlikte bu alt tipe ait olmadığını bildirmiştir. Yine, Barnes ve ark., (2020) tarafından, SKOV-3'ün berrak hücreli yumurtalık kanserinde en sık mutasyona uğrayan üç protein olan PIK3CA, ARID1A ve TP53'te anormallikler barındırması nedeniyle aslında berrak hücrenin en tipik örneklerinden biri olabileceği ve berrak hücre olarak adlandırılmasının daha doğru olacağı ifade edilmektedir. SKOV-3 hücre serisinin hangi alt tipe ait olduğu tartışmalı olmakla birlikte endometrioid türe ait olmadığı görülmektedir.

SKOV-3 hücrelerinin seröz veya berrak hücreleri alt tipe dahil oluşu (Domcke ve ark., 2013; Barnes ve ark., 2020; Parashar ve ark., 2022), bu alt tiplerde *CTNNB1* mutasyonlarının nadir görülmesi (Dubeau, 2008) ve bu baskın anormal ekspresyon modelinin sitoplazmik β -katenin birikimi olduğu ve nükleer β -kateninin yumurtalık kanserindeki prognozla ilişkisinin tartışmalı oluşu (Gamallo ve ark., 1999; Lee ve ark., 2003; Faleiro-Rodrigues ve ark., 2004; Kildal ve ark., 2005), SKOV-3 hücrelerinde *CTNNB1* WT transfeksiyonu veya *CTNNB1* S33P, S45F ve T41A mutasyonlarına bağlı olarak β -katenin ekspresyonunun artışının paklitaksel cevabında herhangi bir değişime neden olmadığı yönündeki bulgularımızı desteklemektedir.

Meme ve yumurtalık kanseri tedavisinde, farklı moleküler belirteçlerin etkisi araştırılmakla birlikte, bu kanserlerin tedavisinde paklitaksel direncini öngören, kabul görmüş bir biyobelirteç henüz bulunmamaktadır. Paklitaksel tedavisinde dirençten sorumlu mutasyonları ve tedaviye duyarlı hastaların seçimini kolaylaştırabilecek yeni biyobelirteçleri belirlemek meme ve yumurtalık kanserlerinin tedavisi için oldukça önemlidir. Hücrel çoğalma ile ilişkili AKT1 ve β -katenin, ilaç direncine sebep olabilecek iki önemli proteindir. Bu proteinleri kodlayan genlerdeki spesifik bazı mutasyonlar, aktivite artışına sebep olduklarından direnç ile yakından ilişkili olabilirler.

Bu nedenle, aktivite artışına neden olan *AKT1* E17K, E49K ve L52R; *CTNNB1* S33P, S45F ve T41A mutasyonlarının paklitaksel direnci ile ilişkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda, ER(+), PR(+) ve HER2(-) olan MCF-7 hücre serisinde *AKT1* E17K ve E49K; *CTNNB1* S45F ve T41A mutasyonları paklitaksel direnci ile ilişkilendirilmiştir. Diğer yandan, üçlü negatif olan MDA-MB-231 hücre serisinde ise *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonları paklitaksel direnci ile ilişkilendirilirken *CTNNB1* mutasyonları ve paklitaksel direnci arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. Bulgularımız, ER(+), PR(+) ve HER2(-) profile sahip olan meme kanserli hastalarda *AKT1* E17K ve E49K; *CTNNB1* S45F ve T41A mutasyonlarının paklitaksel tedavisi öncesi önemli birer biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Üçlü negatif meme kanserli hastalarda ise *AKT1* E17K, E49K ve L52R mutasyonlarının paklitaksel tedavisine yön verebileceği ancak *CTNNB1* mutasyonlarının bu tedavi seçiminde önemli bir belirteç olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçların, yapılacak ileri klinik çalışmalarla desteklenerek meme kanserinde paklitaksel tedavisinin bireyselleştirilmesine olanak sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abraham, S.C., Reynolds, C., Lee, J.H., Montgomery, E.A., Baisden, B.L., Krasinskas, A.M. ve ark. (2002). Fibromatosis of the breast and mutations involving the APC/ β -catenin pathway. *Human Pathology*, **33**, 39-46.
- Abu Samaan, T.M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P. ve Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*, **9(12)**, 789.
- Adamovich, Y., Adler, J., Meltser, V., Reuven, N. ve Shaul, Y. (2014). AMPK couples p73 with p53 in cell fate decision. *Cell Death Differ*, **21(9)**, 1451-1459.
- Ahmed, F.Y., Wiltshaw, E., A'Hern, R.P., Nicol, B., Shepherd, J., Blake, S.P. ve ark. (1996). Natural history and prognosis of untreated stage I epithelial ovarian carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, **14(11)**, 2968-2975.
- Ajabnoor, G.M.A., Crook, T. ve Coley, H.M. (2012). Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, **3(1)**, e260.
- Al-Fageeh, M., Li, Q., Dashwood, W.M., Myzak, M.C. ve Dashwood, R.H. (2004). Phosphorylation and ubiquitination of oncogenic mutants of β -catenin containing substitutions at Asp32. *Oncogene*, **23**, 4839-4846.
- Alegria-Schaffer, A., Lodge, A. ve Vattem, K. (2009). Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods in Enzymology*, **463**, 573-599.
- Ali, S. ve Coombes, R.C. (2000). Estrogen receptor alpha in human breast cancer: Occurrence and significance. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **5**, 271-281.
- Alomar, S.Y., Mansour, L., Abuderman, A., Alkhuriji, A., Arafah, M., Alwasel, S. ve ark. (2016). β -Catenin accumulation and S33F mutation of CTNNB1 gene in colorectal cancer in Saudi Arabia. *Polish Journal of Pathology*, **67(2)**, 156-162.
- Alves, R.C., Fernandes, R.P., Eloy, J.O., Salgado, H.R.N. ve Chorilli, M. (2018). Characteristics, properties and analytical methods of paclitaxel: A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **48(2)**, 110-118.

Amaravadi, R.K., Yu, D., Lum, J.J., Bui, T., Christophorou, M.A., Evan, G.I. ve ark. (2007). Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, **117**(2), 326-336.

An, J., Woo, H.Y., Lee, Y., Kim, H.S., Jeong, J. ve Kim, S.K. (2021). Clinicopathological features of 70 desmoid-type fibromatoses confirmed by β -catenin immunohistochemical staining and CTNNB1 mutation analysis. *Plos ONE*, **16**(4), e0250619.

An, Z., Aksoy, O., Zheng, T., Fan, Q.W., Weiss ve W.A. (2018). Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: Signaling pathways and targeted therapies. *Oncogene*, **37**(12), 1561-1575.

Aono, D., Kometani, M., Asano, T., Konishi, S., Karashima, S., Ikeda, H. ve ark. (2022). A case of adrenocortical carcinoma diagnosed 9 years after the discovery of adrenal incidentaloma. *Endocrine Journal*, **69**(12), 1415-1421.

Arcaro, A. ve Guerreiro, A.S. (2007). The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: Genetic alterations and therapeutic implications. *Current Genomics*, **8**(5), 271-306.

Arjumand, W., Merry, C.D., Wang, C., Saba, E., McIntyre, J.B., Fang, S. ve ark. (2016). Phosphatidyl inositol-3 kinase (PIK3CA) E545K mutation confers cisplatin resistance and a migratory phenotype in cervical cancer cells. *Oncotarget*, **7**(50), 82424-82439.

Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M. ve ark. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, **66**, 15-23.

Asghari, F., Haghnava, N., Shanehbandi, D., Khaze, V., Baradaran, B. ve Kazemi, T. (2018). Differential altered expression of let-7a and miR-205 tumor-suppressor miRNAs in different subtypes of breast cancer under treatment with Taxol. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, **27**(7), 941-945

Askham, J.M., Platt, F., Chambers, P.A., Snowden, H., Taylor, C.F. ve Knowles, M.A. (2010). AKT1 mutations in bladder cancer: Identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K. *Oncogene*, **29**(1), 150-155.

- Asnaghi, L., Calastretti, A., Bevilacqua, A., D'Agnano, I., Gatti, G., Canti, G. ve ark. (2004). Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. *Oncogene*, **23(34)**, 5781-5791.
- Asproni, P., Millanta, F., Ressel, L., Podestà, F., Parisi, F., Vannozzi, I. ve Poli, A. (2021). An immunohistochemical study of the PTEN/AKT pathway involvement in canine and feline mammary tumors. *Animals*, **11(2)**, 365.
- Austinat, M., Dunsch, R., Wittekind, C., Tannapfel, A., Gebhardt, R. ve Gaunitz, F. (2008). Correlation between β -catenin mutations and expression of Wnt-signaling target genes in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, **7**, 21-30.
- Bachman, J. (2013). Site-directed mutagenesis. İçinde J.N. Abelson ve M.I. Simon (Ed.), *Methods in Enzymology*, 529, 241-248.
- Balakrishnan, A. ve Chaillet, J.R. (2013). Role of the inositol polyphosphate-4-phosphatase type II Inpp4b in the generation of ovarian teratomas. *Developmental Biology*, **373(1)**, 118-129.
- Baldini, N. (1997). Multidrug resistance—a multiplex phenomenon. *Nature Medicine*, **3(4)**, 378-380.
- Ban, K. ve Godellas, C. (2014). Epidemiology of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, **23**, 409-422.
- Banerji, A., Lax, T., Guyer, A., Hurwitz, S., Camargo, C.A. ve Long, A.A. (2014). Management of hypersensitivity reactions to Carboplatin and Paclitaxel in an outpatient oncology infusion center: A 5-year review. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, **2(4)**, 428-433.
- Barker, N. (2008). The canonical Wnt/ β -catenin signalling pathway. İçinde, E. Vincan (Ed.), *Pathway Methods and Mammalian Models*, New York: Springer; 5-15.
- Barnes, B.M., Nelson, L., Tighe, A., Morgan, R. D., McGrail, J. ve Taylor, S.S. (2020). Classification of ovarian cancer cell lines using transcriptional profiles defines the five major pathological subtypes. *BioRxiv*, 2020-07.
- Basu, A. ve Haldar, S. (2003). Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol-or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis. *FEBS Letters*, **538(1-3)**, 41-47.

- Basu, A., ve Lambring, C.B. (2021). Akt isoforms: A family affair in breast cancer. *Cancers*, **13(14)**, 3445.
- Bazira, P.J., Ellis, H., ve Mahadevan, V. (2022). Anatomy and physiology of the breast. *Surgery (Oxford)*, **40(2)**, 79-83.
- Beaver, J.A., Gustin, J.P., Yi, K.H., Rajpurohit, A., Thomas, M., Gilbert, S.F. ve ark. (2013). PIK3CA and AKT1 mutations have distinct effects on sensitivity to targeted pathway inhibitors in an isogenic luminal breast cancer model system. *Clinical Cancer Research*, **19(19)**, 5413-5422.
- Bhola, N. ve Arteaga, C. (2011). PD08-04: inhibition of the TGFb/ TGFbR2 pathway prevents enrichment of drug-resistant breast cancer stem cells by anti-cancer chemotherapy. *Cancer Research*, **71(24_Supplement)**, PD08-4-PD-4.
- Bi, R., Bai, Q.M., Yang, F., Wu, L.J., Cheng, Y.F., Shen, X.X. ve ark. (2015). Microcystic stromal tumour of the ovary: frequent mutations of β -catenin (CTNNB 1) in six cases. *Histopathology*, **67(6)**, 872-879.
- Bilic, J., Huang, Y.L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.M., Bienz, M. ve ark. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes disheveled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, **316**, 1619-1622.
- Bistoni, G. ve Farhadi, J. (2015). Anatomy and physiology of the breast. İçinde R.D. Farhadieh, N.W. Bulstrode ve S. Cugno (Ed.), *Plastic and Reconstructive Surgery: Approaches and techniques*. New Jersey: Wiley; 477-485.
- Biswas, D.K., Cruz, A.P., Gansberger, E. ve Pardee, A.B. (2000). Epidermal growth factor-induced nuclear factor κ B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97(15)**, 8542-8547.
- Björklund, P., Lindberg, D., Åkerström, G. ve Westin, G. (2008). Stabilizing mutation of CTNNB1/beta-catenin and protein accumulation analyzed in a large series of parathyroid tumors of Swedish patients. *Molecular Cancer*, **7**, 1-8.
- Blair, B.G., Bardelli, A. ve Park, B.H. (2014). Somatic alterations as the basis for resistance to targeted therapies. *The Journal of Pathology*, **232(2)**, 244-254.

Blume-Jensen, P. ve Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **41**, 355-365.

Bouvard, B., Chatelais, J., Soulié, P., Hoppé, E., Saulnier, P., Capitain, O. ve ark. (2018). Osteoporosis treatment and 10 years' oestrogen receptor+ breast cancer outcome in postmenopausal women treated with aromatase inhibitors. *European Journal of Cancer*, **101**, 87-94.

Boyd, L.R. ve Muggia, F.M. (2018). Carboplatin/paclitaxel induction in ovarian cancer: The finer points. *Oncology*, **32(8)**, 418-424

Brewer, H.R., Jones, M.E., Schoemaker, M.J., Ashworth, A. ve Swerdlow, A.J. (2017). Family history and risk of breast cancer: An analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Research and Treatment*, **165(1)**, 193-200.

Brewer, J.R., Morrison, G., Dolan, M.E. ve Fleming, G.F. (2016) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: Current status and progress. *Gynecologic Oncology*, **140(1)**, 176-183.

Brugge, J., Hung, M.C. ve Mills, G.B. (2007). A new mutational activation in the PI3K pathway. *Cancer Cell*, **12**, 104-107.

Burrell, R.A. ve Swanton, C. (2014). Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Molecular Oncology*, **8(6)**, 1095-1111.

Liu, C., Regimbald-Dumas, Y., Zhang, X. ve He. X. (2016). The Wnt/b-Catenin Pathway. *Encyclopedia of Cell Biology*, **3**, 86-97.

Cai, S.L., Tee, A.R., Short, J.D., Bergeron, J.M., Kim, J., Shen, J. ve ark. (2006). Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *The Journal of Cell Biology*, **173(2)**, 279-289.

Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B.A. ve ark. (2007). Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation *in vivo*. *PLOS Biology*, **5(4)**, e95.

Cameron, D., Piccart-Gebhart, M.J., Gelber, R.D., Procter, M., Goldhirsch, A., de Azambuja, E. ve ark. (2017). 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: Final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *The Lancet*, **389**, 1195-1205.

Cancer Genome Atlas Research Network. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, **474**(7353), 609-615.

Cao, Y.N., Zheng, L.L., Wang, D., Liang, X.X., Gao, F. ve Zhou, X.L. (2018). Recent advances in microtubule-stabilizing agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **143**, 806-828.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E. ve ark. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, **282**, 1318-1321.

Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M. ve ark. (2007). A transforming mutation in the plekstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, **448**, 439-444.

Catasús, L., Bussaglia, E., Rodríguez, I., Gallardo, A., Pons, C., Irving, J.A. ve ark. (2004). Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: Similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Human Pathology*, **35**(11), 1360-1368.

Caumanns, J.J., Berns, K., Wisman, G.B.A., Fehrman, R.S., Tomar, T., Klip, H. ve ark. (2018). Integrative kinome profiling identifies mTORC1/2 inhibition as treatment strategy in ovarian clear cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **24**(16), 3928-3940.

Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H. ve ark. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, **395**, 604-608.

Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A. ve ark. (2012). The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, **2**(5), 401-404.

Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J. ve ark. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine*, **364**(26), 2507-2516.

- Chautard, E., Ouédraogo, Z.G., Biau, J. ve Verrelle, P. (2014). Role of Akt in human malignant glioma: From oncogenesis to tumor aggressiveness. *Journal of Neuro-oncology*, **117**, 205-215.
- Chen, D., Lin, X., Zhang, C., Liu, Z., Chen, Z., Li, Z. ve ark (2018). Dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 as a promising therapeutic strategy against paclitaxel-resistant gastric cancer via targeting PI3K/ Akt/mTOR pathway. *Cell Death & Disease*, **9(2)**, 1-11.
- Chen, Y., Jacamo, R., Konopleva, M., Garzon, R., Croce, C. ve Andreeff, M. (2013). CXCR4 downregulation of let-7a drives chemoresistance in acute myeloid leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, **123(6)**, 2395-2407.
- Cho, K.R. ve Shih, I.M. (2009). Ovarian cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, **4**, 287-313.
- Chong, Z.X., Yeap, S.K. ve Ho, W.Y. (2021). Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ*, **9**, e11165.
- Cidado, J. ve Park, B.H. (2012). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway for breast cancer therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **17**, 205-216.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, **127(3)**, 469-480.
- Coffer, P.J., Jin, J. ve Woodgett, J.R. (1998). Protein kinase B (c-Akt): A multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical Journal*, **335**, 1-13.
- Cong, F. ve Varmus, H. (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101(9)**, 2882-2887.
- Corben, A.D. (2013). Pathology of invasive breast disease. *Surgical Clinics*, **93(2)**, 363-392.
- Coudreuse, D. ve Korswagen, H.C. (2007). The making of Wnt: New insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development*, **134(1)**, 3-12.
- Cresteil, T., Monsarrat, B., Dubois, J., Sonnier, M., Alvinerie, P. ve Gueritte, F. (2002). Regioselective metabolism of taxoids by human CYP3A4 and 2C8: Structure-activity relationship. *Drug Metabolism and Disposition*, **30(4)**, 438-445.

- Crettol, S., Petrovic, N. ve Murray, M. (2010). Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Current Pharmaceutical Design*, **16(2)**, 204-219.
- Daniels, D.L. ve Weis, W.I. (2005). β -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, **12(4)**, 364-371.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. ve Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91(2)**, 231-241.
- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stanek, P. ve ark. (2005). Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, **438**, 867-872.
- Davies, B.R., Guan, N., Logie, A., Crafter, C., Hanson, L., Jacobs, V. ve ark. (2015). Tumors with AKT1 E17K mutations are rational targets for single agent or combination therapy with AKT inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*, **14(11)**, 2441-2451.
- Davies, M.A. (2012). The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *The Cancer Journal*, **18(2)**, 142-147.
- de Jong, M.M., Nolte, I.M., te Meerman, G.J., van der Graaf, W.T., Oosterwijk, J.C., Kleibeuker, J. ve ark. (2002). Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *Journal of Medical Genetics*, **39(4)**, 225-242.
- De Marco, C., Malanga, D., Rinaldo, N., De Vita, F., Scrima, M., Lovisa, S. ve ark. (2015). Mutant AKT1-E17K is oncogenic in lung epithelial cells. *Oncotarget*, **6(37)**, 39634-39650.
- De Souza, J.A. ve Olopade, O.I. (2011). CYP2D6 genotyping and tamoxifen: An unfinished story in the quest for personalized medicine. *Seminars in Oncology*, **38(2)**, 263-273.
- Denkert, C. , Liedtke, C., Tutt, A. ve von Minckwitz, G. (2017). Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies. *Lancet*, **389**, 2430-2442.
- Derry, W.B., Wilson, L. ve Jordan, M.A. (1995). Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry*, **34(7)**, 2203-2211.

- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. ve Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Development*, **12**(22), 3499-3511.
- Dieterich, M., Stubert, J., Reimer, T., Erickson, N. ve Berling, A. (2014). Influence of lifestyle factors on breast cancer risk. *Breast Care*, **9**(6), 407-414.
- Do, H., Solomon, B., Mitchell, P.L., Fox, S.B. ve Dobrovic, A. (2008). Detection of the transforming AKT1 mutation E17K in non-small cell lung cancer by high resolution melting. *BMC Research Notes*, **1**(1), 1-5.
- Domcke, S., Sinha, R., Levine, D.A., Sander, C. ve Schultz, N. (2013). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature Communications*, **4**, 2126.
- Dong, C., Wu, J., Chen, Y., Nie, J. ve Chen, C. (2021). Activation of PI3K/AKT/mTOR pathway causes drug resistance in breast cancer. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, 628690.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K. ve Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(26), 15665-15670.
- Dranitsaris, G., Yu, B., King, J., Kaura, S. ve Zhang, A. (2015). Nab-paclitaxel, docetaxel, or solvent-based paclitaxel in metastatic breast cancer: A cost-utility analysis from a Chinese health care perspective. *ClinicoEconomics and Outcomes Research: CEOR*, **7**, 249-256.
- Du, F., Wu, X., Liu, Y., Wang, T., Qi, X., Mao, Y. ve ark. (2013). Acquisition of paclitaxel resistance via PI3K-dependent epithelial-mesenchymal transition in A2780 human ovarian cancer cells. *Oncology Reports*, **30**(3), 1113-1118.
- Dubeau, L. (2008). The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *The Lancet Oncology*, **9**(12), 1191-1197.
- Duffy, M.J. ve Crown, J. (2008). A personalized approach to cancer treatment: How biomarkers can help. *Clinical Chemistry*, **54**(11), 1770-1779.
- Dummler, B. ve Hemmings, B.A. (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochemical Society transactions*, **35**, 231-235.

- Ebell, M.H., Culp, M.B. ve Radke, T.J. (2016). A systematic review of symptoms for the diagnosis of ovarian cancer. *American Journal of Preventive Medicine*, **50(3)**, 384-394.
- Elies, A., Rivière, S., Pouget, N., Becette, V., Dubot, C., Donnadieu, A. ve ark. (2018). The role of neoadjuvant chemotherapy in ovarian cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, **18(6)**, 555-566.
- Fagotto, F., Gl ck, U. ve Gumbiner, B.M. (1998). Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Current Biology*, **8(4)**, 181-190.
- Faleiro-Rodrigues, C., Macedo-Pinto, I., Pereira, D. ve Lopes, C.S. (2004). Loss of beta-catenin is associated with poor survival in ovarian carcinomas. *International Journal of Gynecological Pathology*, **23(4)**, 337-346.
- Fan, Z., Cui, H., Yu, H., Ji, Q., Kang, L., Han, B. ve ark. (2016). MiR-125a promotes paclitaxel sensitivity in cervical cancer through altering STAT3 expression. *Oncogenesis*, **5(2)**, e197.
- Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H. ve Lu, Z. (2007). Phosphorylation of β -catenin by AKT promotes β -catenin transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, **282(15)**, 11221-11229.
- Fathalla, M.F. (1971). Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *The Lancet*, **2**, 163.
- Feng, Q., Li, X., Sun, W., Sun, M., Li, Z., Sheng, H., Xie, F. ve ark. (2020). Targeting G6PD reverses paclitaxel resistance in ovarian cancer by suppressing GSTP1. *Biochemical Pharmacology*, **178**, 114092.
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L. ve ark. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, **5(2)**, 77-106.
- Ferlini, C., Cicchillitti, L., Raspaglio, G., Bartollino, S., Cimitan, S., Bertucci, C. ve ark. (2009). Paclitaxel directly binds to Bcl-2 and functionally mimics activity of Nur77. *Cancer Research*, **69(17)**, 6906-6914.

- Ferlini, C., Raspaglio, G., Mozzetti, S., Distefano, M., Filippetti, F., Martinelli, E. ve ark. (2003). Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. *Molecular Pharmacology*, **64**(1), 51-58.
- Fernald, K. ve Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*, **23**(12), 620-633.
- Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R.G., Deutsch, M., Fisher, E.R. ve ark. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, **347**(16), 1233-1241.
- Fisher, B., Slack, N.H. ve Bross, I.D. (1969). Cancer of the breast: Size of neoplasm and prognosis. *Cancer*, **24**(5), 1071-1080.
- Fisher, R., Pusztai, L. ve Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: Implications for targeted therapeutics. *British Journal of Cancer*, **108**(3), 479-485.
- Flores, M.L., Castilla, C., Ávila, R., Ruiz-Borrego, M., Sáez, C. ve Japón, M.A. (2012). Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. *Breast Cancer Research and Treatment*, **133**(3), 917-928.
- Fodale, V., Pierobon, M., Liotta, L., ve Petricoin, E. (2011). Mechanism of cell adaptation: When and how do cancer cells develop chemoresistance? *Cancer Journal*, **17**(2), 89-95.
- Foulkes, W.D., Smith, I.E. ve Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, **363**(20), 1938-1948.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E. ve Cantley, L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annual Review of Biochemistry*, **67**(1), 481-507.
- Fus-Kujawa, A., Prus, P., Bajdak-Rusinek, K., Teper, P., Gawron, K., Kowalczyk, A. ve ark. (2021). An overview of methods and tools for transfection of eukaryotic cells *in vitro*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **9**, 701031.
- Gallego-Jara, J., Lozano-Terol, G., Sola-Martínez, R.A., Cánovas-Díaz, M. ve de Diego Puente, T. (2020). A compressive review about Taxol®: History and future challenges. *Molecules*, **25**(24), 5986.

- Gamallo, C., Palacios, J., Moreno, G., Calvo de Mora, J., Suárez, A. ve Armas, A. (1999). Beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas: Relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *The American Journal of Pathology*, **155**(2), 527-536.
- Gao, C., Wang, Y., Broaddus, R., Sun, L., Xue, F. ve Zhang, W. (2018). Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: A review. *Oncotarget*, **9**, 5492-5508.
- Garcia-Rostan, G., Tallini, G., Herrero, A., Thomas, G.D., Carcangiu, M.L. ve Rimm, D.L. (1999). Frequent mutation and nuclear localization of β -catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Research*, **59**, 1811-1815.
- Gaspar, C. ve Fodde, R. (2004). APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, **48**, 377-386.
- Gaspar, C., Franken, P., Molenaar, L., Breukel, C., van der Valk, M., Smits, R. ve ark. (2009). A targeted constitutive mutation in the APC tumor suppressor gene underlies mammary but not intestinal tumorigenesis. *PLoS Genetics*, **5**(7), e1000547.
- Gazitt, Y., Rothenberg, M.L., Hilsenbeck, S.G., Fey, V., Thomas, C. ve Montegomrey, W. (1998). Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells. *International Journal of Oncology*, **13**(4), 839-848.
- Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K. ve Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL: The drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*, **37**(13), 1590-1598.
- Geyer, F.C., Lacroix-Triki, M., Savage, K., Arnedos, M., Lambros, M.B., MacKay, A. ve ark. (2011). β -catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. *Modern Pathology*, **24**(2), 209-231.
- Gilmore, P.M., McCabe, N., Quinn, J.E., Kennedy, R.D., Gorski, J.J., Andrews, H.N. ve ark. (2004). BRCA1 interacts with and is required for paclitaxel-induced activation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3. *Cancer Research*, **64**(12), 4148-4154.
- Goff, B.A., Mandel, L., Muntz, H.G. ve Melancon, C.H. (2000). Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer*, **89**, 2068-2075.

Gondak, R.O., Mariano, F.V., de Sousa, S.F., de Siqueira, E.C., Díaz, K.P., Martins, L.A.L. ve ark. (2020). CTNNB1 and APC mutations in odontogenic carcinoma with dentinoid. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, **129**(5), 249-256.

Gordon, M.D. ve Nusse, R. (2006). Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(32), 22429-22433.

Gottesman, M.M. (1993). How cancer cells evade chemotherapy: Sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Research*, **53**(4), 747-754.

Gottesman, M.M., Lavi, O., Hall, M.D. ve Gillet, J.P. (2016). Toward a better understanding of the complexity of cancer drug resistance. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **56**, 85-102.

Groen, R.W., Oud, M.E., Schilder-Tol, E.J., Overdijk, M.B., ten Berge, D., Nusse, R. ve ark. (2008). Illegitimate WNT pathway activation by β -catenin mutation or autocrine stimulation in T-cell malignancies. *Cancer Research*, **68**, 6969-6977.

Growdon, W.B., Roussel, B.N., Scialabba, V.L., Foster, R., Dias-Santagata, D., Iafrate, A.J. ve ark. (2011). Tissue-specific signatures of activating PIK3CA and RAS mutations in carcinosarcomas of gynecologic origin. *Gynecologic Oncology*, **121**(1), 212-217.

Gu, L., Li, Q., Liu, H., Lu, X. ve Zhu, M. (2020) Long noncoding RNA TUG1 promotes autophagy-associated paclitaxel resistance by sponging miR-29b-3p in ovarian cancer cells. *OncoTargets and Therapy*, **13**, 2007-2019.

Guan, K.L., Figueroa, C., Brtva, T.R., Zhu, T., Taylor, J., Barber, T.D. ve Vojtek, A.B. (2000). Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(35), 27354-27359.

Guo, G., Qiu, X., Wang, S., Chen, Y., Rothman, P.B., Wang, Z. ve ark. (2010). Oncogenic E17K mutation in the plekstrin homology domain of AKT1 promotes v-Abl-mediated pre-B-cell transformation and survival of Pim-deficient cells. *Oncogene*, **29**, 3845-3853.

Guo, L., Yilamu, D., Sun, L., Liu, S. ve Ma, F. (2015). Association among the expression of β -catenin, cyclin D1 and estrogen receptor- β in human breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **10(4)**, 1423-1428.

Gupta, N., Schmitt, F., Grebhardt, S. ve Mayer, D. (2011). β -catenin is a positive regulator of estrogen receptor- α function in breast cancer cells. *Cancers*, **3(3)**, 2990-3001.

Hagen, T. (2009). Characterization of the interaction between latency-associated nuclear antigen and glycogen synthase kinase 3 β . *Journal of Virology*, **83**, 6312-6317.

Haldar, S., Chintapalli, J. ve Croce, C. M. (1996). Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Research*, **56(6)**, 1253-1255.

Halestrap, A.P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **46(6)**, 821-831.

Haller, F., Bieg, M., Moskalev, E.A., Barthelmeß, S., Geddert, H., Boltze, C. ve ark. (2015). Recurrent mutations within the amino-terminal region of β -catenin are probable key molecular driver events in sinonasal hemangiopericytoma. *The American Journal of Pathology*, **185(2)**, 563-571.

Hamada, S., Futamura, N., Ikuta, K., Urakawa, H., Kozawa, E., Ishiguro, N. ve Nishida, Y. (2014). CTNNB1 S45F mutation predicts poor efficacy of meloxicam treatment for desmoid tumors: A pilot study. *Plos ONE*, **9(5)**, e96391.

Hammond, M.E.H, Hayes, D.F., Dowsett, M., Allred, D.C., Hagerty, K.L., Badve, S. ve ark. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **134(7)**, e48-e72.

Hanahan, D. ve Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, **100(1)**, 57-70.

Hanrahan, A.J., Schultz, N., Westfal, M.L., Sakr, R.A., Giri, D.D., Scarperi, S. ve ark. (2012). Genomic complexity and AKT dependence in serous ovarian cancer. *Cancer Discovery*, **2(1)**, 56-67.

Haque, M.M. ve Desai, K.V. (2019). Pathways to endocrine therapy resistance in breast cancer. *Frontiers in Endocrinology*, **10**, 573.

Hasbal-Celikok, G., Aksoy-Sagirli, P., Altiparmak-Ulbegi, G. ve Can, A. (2021). Identification of AKT1/ β -catenin mutations conferring cetuximab and chemotherapeutic drug resistance in colorectal cancer treatment. *Oncology Letters*, **21(3)**, 1-10.

Hayes, M.J., Thomas, D., Emmons, A., Giordano, T.J. ve Kleer, C.G. (2008). Genetic changes of Wnt pathway genes are common events in metaplastic carcinomas of the breast. *Clinical Cancer Research*, **14(13)**, 4038-4044.

Heintz, A.P.M., Odicino, F., Maisonneuve, P., Quinn, M.A., Benedet, J.L., Creasman, W.T. ve ark. (2006). Carcinoma of the ovary. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, **95**, 161-192.

Hennessy, B.T., Gonzalez-Angulo, A.M., Stemke-Hale, K., Gilcrease, M.Z., Krishnamurthy, S., Lee, J.S. ve ark. (2009). Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Research*, **69**, 4116-4124.

Hinz, N. ve Jücker, M. (2019). Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: A comprehensive review. *Cell Communication and Signaling*, **17**, 1-29.

Hirst, J., Crow, J. ve Godwin, A. (2018). Ovarian cancer genetics: Subtypes and risk factors. İçinde O. Devaja ve A. Papadopoulos (Ed.), *Ovarian Cancer-From Pathogenesis to Treatment*. London, IntechOpen 1.pp. 3-20

Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B. ve Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, **13(10)**, 714-726.

Hoppler, S. ve Kavanagh, C.L. (2007). Wnt signalling: variety at the core. *Journal of Cell Science*, **120(3)**, 385-393.

Howe, L.R. ve Brown, A.M. (2004). Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **3(1)**, 36-41.

Huang, J., Chan, W.C., Ngai, C.H., Lok, V., Zhang, L., Lucero-Prisno III, D.E. ve ark. (2022). Worldwide burden, risk factors, and temporal trends of ovarian cancer: A global study. *Cancers*, **14(9)**, 2230.

Huang, L., Hu, C., Chao, H., Wang, R., Lu, H., Li, H. ve ark. (2019). miR-29c regulates resistance to paclitaxel in nasopharyngeal cancer by targeting ITGB1. *Experimental Cell Research*, **378(1)**, 1-10.

Huang, W.C., Chen, C.L., Lin, Y.S. ve Lin, C.F. (2011). Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. *Journal of Lipids*, **2011**, 565316.

Huang, Y., Ray, S., Reed, J.C., Ibrado, A.M., Tang, C., Nawabi, A. ve Bhalla, K. (1997). Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, **42**, 73-81.

Huguet, E.L., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Bicknell, R. ve Harris, A.L. (1994). Differential expression of human Wnt genes 2,3,4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Research*, **54(10)**, 2615-2621.

Huss, S., Nehles, J., Binot, E., Wardelmann, E., Mittler, J., Kleine, M.A. ve ark. (2013). β -Catenin (CTNNB1) mutations and clinicopathological features of mesenteric desmoid-type fibromatosis. *Histopathology*, **62(2)**, 294-304.

Hyman, D.M. Smyth, L.M., Donoghue, M.T.A., Westin, S.N., Bedard, P.L., Dean, E.J. ve ark. (2017). AKT inhibition in solid tumors with AKT1 mutations. *Journal of Clinical Oncology*, **35(20)**, 2251-2259.

Ibrado, A.M., Liu, L. ve Bhalla, K. (1997). Bcl-xL overexpression inhibits progression of molecular events leading to paclitaxel-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia HL-60 cells. *Cancer Research*, **57(6)**, 1109-1115.

Ikeda, T., Yoshinaga, K., Semba, S., Kondo, E., Ohmori, H. ve Horii, A. (2000). Mutational analysis of the CTNNB1 (beta-catenin) gene in human endometrial cancer: Frequent mutations at codon 34 that cause nuclear accumulation. *Oncology Reports*, **7(2)**, 323-326.

Javanmard, D., Najafi, M., Babaei, M.R., Karbalaie Niya, M.H., Esghaei, M., Panahi, M. ve ark. (2020). Investigation of CTNNB1 gene mutations and expression in hepatocellular carcinoma and cirrhosis in association with hepatitis B virus infection. *Infectious Agents and Cancer*, **15(1)**, 1-10.

Javeed, A., Ashraf, M., Riaz, A., Ghafoor, A., Afzal, S. ve Mukhtar, M.M. (2009). Paclitaxel and immune system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **38(4)**, 283-290.

- Jayson, G.C., Kohn, E.C., Kitchener, H.C. ve Ledermann, J.A. (2014) Ovarian cancer. *Lancet*, **384**, 1376-1388.
- Jervis, S., Song, H., Lee, A., Dicks, E., Tyrer, J., Harrington, P. ve ark. (2014). Ovarian cancer familial relative risks by tumour subtypes and by known ovarian cancer genetic susceptibility variants. *Journal of Medical Genetics*, **51(2)**, 108-113.
- Jiang, J. ve Struhl, G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wntless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature*, **391**, 493-496.
- Jiao, D. ve Yang, S. (2020). Overcoming Resistance to Drugs Targeting *KRAS*G12C Mutation. *Innovation*, **1(2)**, 100035.
- Johnson, K.B., Sharma, A., Henry, N.L., Wei, M., Bie, B., Hershberger, C.E. ve ark. (2023). Genetic variations that influence paclitaxel pharmacokinetics and intracellular effects that may contribute to chemotherapy-induced neuropathy: A narrative review. *Frontiers in Pain Research*, **4**, 1139883.
- Jonckheere, S., Adams, J., De Groote, D., Campbell, K., Berx, G. ve Goossens, S. (2022). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) as a therapeutic target. *Cells Tissues Organs*, **211(2)**, 157-182.
- Jordan, M.A. ve Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, **4(4)**, 253-265.
- Joshi, H. ve Press, M.F. (2018). Molecular oncology of breast cancer. İçinde K.I. Bland, E.M. Copeland, V.S. Klimberg ve W.J. Gradishar (Ed.), *The Breast*. Philadelphia: Elsevier; 282-307.
- Jung, S.H., Kim, M.S., Lee, S.H., Park, H.C., Choi, H.J., Maeng, L. ve ark. (2016). Whole-exome sequencing identifies recurrent AKT1 mutations in sclerosing hemangioma of lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113(38)**, 10672-10677.
- Kannampuzha, S. ve Gopalakrishnan, A.V. (2023). Cancer chemoresistance and its mechanisms: Associated molecular factors and its regulatory role. *Medical Oncology*, **40(9)**, 264.

Kasai, S., Sasaki, T., Watanabe, A., Nishiya, M., Yasuhira, S., Shibasaki, M. ve Maesawa, C. (2017). Bcl-2/Bcl-x_L inhibitor ABT-737 sensitizes pancreatic ductal adenocarcinoma to paclitaxel-induced cell death. *Oncology Letters*, **14(1)**, 903–908.

Kashii, Y., Uchida, M., Kirito, K., Tanaka, M., Nishijima, K., Toshima, M. ve ark. (2000). A member of Forkhead family transcription factor, FKHL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood*, **96(3)**, 941-949.

Kavallaris, M., Kuo, D.Y., Burkhart, C.A., Regl, D.L., Norris, M.D., Haber, M. ve ark. (1997). Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *The Journal of Clinical Investigation*, **100(5)**, 1282-1293.

Ke, X. ve Shen, L. (2017). Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future prospect. *Frontiers in Laboratory Medicine*, **1(2)**, 69-75.

Khramtsov, A.I., Khramtsova, G.F., Tretiakova, M., Huo, D., Olopade, O.I. ve Goss, K.H. (2010). Wnt/ β -catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *American Journal of Pathology*, **176(6)**, 2911-2920.

Kildal, W., Risberg, B., Abeler, V.M., Kristensen, G.B., Sudbø, J., Nesland, J.M. ve ark. (2005). Beta-catenin expression, DNA ploidy and clinicopathological features in ovarian cancer: a study in 253 patients. *European Journal of Cancer*, **41(8)**, 1127-1134.

Kim, A.H., Khursigara, G.U.S., Sun, X., Franke, T.F. ve Chao, M.V. (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and Cellular Biology*, **21(3)**, 893-901.

Kim, M.S., Jeong, E.G., Yoo, N.J. ve Lee, S.H. (2008). Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *British Journal of Cancer*, **98(9)**, 1533-1535.

Kim, S. ve Jeong, S. (2019). Mutation hotspots in the β -catenin gene: Lessons from the human cancer genome databases. *Molecules and Cells*, **42(1)**, 8.

Kim, S.H., Juhn, Y.S. ve Song, Y.S. (2007). Akt involvement in paclitaxel chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1095(1)**, 82-89.

Kim, S.J., Rosen, B., Fan, I., Ivanova, A., McLaughlin, J.R., Risch, H., Narod, S.A. ve Kotsopoulos, J. (2017). Epidemiologic factors that predict long-term survival following a diagnosis of epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, **116**(7), 964-971.

Kim, T.K. ve Eberwine, J.H. (2010). Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**, 3173-3178.

Kimelman, D. ve Xu, W. (2006). β -Catenin destruction complex: Insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, **25**(57), 7482-7491.

King, C.R., Kraus, M.H. ve Aaronson, S.A. (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*, **229**, 974-976.

Krishna, A., Meynert, A., Kelder, M., Ewing, A., Sheraz, S., Ferrer-Vacquer, A. ve ark. (2023). Mutational scanning reveals oncogenic CTNNB1 mutations have diverse effects on signalling and clinical traits. *BioRxiv*, 2023-11.

Krishnamurthy, N. ve Kurzrock, R. (2018). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*, **62**, 50-60.

Kuchenbaecker, K.B., Hopper, J.L., Barnes, D.R., Phillips, K.A., Mooij, T.M., Roos-Blom, M.J. ve ark. (2017). Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Jama*, **317**(23), 2402-2416.

Kumar, S., Mahdi, H., Bryant, C., Shah, J. P., Garg, G. ve Munkarah, A. (2010). Clinical trials and progress with paclitaxel in ovarian cancer. *International Journal of Women's Health*, **2**, 411-427.

Kuroki, L. ve Guntupalli, S.R. (2020). Treatment of epithelial ovarian cancer. *British Medical Journal*, **371**, m3773.

Kyung, H.Y., Axtmayer, J., Gustin, J.P., Rajpurohit, A. ve Lauring, J. (2013). Functional analysis of non-hotspot AKT1 mutants found in human breast cancers identifies novel driver mutations: implications for personalized medicine. *Oncotarget*, **4**(1), 29.

Li Y., Chen, K., Li, L., Li, R., Zhang, J. ve Ren, W. (2015). Overexpression of SOX2 is involved in paclitaxel resistance of ovarian cancer via the PI3K/Akt pathway. *Tumour biology: The Journal of The International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, **36**(12), 9823-9828.

- Laird, A.K. (1964). Dynamics of tumour growth. *British Journal of Cancer*, **18**(3), 490.
- Lauring, J., Park, B.H. ve Wolff, A.C. (2013). The phosphoinositide-3-kinase-Akt mTOR pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, **11**(6), 670-678.
- Lecarpentier, Y., Schussler, O., Hébert, J.L. ve Vallée, A. (2019). Multiple targets of the canonical WNT/ β -catenin signaling in cancers. *Frontiers in Oncology*, **9**, 1248.
- Lee, C.I., Hsu, M.Y., Chou, C.H., Wang, C., Lo, Y.S., Loh, J.K. ve ark. (2009). CTNNB1 (β -catenin) mutation is rare in brain tumours but involved as a sporadic event in a brain metastasis. *Acta Neurochirurgica*, **151**, 1107-1111.
- Lee, C.M., Shvartsman, H., Deavers, M.T., Wang, S.C., Xia, W., Schmandt, R. ve ark. (2003). Beta-catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma. *Gynecologic Oncology*, **88**(3), 363-368.
- Lee, Y., Na, J., Lee, M.S., Cha, E.Y., Sul, J.Y., Park, J.B. ve ark. (2018). Combination of pristimerin and paclitaxel additively induces autophagy in human breast cancer cells via ERK1/2 regulation. *Molecular Medicine Reports*, **18**(5), 4281-4288.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**(3), 323-331.
- Lévy, L., Neuveut, C., Renard, C.A., Charneau, P., Branchereau, S., Gauthier, F. ve ark. (2002). Transcriptional activation of interleukin-8 by β -catenin-Tcf4. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 42386-42393.
- Li, Y., Chen, K., Li, L., Li, R., Zhang, J. ve Ren, W. (2015). Overexpression of SOX2 is involved in paclitaxel resistance of ovarian cancer via the PI3K/Akt pathway. *Tumor Biology*, **36**, 9823–9828.
- Li, D., Zhao, L.N., Zheng X.L., Lin, P., Lin, F., Li, Y. ve ark. (2014). Sox2 is involved in paclitaxel resistance of the prostate cancer cell line PC-3 via the PI3K/Akt pathway. *Molecular Medicine Reports*, **10**(6), 3169-3176.
- Li, G., Xu, D., Sun, J., Zhao, S. ve Zheng, D. (2020). Paclitaxel inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by blocking activation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Advances in Clinical & Experimental Medicine*, **29**(11), 1337-1345.

- Li, J., Zhang, Y., Zhao, J., Kong, F. ve Chen, Y. (2011). Overexpression of miR-22 reverses paclitaxel-induced chemoresistance through activation of PTEN signaling in p53-mutated colon cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **357**, 31-38.
- Li, S., Li, S., Sun, Y. ve Li, L. (2014). The expression of β -catenin in different subtypes of breast cancer and its clinical significance. *Tumor Biology*, **35**, 7693-7698.
- Liang, K., Lu, Y., Li, X., Zeng, X., Glazer, R.I., Mills, G.B. ve Fan, Z. (2006). Differential roles of phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and akt1 expression and phosphorylation in breast cancer cell resistance to Paclitaxel, Doxorubicin, and gemcitabine. *Molecular Pharmacology*, **70(3)**, 1045-1052.
- Lin, B., Kolluri, S.K., Lin, F., Liu, W., Han, Y.H., Cao, X. ve ark. (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, **116(4)**, 527-540.
- Lin, H.L., Liu, T.Y., Chau, G.Y., Lui, W.Y. ve Chi, C.W. (2000). Comparison of 2-methoxyestradiol-induced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species. *Cancer*, **89(5)**, 983-994.
- Lin, S.Y., Xia, W., Wang, J.C., Kwong, K.Y., Spohn, B., Wen, Y., Pestell, R.G. ve Hung, M.C. (2000). Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97(8)**, 4262-4266.
- Liu, C., Regimbald-Dumas, Y., Zhang, X. ve He, X. (2016). The Wnt/b-Catenin Pathway. *Encyclopedia of Cell Biology*, **3**, 86-97.
- Lin, Y.H., Chen, B.Y.H., Lai, W.T., Wu, S.F., Guh, J.H., Cheng, A.L. ve ark. (2015). The Akt inhibitor MK-2206 enhances the cytotoxicity of paclitaxel (Taxol) and cisplatin in ovarian cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **388**, 19-31.
- Linnerth-Petrik, N.M., Santry, L.A., Moorehead, R., Juecker, M., Wootton, S.K. ve Petrik, J. (2016). Akt isoform specific effects in ovarian cancer progression. *Oncotarget*, **7(46)**, 74820.
- Linnerth-Petrik, N.M., Santry, L.A., Petrik, J.J. ve Wootton, S.K. (2014). Opposing functions of Akt isoforms in lung tumor initiation and progression. *Plos ONE*, **9(4)**, e94595.

- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y. ve ark. (2002). Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, **108**(6), 837-847.
- Liu, H., Tekle, C., Chen, Y.W., Kristian, A., Zhao, Y., Zhou, M. ve ark. (2011). B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation. *Molecular Cancer Therapeutics*, **10**(6), 960-971.
- Liu, J.R., Fletcher, B., Page, C., Hu, C., Nunez, G. ve Baker, V. (1998). Bcl-xL is expressed in ovarian carcinoma and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Gynecologic Oncology*, **70**(3), 398-403.
- Liu, R., Chen, Y., Liu, G., Li, C., Song, Y., Cao, Z. ve ark. (2020). PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death & Disease*, **11**(9), 797.
- Liu, W., Gu, J., Qi, J., Zeng, X.N., Ji, J., Chen Z.Z. ve ark. (2015). Lentinan exerts synergistic apoptotic effects with paclitaxel in A549 cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **19**(8), 1949-1955.
- Logan, C.Y. ve Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **20**, 781-810.
- Lu, S., Deng, R., Jiang, H., Song, H., Li, S., Shen, Q. ve ark. (2015). The mechanism of ATP-dependent allosteric protection of Akt kinase phosphorylation. *Structure*, **23**, 1725-1734.
- Luo, D., Cheng, S. C., Xie, H. ve Xie, Y. (2000). Effects of Bcl-2 and Bcl-XL protein levels on chemoresistance of hepatoblastoma Hepg2 cell line. *Biochemistry and Cell Biology*, **78**, 119-126.
- Luqmani, Y.A. (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Medical Principles and Practice*, **14**, 35-48.
- Lynch, H.T., Snyder, C.L., Shaw, T.G., Heinen, C.D. ve Hitchins, M.P. (2015). Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nature Reviews Cancer*, **15**(3), 181-194.
- Mabuchi, S., Kuroda, H., Takahashi, R. ve Sasano, T. (2015). The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, **137**(1), 173-179.

- MacDonald, B.T., Tamai, K. ve He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, **17(1)**, 9-26.
- Machin, P., Catusus, L., Pons, C., Muñoz, J., Matias-Guiu, X. ve Prat, J. (2002). CTNNB1 mutations and β -catenin expression in endometrial carcinomas. *Human Pathology*, **33(2)**, 206-212.
- Magné, N., Toillon, R.A., Bottero, V., Didelot, C., Van Houtte, P., Gérard, J.P. ve ark. (2006). NF- κ B modulation and ionizing radiation: Mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Letters*, **231(2)**, 158-168
- Mahadevan, D., Powis, G., Mash, E.A., George, B., Gokhale, V.M., Zhang, S. ve ark. (2008). Discovery of a novel class of AKT plekstrin homology domain inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*, **7(9)**, 2621-2632.
- Maloney, S.M., Hoover, C.A., Morejon-Lasso, L.V. ve Prosperi, J.R. (2020). Mechanisms of taxane resistance. *Cancers*, **12(11)**, 3323.
- Manfioletti, G. ve Fedele, M. (2023). Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT). *International Journal of Molecular Sciences*, **24(14)**, 11386.
- Manning, B.D. ve Toker, A. (2017). AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*, **169(3)**, 381-405.
- Margolin, D.A., Silinsky, J., Grimes, C., Spencer, N., Aycock, M., Green, H. ve ark. (2011). Lymph node stromal cells enhance drug-resistant colon cancer cell tumor formation through SDF-1 α /CXCR4 paracrine signaling. *Neoplasia*, **13(9)**, 874-886.
- Maroulakou, I.G., Oemler, W., Naber, S.P. ve Tschlis, P.N. (2007). Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Research*, **67(1)**, 167-177.
- Marsh, D.J., Kum, J.B., Lunetta, K.L., Bennett, M.J., Gorlin, R.J., Ahmed, S.F. ve ark. (1999). PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Human Molecular Genetics*, **8(8)**, 1461-1472.

- Marupudi, N.I., Han, J.E., Li, K.W., Renard, V.M., Tyler, B.M. ve Brem, H. (2007). Paclitaxel: A review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opinion on Drug Safety*, **6(5)**, 609-621.
- Matulonis, U.A., Sood, A.K., Fallowfield, L., Howitt, B.E., Sehouli, J. ve Karlan, B.Y. (2016). Ovarian cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, **2(1)**, 1-22.
- Mayo, L.D. ve Donner, D.B. (2002). The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor–oncoprotein network. *Trends in Biochemical Sciences*, **27(9)**, 462-467.
- McDonald, K.A., Kawaguchi, T., Qi, Q., Peng, X., Asaoka, M., Young, J. ve ark. (2019). Tumor heterogeneity correlates with less immune response and worse survival in breast cancer patients. *Annals of Surgical Oncology*, **26**, 2191-2199.
- McGranahan, N. ve Swanton, C. (2017). Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell*, **168(4)**, 613-628.
- Meads, M.B., Gatenby, R.A. ve Dalton, W.S. (2009). Environment-mediated drug resistance: A major contributor to minimal residual disease. *Nature Reviews Cancer*, **9(9)**, 665-674.
- Tan, M.H., Mester, J.L., Ngeow, J., Rybicki, L.A., Orloff, M.S. ve Eng, C. (2012). Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clinical Cancer Research*, **18(2)**, 400-407.
- Mineo, C., Yuhanna, I.S., Quon, M.J. ve Shaul, P.W. (2003). High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *Journal of Biological Chemistry*, **278(11)**, 9142-9149.
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S. ve Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *International journal of Women's Health*, **11**, 287-299.
- Morana, O., Wood, W. ve Gregory, C.D. (2022). The apoptosis paradox in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **23(3)**, 1328.
- Moreno-Bueno, G., Gamallo, C., Pérez-Gallego, L., de Mora, J.C., Suárez, A. ve Palacios, J. (2001). Beta-Catenin expression pattern, beta-catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas. *Diagnostic Molecular*, **10(2)**, 116-122.

- Morgan, C., Tillett, T., Braybrooke, J. ve Ajithkumar, T. (2011). Management of uncommon chemotherapy-induced emergencies. *The Lancet Oncology*, **12(8)**, 806-814.
- Mori, M., Harabuchi, I., Miyake, H., Casagrande, J.T., Henderson, B.E. ve Ross, R.K. (1988). Reproductive, genetic, and dietary risk factors for ovarian cancer. *American Journal of Epidemiology*, **128(4)**, 771-777.
- Mukherjee, N. ve Panda, C.K. (2020). Wnt/ β -catenin signaling pathway as chemotherapeutic target in breast cancer: An update on pros and cons. *Clinical Breast Cancer*, **20(5)**, 361-370
- Mullany, L.K., Wong, K.K., Marciano, D.C., Katsonis, P., King-Crane, E.R., Ren, Y. ve ark. (2015). Specific tp53 mutants overrepresented in ovarian cancer impact CNV, TP53 activity, responses to nutlin-3a, and cell survival. *Neoplasia*, **17(10)**, 789-803.
- Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D. ve Papadimitriou, C. (2012). Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treatment Reviews*, **38(7)**, 890-903.
- Nadji, M., Gomez-Fernandez, C., Ganjei-Azar, P. ve Morales, A.R. (2005). Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *American Journal of Clinical Pathology*, **123(1)**, 21-27.
- Nagai, K., Mizukami, Y., Omori, Y., Kin, T., Yane, K., Takahashi, K. ve ark. (2020). Metachronous intraductal papillary mucinous neoplasms disseminate via the pancreatic duct following resection. *Modern Pathology*, **33(5)**, 971-980.
- Narod, S.A. ve Salmena, L. (2011). BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. *Discovery Medicine*, **12(66)**, 445-453.
- National Cancer Institute. (2018). Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer stat facts: ovarian cancer. Eriřim: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>. (30.12.2018).
- National Comprehensive Cancer Network. Ovarian cancer: including fallopian tube cancer and primary peritoneal cancer. Eriřim: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/ovarian.pdf. (15.11.2018).

- Neophytou, C.M., Trougakos, I.P., Erin, N. ve Papageorgis, P. (2021). Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance. *Cancers*, **13(17)**, 4363.
- Nguyen, V.H.L., Hough, R., Bernaudo, S. ve Peng, C. (2019). Wnt/ β -catenin signalling in ovarian cancer: Insights into its hyperactivation and function in tumorigenesis. *Journal of Ovarian Research*, **12**, 1-17.
- Nicholson, K.M. ve Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*, **14(5)**, 381-395.
- Nikolic, V., Savic, I., Savic, I., Nikolic, L., Stankovic, M. ve Marinkovic, V. (2011). Paclitaxel as an anticancer agent: isolation, activity, synthesis and stability. *Open Medicine*, **6(5)**, 527-536.
- Noguchi S. (2006). Predictive factors for response to docetaxel in human breast cancers. *Cancer Science*, **97(9)**, 813-820.
- Noorolyai, S., Shajari, N., Baghbani, E., Sadreddini, S. ve Baradaran, B. (2019). The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer. *Gene*, **698**, 120-128.
- Nooter, K., Brutel De La Riviere, G., Look, M.P., Van Wingerden, K.E., Henzen-Logmans, S.C., Scheper, R.J. ve ark. (1997). The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *British Journal of Cancer*, **76(4)**, 486-493.
- Norkowski, E., Masliah-Planchon, J., Le Guellec, S., Trassard, M., Courrèges, J.B., Charron-Barra, C. ve ark. (2020). Lower rate of CTNNB1 mutations and higher rate of APC mutations in desmoid fibromatosis of the breast: A series of 134 tumors. *The American Journal of Surgical Pathology*, **44(9)**, 1266-1273.
- Norquist, B.M., Harrell, M.I., Brady, M.F., Walsh, T., Lee, M.K., Gulsuner, S. ve ark. (2016). Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncology*, **2(4)**, 482-490.
- Norton, L. ve Simon, R. (1977). Growth curve of an experimental solid tumor following radiotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, **58(6)**, 1735-1741.
- Norton, L., Simon, R., Brereton, H.D. ve Bogden, A.E. (1976). Predicting the course of Gompertzian growth. *Nature*, **264**, 542-545.

Noske, A., Kaszubiak, A., Weichert, W., Sers, C., Niesporek, S., Koch, I. ve ark. (2007). Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: increased expression of AKT in advanced ovarian cancer. *Cancer Letters*, **246**, 190-200.

O'Sullivan, C.C., Loprinzi, C.L. ve Haddad, T.C. (2018). Updates in the evaluation and management of breast cancer. *Mayo Clinic Proceedings*, **93(6)**, 794-807.

Ogretmen, B. ve Safa, A.R. (1996). Down-regulation of apoptosis-related bcl-2 but not bcl-xL or bax proteins in multidrug-resistant MCF-7/Adr human breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, **67(5)**, 608-614.

Orsi, N.M., Baskind, N.E. ve Cummings, M. (2014). Anatomy, development, histology, and normal function of the ovary. İçinde N. Wilkinson (Ed.), *Pathology of the Ovary, Fallopian Tube and Peritoneum*. Berlin: Siproinger; 1-32.

Ortiz, M., Wabel, E., Mitchell, K. ve Horibata, S. (2022). Mechanisms of chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Cancer Drug Resistance*, **5(2)**, 304.

Osaki, M., Oshimura, M. ve Ito, H. (2004). PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, **9(6)**, 667-676.

Osborne, C.K. ve Schiff, R. (2011). Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annual Review of Medicine*, **62**, 233-247.

Oulès, B., Mourah, S., Baroudjian, B., Jouenne, F., Delyon, J., Louveau, B. ve ark. (2022). Clinicopathologic and molecular characterization of melanomas mutated for CTNNB1 and MAPK. *Virchows Archiv*, **480(2)**, 475-480.

Ozaki, T. ve Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers*, **3(1)**, 994-1013.

Palacios, J. ve Gamallo, C. (1998). Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Research*, **58(7)**, 1344-1347.

Palmberg, C., Koivisto, P., Hyylinen, E., Isola, J., Visakorpi, T., Kallioniemi, O.P. ve ark. (1997). Androgen receptor gene amplification in a recurrent prostate cancer after monotherapy with the nonsteroidal potent antiandrogen Casodex (bicalutamide) with a subsequent favorable response to maximal androgen blockade. *European Urology*, **31(2)**, 216-219.

- Papadopoulos, E.I. ve Scorilas, A. (2015). Cisplatin and paclitaxel alter the expression pattern of mir-143/145 and mir-183/96/182 clusters in t24 bladder cancer cells. *Clinical and Translational Science*, **8(6)**, 668-675.
- Parashar, D., Geethadevi, A., Mittal, S., McAlarnen, L.A., George, J., Kadamberi, I.P. ve ark. (2022). Patient-derived ovarian cancer spheroids rely on PI3K-AKT signaling addiction for cancer stemness and chemoresistance. *Cancers*, **14(4)**, 958.
- Parikh, C., Janakiraman, V., Wu, W.I., Foo, C.K., Kljavin, N.M., Chaudhuri, S. ve ark. (2012). Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109(47)**, 19368-19373.
- Park, S.Y., Kim, M.J., Park, S.A., Kim, J.S., Min, K.N., Kim, D.K. ve ark. (2015). Combinatorial TGF- β attenuation with paclitaxel inhibits the epithelial-to-mesenchymal transition and breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*, **6(35)**, 37526-37543.
- Parness, J. ve Horwitz, S.B. (1981). Taxol binds to polymerized tubulin *in vitro*. *The Journal of Cell Biology*, **91(2)**, 479-487.
- Parr, B.A. ve McMahon, A.P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature*, **395**, 707-710.
- Parrondo, R., de Las Pozas, A., Reiner, T. ve Perez-Stable, C. (2013). ABT-737, a small molecule Bcl-2/Bcl-xL antagonist, increases antimitotic-mediated apoptosis in human prostate cancer cells. *PeerJ*, **1**, e144.
- Patch, A.M., Christie, E.L., Etemadmoghadam, D., Garsed, D.W., George, J., Fereday, S. ve ark. (2015). Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*, **521**, 489-494.
- Patel, N.M., Nozaki, S., Shortle, N.H., Bhat-Nakshatri, P., Newton, T.R., Rice, S. ve ark. (2000). Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF- κ B is enhanced by I κ B α super-repressor and parthenolide. *Oncogene*, **19(36)**, 4159-4169.
- Pearce, C.L., Templeman, C., Rossing, M.A., Lee, A., Near, A.M., Webb, P.M. ve ark. (2012). Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *The Lancet Oncology*, **13(4)**, 385-394.

Pennington, K.P. ve Swisher, E.M. (2012). Hereditary ovarian cancer: Beyond the usual suspects. *Gynecologic Oncology*, **124**(2), 347-353.

Pérez-Tenorio, G., Alkhori, L., Olsson, B., Waltersson, M.A., Nordenskjöld, B., Rutqvist, L.E. ve ark. (2007). PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, **13**(12), 3577-3584.

Pérez-Tenorio, G., Alkhori, L., Olsson, B., Waltersson, M.A., Nordenskjöld, B., Rutqvist, L.E. ve ark. (2007). PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, **13**(12), 3577-3584.

Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I. ve ark. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, **353**(16), 1659-1672.

Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*, **117**(11), 3155-3163.

Provost, E., McCabe, A., Stern, J., Lizardi, I., Thomas, G.D. ve Rimm, D.L. (2005). Functional correlates of mutation of the Asp32 and Gly34 residues of beta-catenin. *Oncogene*, **24**, 2667-2676.

Qiang, Y.W., Kopantzev, E. ve Rudikoff, S. (2002). Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: Downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood*, **99**(11), 4138-4146.

Rask, K., Nilsson, A., Brännström, M., Carlsson, P., Hellberg, P., Janson, P.O. ve ark. (2003). Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: Increased expression of β -catenin and GSK3 β . *British Journal of Cancer*, **89**(7), 1298-1304.

Rebbeck, T.R., Friebel, T.M., Friedman, E., Hamann, U., Huo, D., Kwong, A. ve ark. (2018). Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations. *Human Mutation*, **39**(5), 593-620.

Renoir, J.M., Marsaud, V. ve Lazennec, G. (2013). Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical Pharmacology*, **85**, 449-465.

- Rimm, D.L., Koslov, E.R., Kebriaei, P., Ciani, C.D. ve Morrow, J.S. (1995). Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 8813-8817.
- Risso, G., Blaustein, M., Pozzi, B., Mammi, P. ve Srebrow, A. (2015). Akt/PKB: One kinase, many modifications. *The Biochemical Journal*, **468(2)**, 203-214.
- Robert, S., Schwartz, M.D., John, K. ve Erban, M.D. (2017). Timing of metastasis in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, **376**, 2486-2488.
- Robey, R.W., Shukla, S., Steadman, K., Obrzut, T., Finley, E.M., Ambudkar, S.V. ve ark. (2007). Inhibition of ABCG2-mediated transport by protein kinase inhibitors with a bisindolylmaleimide or indolocarbazole structure. *Molecular Cancer Therapeutics*, **6(6)**, 1877-1885.
- Rojas, K. ve Stuckey, A. (2016). Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, **59(4)**, 651-672.
- Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F. ve Bienz, M. (2000). The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature*, **406**, 1009-1012.
- Rowinsky, E.K., Cazenave, L.A. ve Donehower, R.C. (1990). Taxol: A novel investigational antimicrotubule agent. *Journal of The National Cancer Institute*, **82(15)**, 1247-1259.
- Rössig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M. ve Dimmeler, S. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21Cip1 regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, **21(16)**, 5644-5657.
- Rudolph, M., Anzeneder, T., Schulz, A., Beckmann, G., Byrne, A.T., Jeffers, M. ve ark. (2016). AKT1 E17K mutation profiling in breast cancer: Prevalence, concurrent oncogenic alterations, and blood-based detection. *BMC Cancer*, **16(1)**, 1-12.
- Ryo, A., Nakamura, M., Wulf, G., Liou, Y.C. ve Lu, K.P. (2001). Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nature Cell Biology*, **3(9)**, 793-801.
- Salas, T.R., Reddy, S.A., Clifford, J.L., Davis, R.J., Kikuchi, A., Lippman, S.M. ve ark. (2003). Alleviating the suppression of glycogen synthase kinase-3 β by Akt leads to the

phosphorylation of cAMP-response element-binding protein and its transactivation in intact cell nuclei. *Journal of Biological Chemistry*, **278(42)**, 41338-41346.

Salazar-Martinez, E., Lazcano-Ponce, E.C., Gonzalez Lira-Lira, G., Escudero-De los Rios, P., Salmeron-Castro, J. ve ark. (1999). Reproductive factors of ovarian and endometrial cancer risk in a high fertility population in Mexico. *Cancer Research*, **59(15)**, 3658-3662.

Salehan, M.R. ve Morse, H.R. (2013). DNA damage repair and tolerance: A role in chemotherapeutic drug resistance. *British Journal of Biomedical Science*, **70(1)**, 31-40.

Sasaki, K., Tsuno, N.H., Sunami, E., Tsurita, G., Kawai, K., Okaji, Y. ve ark. (2010). Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer*, **10**, 1-11.

Schiff, P.B. ve Horwitz, S.B. (1980). Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **77(3)**, 1561-1565.

Schmid, P., Abraham, J., Chan, S., Wheatley, D., Brunt, A.M., Nemsadze, G. ve ark. (2020). Capivasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer: The PAKT trial. *Journal of Clinical Oncology*, **38(5)**, 423-433.

Schwartz, R.S. ve Erban, J.K. (2017). Timing of metastasis in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, **376(25)**, 2486-2488.

Sekine, S., Shibata, T., Matsuno, Y., Maeshima, A., Ishii, G., Sakamoto, M. ve ark. (2003). β -catenin mutations in pulmonary blastomas: Association with morule formation. *The Journal of Pathology*, **200**, 214-221.

Sgroi, D.C. (2010). Preinvasive breast cancer. *Annual Review of Pathology*, **5**, 193-221.

Sharifi, S., Barar, J., Hejazi, M.S. ve Samadi, N. (2014). Roles of the Bcl-2/Bax ratio, caspase-8 and 9 in resistance of breast cancer cells to paclitaxel. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **15(20)**, 8617-8622.

Sharma, G.N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P. ve Sharma, K. (2010). Various types and management of breast cancer: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, **1(2)**, 109.

Sharma, N., Ramachandran, S., Bowers, M., Yegappan, M., Brown, R., Aziz, S., Chapman, R. ve Yu, B.W. (2000). Multiple factors other than p53 influence colon cancer sensitivity to paclitaxel. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **46(4)**, 329-337.

Shi, X., Wang, J., Lei, Y., Cong, C., Tan, D. ve Zhou, X. (2019). Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer. *Molecular Medicine Reports*, **19(6)**, 4529-4535.

Shih, I.M. ve Kurman, R.J. (2004). Ovarian tumorigenesis: A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American Journal of Pathology*, **164(5)**, 1511-1518.

Shiovitz, S. ve Korde, L.A. (2015). Genetics of breast cancer: A topic in evolution. *Annals of Oncology*, **26(7)**, 1291-1299.

Siveen, K.S., Sikka, S., Surana, R., Dai, X., Zhang, J., Kumar, A.P., Tan, B.K., Sethi, G. ve Bishayee, A. (2014). Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: Role of synthetic and natural inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1845(2)**, 136-154.

Škubník, J., Pavlíčková, V., Ruml, T. ve Rimpelová, S. (2021). Current perspectives on taxanes: Focus on their bioactivity, delivery and combination therapy. *Plants*, **10(3)**, 569.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. ve McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177-182.

Slatnik, C.L. ve Duff, E. (2015). Ovarian cancer: Ensuring early diagnosis. *The Nurse Practitioner*, **40(9)**, 47-54.

Smith, P.E., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M. ve ark. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, **150(1)**, 76-85.

Smyth, L.M., Oliveira, M., Ciruelos, E., Tamura, K., El-Khoueiry, A., Mita, A. ve ark. (2018). AZD5363 in combination with fulvestrant in AKT1-mutant ER-positive metastatic breast cancer. *Cancer Research*, **78**, 5-21.

Stage, T.B., Bergmann, T.K. ve Kroetz, D.L. (2018). Clinical pharmacokinetics of paclitaxel monotherapy: An updated literature review. *Clinical Pharmacokinetics*, **57(1)**, 7-19.

Stewart, C., Ralyea, C. ve Lockwood, S. (2019). Ovarian cancer: An integrated review. *In Seminars in Oncology Nursing*, **35(2)**, 151-156.

Stratton, J.F., Pharoah, P., Smith, S.K., Easton, D. ve Ponder, B.A. (1998). A systematic review and meta-analysis of family history and risk of ovarian cancer. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, **105(5)**, 493-499.

Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R. ve Du, J. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, **487**, 500-504.

Strobel, T., Swanson, L., Korsmeyer, S. ve Cannistra, S.A. (1996). BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93(24)**, 14094-14099.

Strobel, T., Tai, Y.T., Korsmeyer, S. ve Cannistra, S.A. (1998). BAD partly reverses paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Oncogene*, **17(19)**, 2419-2427

Sule, R., Rivera, G. ve Gomes, A.V. (2023). Western blotting (immunoblotting): History, theory, uses, protocol and problems. *BioTechniques*, **75(3)**, 99-114.

Sun, H., Yu, T. ve Li, J. (2011). Co-administration of perifosine with paclitaxel synergistically induces apoptosis in ovarian cancer cells: More than just AKT inhibition. *Cancer Letters*, **310(1)**, 118-128.

Sun, Y.S., Zhao, Z., Yang, Z.N., Xu, F., Lu, H.J., Zhu, Z.Y. ve ark. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of Biological Sciences*, **13(11)**, 1387.

Sundar, S., Neal, R.D. ve Kehoe, S. (2015). Diagnosis of ovarian cancer. *BMJ*, **351**, 4443.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve ark. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, **71(3)**, 209-249.

- Sunters, A., Madureira, P.A., Pomeranz, K.M., Aubert, M., Brosens, J.J., Cook, S.J. ve ark. (2006). Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt. *Cancer Research*, **66(1)**, 212-220.
- Tabuchi, Y., Matsuoka, J., Gunduz, M., Imada, T., Ono, R., Ito, M. ve ark. (2009). Resistance to paclitaxel therapy is related with Bcl-2 expression through an estrogen receptor mediated pathway in breast cancer. *International Journal of Oncology*, **34(2)**, 313-319.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z. ve ark. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular Cell*, **13(1)**, 149-156.
- Tan, M.H., Mester, J.L., Ngeow, J., Rybicki, L.A., Orloff, M.S. ve Eng, C. (2012). Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clinical Cancer Research*, **18(2)**, 400-407.
- Tanaka, Y., Kato, K., Notohara, K., Hojo, H., Ijiri, R., Miyake, T. ve ark. (2001). Frequent β -catenin mutation and cytoplasmic/nuclear accumulation in pancreatic solid-pseudo papillary neoplasm. *Cancer Research*, **61**, 8401-8404.
- Taniai, M., Grambihler, A., Higuchi, H., Werneburg, N., Bronk, S. F., Farrugia, D. J. ve ark. (2004). Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Research*, **64(10)**, 3517-3524.
- Tao, W.Y., Liang, X.S., Liu, Y., Wang, C.Y. ve Pang, D. (2015). Decrease of let-7f in low-dose metronomic Paclitaxel chemotherapy contributed to upregulation of thrombospondin-1 in breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, **11(1)**, 48.
- Terry, L.R., Richard, A.M., Andrew, L., Helene, A.B., Tracy, J.W. Lisa, M. ve ark. (2016). Cell viability assay. İçinde M.D. Bethesda (Ed.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company ve the National Center for Advancing Translational Sciences, 1-31.
- Toker, A. ve Marmiroli, S. (2014). Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. *Advances in Biological Regulation*, **55**, 28-38.
- Tokunaga, E., Hisamatsu, Y., Tanaka, K., Yamashita, N., Saeki, H., Oki, E ve ark. (2014). Molecular mechanisms regulating the hormone sensitivity of breast cancer. *Cancer Science*, **105(11)**, 1377-1383.

- Trayes, K.P. ve Cokenakes, S.E. (2021). Breast cancer treatment. *American Family Physician*, **104**(2), 171-178.
- Trenker, R. ve Jura, N. (2020). Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. *Current Opinion in Cell Biology*, **63**, 174-185.
- Triller, N., Korošec, P., Kern, I., Košnik, M. ve Debeljak, A. (2006). Multidrug resistance in small cell lung cancer: Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease. *Lung Cancer*, **54**(2), 235-240.
- Uchida, N., Suda, T. ve Ishiguro, K. (2013). Effect of chemotherapy for luminal a breast cancer. *Yonago Acta Medica*, **56**(2), 51-56.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N. ve McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, **397**, 405-409.
- Van Nhieu, J.T., Renard, C.A., Wei, Y., Cherqui, D., Zafrani, E.S. ve Buendia, M.A. (1999). Nuclear accumulation of mutated β -catenin in hepatocellular carcinoma is associated with increased cell proliferation. *The American Journal of Pathology*, **155**(3), 703-710.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. ve Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **11**(5), 329-341.
- Vara, J.Á.F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. ve González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, **30**(2), 193-204.
- Vasan, N., Baselga, J. ve Hyman, D.M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, **575**, 299-309.
- Vasey, P.A., Jones, N.A., Jenkins, S., Dive, C. ve Brown, R. (1996). Cisplatin, camptothecin, and taxol sensitivities of cells with p53-associated multidrug resistance. *Molecular Pharmacology*, **50**(6), 1536-1540.
- Veldhoen, R.A., Banman, S.L., Hemmerling, D.R., Odsen, R., Simmen, T., Simmonds, A.J. ve ark. (2013). The chemotherapeutic agent paclitaxel inhibits autophagy through two distinct mechanisms that regulate apoptosis. *Oncogene*, **32**(6), 736-746.

- Vergote, I., De Brabanter, J., Fyles, A., Bertelsen, K., Einhorn, N., Sevelde, P. ve ark. (2001). Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *The Lancet*, **357**, 176-182.
- Vidal, S., Bouzaher, Y.H., El Motiam, A., Seoane, R. ve Rivas, C. (2022). Overview of the regulation of the class IA PI3K/AKT pathway by SUMO. *In Seminars in Cell & Developmental Biology*, **132**, 51-61.
- Viglietto, G., Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M., D'Alessio, A., Califano, D. ve ark. (2002). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Medicine*, **8(10)**, 1136-1144.
- Vivanco, I. ve Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, **2(7)**, 489-501.
- Waks, A.G. ve Winer, E.P. (2019). Breast cancer treatment: A review. *Jama*, **321(3)**, 288-300.
- Walquist, M.J. ve El-Gewely, M.R. (2018). Mutagenesis: Site-Directed. Wiley, eLS, 1-14.
- Walsh, T., Casadei, S., Lee, M.K., Pennil, C.C., Nord, A.S., Thornton, A.M. ve ark. (2011). Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108(44)**, 18032-18037.
- Wang, L. (2017). Early diagnosis of breast cancer. *Sensors*, **17(7)**, 1572.
- Wang, S.Q., Wang, C., Chang, L.M., Zhou, K.R., Wang, J.W., Ke, Y. ve ark. (2016). Geridonin and paclitaxel act synergistically to inhibit the proliferation of gastric cancer cells through ROS-mediated regulation of the PTEN/PI3K/Akt pathway. *Oncotarget*, **7(45)**, 72990-73002.
- Wang, X., Gigant, B., Zheng, X. ve Chen, Q. (2023). Microtubule- targeting agents for cancer treatment: Seven binding sites and three strategies. *MedComm–Oncology*, **2(3)**, e46.
- Wang, X., Zhang, H. ve Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, **2(2)**, 141.

Watson, K.L. ve Moorehead, R.A. (2013). Loss of Akt1 or Akt2 delays mammary tumor onset and suppresses tumor growth rate in MTB-IGFIR transgenic mice. *BMC Cancer*, **13**, 375.

Webb, P.M. ve Jordan, S.J. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best practice & research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, **41**, 3-14.

Weigelt, B., Geyer, F.C. ve Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: How special are they?. *Molecular Oncology*, **4(3)**, 192-208.

Welsh, J. (2013). Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. İçinde P.M. Conn (Ed.), *Animal Models for the Study of Human Disease*. Cambridge: Academic Press; 997-1018.

Wentzensen, N., Poole, E.M., Trabert, B., White, E., Arslan, A.A., Patel, A.V. ve ark. (2016). Ovarian cancer risk factors by histologic subtype: an analysis from the ovarian cancer cohort consortium. *Journal of Clinical Oncology*, **34(24)**, 2888.

Wheeler, D.L., Huang, S., Kruser, T.J., Nechrebecki, M.M., Armstrong, E.A., Benavente, S. ve ark. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: Role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*, **27(28)**, 3944-3956.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, **12(6)**, 401-410.

Wilson, T.R., Johnston, P.G. ve Longley, D.B. (2009). Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer. *Current Cancer Drug Targets*, **9(3)**, 307-319.

Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Hicks, D.G., Dowsett, M., McShane, L.M., Allison, K. ve ark. (2014). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, **138(2)**, 241-256.

Wong, C.M., Fan, S.T. ve Ng, I.O. (2001). β -catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: Clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*, **92**, 136-145.

Wright, K., Wilson, P., Morland, S., Campbell, I., Walsh, M., Hurst, T. ve ark. (1999). β -catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and

nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours. *International Journal of Cancer*, **82(5)**, 625-629.

Wu, D. ve Pan, W. (2010). GSK3: A multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, **35(3)**, 161-168.

Wu, G., Xu, G., Schulman, B.A., Jeffrey, P.D., Harper, J.W. ve Pavletich, N.P. (2003). Structure of a β -TrCP1-Skp1- β -catenin complex: Destruction motif binding and lysine specificity of the SCF β -TrCP1 ubiquitin ligase. *Molecular Cell*, **11(6)**, 1445-1456.

Wu, R., Zhai, Y., Fearon, E.R. ve Cho, K.R. (2001). Diverse mechanisms of β -catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Research*, **61(22)**, 8247-8255.

Wu, T. ve Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters*, **387**, 61-68.

Wu, X., Tu, X., Joeng, K.S., Hilton, M.J., Williams, D.A. ve Long, F. (2008). Rac1 activation controls nuclear localization of β -catenin during canonical Wnt signaling. *Cell*, **133(2)**, 340-353.

Wu, Y., Sarkissyan, M. ve Vadgama, J.V. (2016). Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer. *Journal of Clinical Medicine*, **5(2)**, 13.

Wuilleme-Toumi, S., Robillard, N., Gomez, P., Moreau, P., Le Gouill, S., Avet-Loiseau, H. ve ark. (2005). Mcl-1 is overexpressed in multiple myeloma and associated with relapse and shorter survival. *Leukemia*, **19(7)**, 1248-1252.

Xin, Z., Tong, Z., Tan, J. ve Liu, C. (2021). MicroRNA-145-5p aggravates cell apoptosis and oxidative stress in tongue squamous cell carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **21(4)**, 373.

Xu, J.H., Hu, S.L., Shen, G.D. ve Shen, G. (2016). Tumor suppressor genes and their underlying interactions in paclitaxel resistance in cancer therapy. *Cancer Cell International*, **16**, 1-10.

Xu, W. ve Kimelman, D. (2007). Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *Journal of Cell Science*, **120(19)**, 3337-3344.

Yaginuma, Y. ve Westphal, H. (1992). Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Research*, **52(15)**, 4196-4199.

Yamanaka, K., Miyake, H., Zangemeister-Wittke, U., Jansen, B. ve Gleave, M. (2004) Novel bispecific antisense oligonucleotides inhibiting both Bcl-2 and Bcl-xL expression induce apoptosis and enhance chemosensitivity in human androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Research*, **64**, 677.

Yanagisawa, N., Mikami, T., Saegusa, M. ve Okayasu, I. (2001). More frequent β -catenin exon 3 mutations in gallbladder adenomas than in carcinomas indicate different lineages. *Cancer Research*, **61**, 19-22.

Yang, W.L., Zhang, X. ve Lin, H.K. (2010). Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development. *Oncogene*, **29(32)**, 4493-4503.

Yanokura, M., Banno, K. ve Aoki, D. (2020). MicroRNA-34b expression enhances chemosensitivity of endometrial cancer cells to paclitaxel. *International Journal of Oncology*, **57(5)**, 1145-1156.

Yi, K.H., Axtmayer, J., Gustin, J.P., Rajpurohit, A. ve Lauring, J. (2013). Functional analysis of non-hotspot *AKT1* mutants found in human breast cancers identifies novel driver mutations: implications for personalized medicine. *Oncotarget*, **4**, 29-34.

Ying, L., Zhu, Z., Xu, Z., He, T., Li, E., Guo, Z. ve ark. (2015). Cancer associated fibroblast-derived hepatocyte growth factor inhibits the paclitaxel-induced apoptosis of lung cancer A549 cells by up-regulating the PI3K/Akt and GRP78 signaling on a microfluidic platform. *Plos ONE*, **10(6)**, e0129593.

Young, M.M., Kester, M. ve Wang, H.G. (2013). Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *Journal of Lipid Research*, **54(1)**, 5-19.

Yu, Q.C., Verheyen, E.M. ve Zeng, Y.A. (2016). Mammary development and breast cancer: a Wnt perspective. *Cancers*, **8(7)**, 65.

Yu, Y., Zhong, Z. ve Guan, Y. (2015). The downregulation of Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter indicates worse outcomes in patients with small cell lung carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **8(10)**, 13075.

Yuan, Z.Q., Sun, M., Feldman, R.I., Wang, G., Ma, X.L., Jiang, C. ve ark. (2000). Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of

phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene*, **19(19)**, 2324-2330.

Yusuf, R.Z., Duan, Z., Lamendola, D.E., Penson, R.T. ve Seiden, M.V. (2003). Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation. *Current Cancer Drug Targets*, **3(1)**, 1-19.

Zalcberg, J., Hu, X.F., Slater, A., Parisot, J., El-Osta, S., Kantharidis, P. ve ark. (2000). MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, **3(2)**, 66-75.

Zeng, G., Germinaro, M., Micsenyi, A., Monga, N.K., Bell, A., Sood, A. ve ark. (2006). Aberrant Wnt/ β -catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasia*, **8(4)**, 279-289.

Zeng, G., Germinaro, M., Micsenyi, A., Monga, N. K., Bell, A., Sood, A. ve ark. (2006). Aberrant Wnt/ β -catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma. *Neoplasia*, **8(4)**, 279-289.

Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R. ve ark. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, **438**, 873-877.

Zhang, X., Wu, X., Zhang, F., Mo, S., Lu, Y., Wei, W. ve ark. (2017). Paclitaxel induces apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma cells by downregulating STAT3 phosphorylation at Ser727. *Oncology Reports*, **37(4)**, 2237-2244

Zhao, S., Tang, Y., Wang, R. ve Najafi, M. (2022). Mechanisms of cancer cell death induction by paclitaxel: An updated review. *Apoptosis*, **27**, 647-667.

Zhong, L., Jiang, W., Liu, H. ve Song, L. (2023). CTNNB1 p. D32A (c. 95A> C) somatic mutation in stage I grade 1 endometrioid endometrial carcinoma with lung metastasis: A case report. *BMC Medical Genomics*, **16(1)**, 1-7.

Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. ve Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature Cell Biology*, **3(3)**, 245-252.

Zhou, M., Liu, Z., Zhao, Y., Ding, Y., Liu, H., Xi, Y. ve ark. (2010). MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**(28), 21496–21507.

Zimmer, K., Kocher, F. ve Spizzo, G. (2019). Capivasertib active against AKT1-mutated cancers. *Cancer Discovery*, **9**(1), OF7.

Zubair, M., Wang, S. ve Ali, N. (2021). Advanced approaches to breast cancer classification and diagnosis. *Frontiers in Pharmacology*, **11**, 632079.

Zyla, R. E., Olkhov-Mitsel, E., Amemiya, Y., Bassiouny, D., Seth, A., Djordjevic, B. ve ark. (2021). CTNNB1 mutations and aberrant β -catenin expression in ovarian endometrioid carcinoma: correlation with patient outcome. *The American Journal of Surgical Pathology*, **45**(1), 68-76.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AKT1 VE CTNNB1 GEN MUTASYONLARININ TAKSAN GRUBU İLAÇ DİRENCİ İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 14	% 13	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 8
2	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	earsiv.anadolu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

iksadyayinevi.com