

**T. C.**  
**KADIR HAS ÜNİVERSİTESİ**  
***SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ***  
***HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI***

**MEME KANSER HÜCRELERİNDE**  
**ERBB RESEPTÖR DAĞILIMI VE HÜCRE**  
**PROLİFERASYONUNUN İMMÜNOSİTOKİMYASAL**  
**YÖNTEM İLE İNCELENMESİ**

**Dr. Gülden Pınar KARACA GÜZEL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2005**

**T. C.**  
**KADIR HAS ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
***HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI***

**MEME KANSER HÜCRELERİNDE**  
**ERBB RESEPTÖR DAĞILIMI VE HÜCRE**  
**PROLİFERASYONUNUN İMMÜNOSİTOKİMYASAL**  
**YÖNTEM İLE İNCELENMESİ**

**Dr. Gülden Pınar KARACA GÜZEL**

**Tez Danışmanı**  
**Doç. Dr. Nedret ALTIOK**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2005**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. HÜCRE İÇİ SİNYAL İLETİ MEKANİZMALARI.....	4
4.1.1. Protein Kinazlar ve Sinyal İletimi.....	4
4.1.2. Tirozin Kinazlar.....	4
4.1.3. Tirozin Kinazların Onkojenik Aktivasyonu.....	5
4.1.4. EGFR Ailesi.....	5
4.1.5. Meme Kanseri Hücrelerinde EGFR.....	7
4.2. HÜCRE SİKLÜSÜ.....	7
4.2.1. Hücre Proliferasyon İşaretleyicileri.....	8
4.2.2. BrdU İnkorporasyonu.....	9
4.2.3. PCNA Ekspresyonu.....	9
4.3. MEME TÜMÖRLERİ.....	9
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	11
5.2. KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	12
5.3. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	12
5.3.1. Hücre Kültürü.....	12
5.3.2. İmmünohistokimya.....	12
6. BULGULAR.....	13
6.1. MDA-MB-231 VE T47D MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE ERBB RESEPTÖRLERİNİN DAĞILIMI.....	13
6.2. MDA-MB-231 VE T47D HÜCRE PROLİFERASYONUNUN PCNA VE BRDU İLE GÖSTERİLMESİ.....	15
7. TARTIŞMA.....	17
8. SONUÇ.....	19
9. TEŞEKKÜR.....	20
10. KAYNAKLAR.....	22

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>BRCA1</b>	: ( Breast cancer susceptibility gene )
<b>BrdU</b>	: 5 – bromo 2' – deoksi - üridine
<b>EGF</b>	: Epidermal büyüme faktörü
<b>EGFR</b>	: Epidermal büyüme faktör reseptörü
<b>ER</b>	: Estrojen reseptörü
<b>ErbB</b>	: ( Onkogen- erythroblastosis virus )
<b>FAK</b>	: Fokal adezyon kinaz
<b>FGFR</b>	: Fibroblast büyüme faktör reseptörü
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>HER</b>	: ( Human EGF – related ) reseptör
<b>IR</b>	: İnsülin reseptörü
<b>JAK</b>	: Janus kinaz
<b>MAPK</b>	: Mitojen aktivasyonlu protein kinaz
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>NFκB</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>NRTK</b>	: Reseptör olmayan tirozin kinaz
<b>PCNA</b>	: Prolifere hücre nükleer antijeni
<b>PDGFR</b>	: Platelet derive büyüme faktör reseptörü
<b>PH</b>	: ( Pleckstrin homology )
<b>PR</b>	: Projesteron reseptörü
<b>PI3K</b>	: Fosfatidil inositol –3 kinaz
<b>RTK</b>	: Reseptör tirozin kinaz
<b>SH</b>	: (Src homology)
<b>TGFα</b>	: Transforme edici büyüme faktörü α
<b>TKIs</b>	: Tirozin kinaz inhibitörleri

## 1. ÖZET

Bu çalışmada meme kanseri hücre soyları MDA MB 231 ve T47D hücrelerinde ErbB reseptörlerinin dağılımını ve hücrelerin proliferasyon özelliklerini immunositokimyasal yöntemle inceledik. MDA MB 231 hücrelerinde ErbB1 (EGFR) ve ErbB2 reseptörleri nukleus içinde yoğun olarak saptanırken, T47D hücrelerinde seyrek olarak hücre membranında boyandıkları görüldü. ErbB3 reseptörleri ise her iki hücre soyunda ErbB2 reseptörlerine benzer fakat daha az yoğun bir dağılım gözledik. Hücre içi tirozin fosforilasyonunu incelediğimizde ErbB3 reseptör dağılımına benzer bir dağılım gösterdi. Ayrıca, hücrelerin proliferasyon düzeyini PCNA ekspresyonu ve BrdU inkorporasyonu ile immunositokimyasal yöntemle incelediğimizde MDA MB 231 hücrelerinin T47D hücrelerine göre 2.5 kat daha hızlı proliferere olduklarını gördük.

Sonuç olarak, MDA MB 231 hücrelerinde ErbB reseptör ailesinin nukleer lokalizasyon göstermesi ve proliferasyon hızının daha yüksek olması bu hücrelerin T47D hücrelerine göre daha malign bir karakterde olduğunu göstermektedir. Ayrıca, ErbB reseptör ekspresyonuna rağmen hücre içi fosfotirozin aktivitesinin az olması bu hücrelerde başka faktörlerin de hücre çoğalmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

## **2. SUMMARY**

In the present study we have investigated the distribution of ErbB receptors and the characteristics of cell proliferation in breast cancer cell lines MDA MB 231 and T47D by immunocytochemical analysis. In MDA MB 231 cells, ErbB1 (EGFR) and ErbB2 receptors were stained in the nucleus, while in T47D cells they were detected in the cell membrane. The distribution of ErbB3 receptors was similar but less dense than the ErbB2 receptors in both cell lines. The distribution of tyrosine phosphorylation was also found similar to ErbB3 receptors. In addition, when we investigated the level of cellular proliferation with PCNA expression and BrdU incorporation, we found that the rate of cell proliferation in MDA MB 231 cells was 2.5 fold higher than T47D cells.

In conclusion, the nuclear localization of ErbB family receptors in MDA MB 231 and their higher rate of proliferation indicate the malignant phenotype of these cells compared to T47D cells. In addition, in the presence of ErbB receptor expression, the low level of tyrosine phosphorylation suggests the involvement of other factors in the regulation of cell proliferation in these cells.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri kompleks ve klinik olarak heterojen kanser türlerinden birisidir. Meme kanseri oluşumunun biyolojik mekanizmalarını anlamak meme kanseri tanı ve tedavisinde yeni yöntemler geliştirilmesi için önemlidir. Son yirmi yılda bir çok diagnostik ve prognostik moleküler işaretleyici üzerinde durulmuş fakat bunlardan pek azı klinikte yararlı sonuçlar vermiştir. Klinikte bugün en çok kullanılan işaretleyiciler estrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), epitelyal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve ErbB2/HER2 reseptörleridir. Hücre proliferasyonu, tümörün ilerlemesini gösteren önemli bir kriterdir ve bunun immunohistokimyasal yolla incelenmesi güvenilir bir yöntemdir. Tümörün yüksek proliferasyon hızı, kötü prognozun fakat genellikle kemoterapiye iyi yanıt vereceğinin göstergesidir. Proliferasyon işaretleyicilerinin farmakodinamik açıdan medikal tedavinin etkinliğini izlemek amacı ile klinikte kullanılması yeni ilaçların hızla değerlendirilmesi açısından umut verici olarak görülmektedir. Bu çalışmada, insan meme kanser hücreleri MDA MB 231 ve T47D hücrelerinin proliferasyon özelliklerini ve EGFR ailesinin ekspresyon düzeylerini immunositokimyasal yöntemle incelemeyi ve karşılaştırmayı amaçladık.

## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1. HÜCRE İÇİ SİNYAL İLETİ MEKANİZMALARI**

#### **4.1.1. Protein Kinazlar ve Sinyal İletimi**

Protein fosforilasyonu hücresele olayların kontrol edilmesini sağlayarak, özellikle hücre içi sinyal ileti ve gen ekspresyonu regülasyonunda önemli rol oynamaktadır (1). Protein kinazlar hücre yapısındaki bazı proteinlerin yapılarına fosfat grubu ekleyerek modifiye olmalarını ve hedef proteinlerde fonksiyonel değişikliklerin oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Protein kinazlar ile modifiye olmuş proteinler hücre içi sinyal ileti yollarının regülasyonunu sağlar. Protein kinazlar genel olarak aktivitelerini ATP yapısındaki fosfat grubunu alıp hedef protein yapısındaki üç amino asitten serbest hidroksil grubu içeren bir amino aside bağlaması ile gösterir. Buna göre Serin, Treonin, veya Tirozin kinazlar olarak adlandırılırlar.

Protein kinaz aktivitesindeki düzensizlikler kanserlerin ve çeşitli hastalıkların oluşmasında rol oynamaktadır. Bazı ilaçlar selektif olarak protein kinazları inhibe ettikleri için klinik olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar (2).

#### **4.1.2. Tirozin Kinazlar**

Protein kinazların alt grubu olup temel olarak proteinlerin tirozin rezidülerine fosfat gruplarının transferini sağlayan enzimlerdir. Tirozin kinazlar, genel olarak neoplastik oluşum basamaklarında ve bunların ilerlemesindeki aşamalarda önemlidir. Tirozin kinazlar reseptör tirozin kinazlar (RTK); EGFR, PDGFR, FGFR, IR vb., ve reseptör olmayan tirozin kinazlar (NRTK); SRC, ABL, FAK ve JAK vb., olarak iki grupta sınıflandırılırlar (3,4). RTK'lar hücre yüzeyindeki transmembran reseptörleri olmalarının yanı sıra intrinsik kinaz aktivitesine sahip enzimlerdir. NRTK'lar yapısal olarak değişiklik gösterebilen sitoplazmik proteinlerdir. NRTK'lar, bir kinaz bölgesine ve buna ilave RTK'larda olduğu gibi pek çok protein protein etkileşim bölgesine sahiptir; örneğin SH2, SH3 ve PH (5). RTK'lar hücre dışı bölgelerine ligandın bağlanması ile aktive olurlar, bunu reseptörlerin dimerizasyonu takip eder (6).



### 4.1.3. Tirozin Kinazların Onkojenik Aktivasyonu

Normal olarak hücre içindeki tirozin uçlarının fosforilasyonu tirozin kinaz ve fosfatazların antagonistik etkileri ile kontrol edilirler. Bazı mekanizmalar tirozin kinazın etkilemiş olduğu hücre içi olayları etkileyerek hücrenin yanıtı olan hücre bölünmesi, diferansiyasyonu ve hücre ölümü olaylarının da etkilenmesine neden olur (7). Bu mekanizmalar şu şekilde özetlenebilir:

i) Mutasyonlar ile Aktivasyon: Tirozin kinazların aktivasyonundaki düzensizlik göstermelerindeki önemli mekanizmalardan biri mutasyonlardır. Hücre dışındaki bir bölgedeki mutasyon, örneğin EGFRv3 mutandındaki amino asit 6-273 eksikliği tirozin reseptör aktivitesinin sürekliliğine, bu olay da hücre çoğalmasının hızlanmasına neden olur. Bu mutasyon özellikle glioblastoma, over tümörleri ve küçük olmayan hücreli akciğer kanserlerinde gözlenir (8).

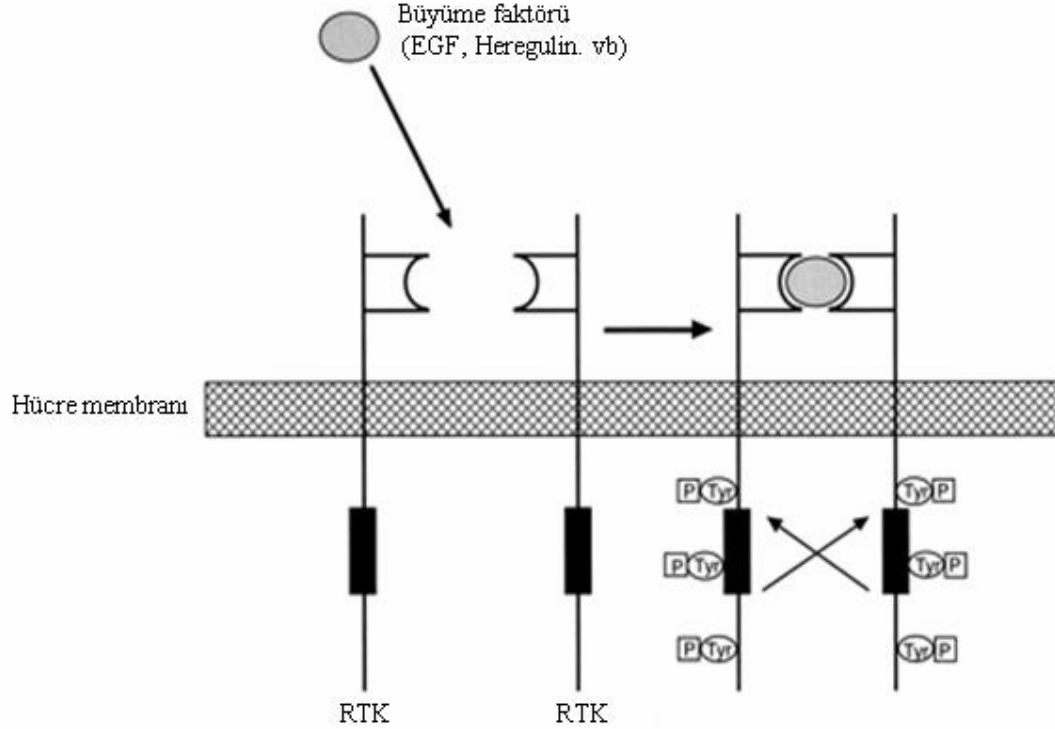
ii) Otokrin Parakrin Uyarılar: Özellikle RTK aktivasyonundaki önemli rol oynamaktadırlar. Bu aktivasyon döngüsü RTK'nın veya ligandının aşırı eksprese olmasına bağlı olarak ortaya çıkar. Pek çok kanser türünde bu mekanizma etkili olmaktadır. EGFR, PDGFR ve IGF reseptörleri ve ligandları buna örnektir. EGFR'nin bu otokrin ve parakrin döngüsündeki ligandları olan EGF ve TGF- $\alpha$  ile meme kanseri glioblastoma multiforme, mesane kanserleri arasındaki sıkı ilişki bulunmaktadır (9).

### 4.1.4. EGFR Ailesi

EGFR ailesi dört reseptörden oluşur. Bunlar; EGFR (ErbB1), HER-2/neu (ErbB2), Her-3(ErbB3) ve HER-4 (ErbB4)'tür (5,10). Tüm bu transmembran reseptörleri intrinsik tirozin kinaz aktivitelere sahiptir. EGFR'nün tirozin kinaz aktivitesi EGF ailesindeki büyüme faktörlerinin reseptöre bağlanması ile stimüle olur. EGF dışında pek çok ligand EGFR aile üyeleri karşılıklı etkileşim içindedir ve bunların içerisindeki TGF- $\alpha$  spesifik olarak aile üyelerinden yalnızca EGFR ile etkileşime girer.

EGFR ailesinin hepsinde ortak bir yapı bulunur. EGFR üç yapısal parçaya ayrışır. Bunlar; ekstrasellüler, transmembran ve sitoplazmik bölümlerdir. Her bir bölümün farklı görevleri vardır. Ekstrasellüler bölüm sistein'den zengin yapı içerir ve bu yapıya pek çok farklı EGF bağımlı büyüme faktörlerini bağlar. Santral lipofilik kısım ise reseptörü hücre

membranına sıkıca bağlamakla görevlidir. Reseptörün hücre içi kısmında ise tirozin kinaz aktivasyonuna sahip sitoplazmik uzantısı bulunmaktadır (5,10).



**Şekil 1.** RTK'ların ligand bağlandıktan sonra dimerize olması ( Kaynak 2'den uyarlanmıştır.)

EGFR sinyali iletiminin oluşması pek çok aşamayı içerir. Ligandın hücre dışı kısmına bağlanması reseptörün dimerizasyonunu indüklemektedir. Dimerizasyon aynı (homodimerizasyon) veya farklı (heterodimerizasyon) EGFR ailesi üyeleri arasında olur ve her bir reseptörde bulunan hücre içi tirozin kısımları aktive olarak diğer ErbB molekülündeki kinaz rezidülerini çapraz fosforile eder. Bu fosforilasyon, adaptör proteinler ve diğer tirozin kinaz substratları için bağlanma bölgesi oluştururlar, bu şekilde sinyal ileti yolu sitoplazmada gerçekleşir. ErbB sinyali ileti yolları bir çok biyolojik olaydan sorumludur, örnek olarak Ras/MAP kinaz sinyali ileti kaskadı, hücre bölünmesini ve aynı zamanda hücre göçünü stimüle ederek, karsinogenezde önemli rol oynar.

Mutasyonlar sonucu EGFR ligandından bağımsız olarak aktive olabilir ve bu aktivasyon EGFR tirozin fosforilasyonu indükler, bu uyarıya yanıt veren adaptör proteinlerin reseptöre bağlanmasına yol açar (11).

ErbB2, EGFR ailesine bağlı olan bir transmembran tirozin kinazdır. ErbB2 ligand bağlamaz. Fakat bunun yerine ligand ile aktive olmuş EGFR, ErbB2 için heterodimerizasyon gösteren partner olarak görev alan mitojenik uyarı sinyalinin artmasına sebep olur. İnsan kaynaklı meme kanserlerinin %25'inde ErbB2 gen ekspresyonu artmıştır ve aşırı eksprese olması kötü prognoz ile ilişkilidir (12). Bu reseptörleri hedef alan tedavi stratejilerinin uygulamaları farklı basamaklarda oluşmaktadır. ErbB2'nin hücre dışı bölgesi için monoklonal antikör tanımlanmış olup in vitro olarak ErbB2 aktivasyonunu inhibe eder in vivo olarak antitümör aktivitesi mevcuttur (13).

ErbB3 ve ErbB4, EGFR ailesinin diğer transmembran tirozin kinazlardır. Her birinin yapısındaki hücre dışı ligand bağlanma bölgesine HB-EGF, betaselülin, nörogulin 1-4 gibi farklı ligandların bağlanabildiği tanımlanmıştır. İntrinsik tirozin kinaz aktivitesi ErbB3'de diğer reseptörlerin aksine bulunmamaktadır. Bunun yerine ErbB3'de hücre içi altı adet PI3K bağlanma bölgesi bulunmaktadır. PI3K ve MAPK yolları EGFR reseptörleri ile aktive olan sinyal kaskadının önemli kısmını oluşturur (10,15).

#### **4.1.5. Meme Kanser Hücrelerinde EGFR**

Yaklaşık olarak onbeş yıldır EGFR ve ErbB2'nin meme kanser oluşumunda önemli etkileri olduğu bilinmektedir. EGFR ve ErbB2'nin bu tip tümörlerde eksprese olmasının tümörün endokrin tedavilere kötü yanıt verdiği ve yaşam süresinde azalması ile ilişkili olduğu saptanmıştır (15,16). Düşük afiniteli EGFR'ler östrojen reseptör (ER) negatif meme kanser hücre soyları (MDA-MB 231 ve Hs578T) ve ayrıca ER pozitif meme kanser hücre soylarında (MCF-7, T47D, ZR-75-1'de) gösterilmiştir. ErbB2/ErbB3 heterodimerleri meme kanser hücrelerinde en yüksek mitojenik potansiyele sahiptir (10,15).

## **4.2. HÜCRE SIKLÜSÜ**

Hücre siklüsü, hücrenin ikiye bölünmesi için gerekli olan olaylar serisidir. İki major olaydan oluşur:

i) Mitoz, hücrenin çekirdek ve sitoplazmasının bölünmesi sırasındaki kısa bir zaman dilimidir. Mitoz, hücrenin bölünerek iki hücre oluşturması ile sonuçlanan bir süreçtir. Bu süreç beş belirgin aşamadan oluşur; Profaz, Prometafaz, Metafaz, Anafaz, Telofaz (17).

ii) İnterfaz, daha uzun bir zaman dilimi olup hücre boyutlarının ve içeriğinin artmasını ve genetik materyalin replikasyonunu içerir. Telofaz safhasındaki hücrede mitoz bölünme ile interfaz başlar. İnterfaz mitotik olaylar arasında geçen zamandır ve üç alt faza ayrılır:

G<sub>1</sub> (gap) Faz: DNA kopyalanması için makro moleküllerin sentezi, hücre büyümesi, RNA sentezi ve sonraki mitoz için gerekli olayların hazırlanması için gerekli safhadır.

Hücre siklüsünde her aşama birbirini tamamlayan basamaklar şeklinde ilerler ve bu basamaklarda kontrol noktaları mevcuttur. Bu kontrol noktaları geç G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>/M interfaz basamaklarındadır.

S Faz: DNA sentezi oluşur. Kromatin materyalinin oluşması için bütün gerekli nükleoproteinler histonlar dahil olmak üzere DNA molekülüne taşınıp birleştirilir.

G<sub>2</sub> (gap) Faz: DNA sentezinin sonlanıp mitozun başlaması arasındaki geçen süredir. G<sub>2</sub> fazında hücre bölünmesi için gerekli olan RNA ve proteinler sentezlenir, mitozda gerekli olan mikrotübüllerin oluşması için tübülün sentezi, DNA replikasyonu sırasında oluşan hataların analiz edilip düzeltilmesi bu fazda gerçekleşir.

Hücre siklüsü bir seri protein kinazların aktivasyonu ile ilerler. Bunlar CDKs(siklin dependent kinase)'lar siklin ile bir kompleks oluştururlar ve fosforilasyonları ile aktivasyon başlar. Siklin regülatör ünite olup CDK ise katalitik partnerdir.

Hücre siklüsü sırasında en önemli ve kontrol noktası “restricted point” (R) ,G<sub>1</sub> in son üçte birlik kısmında yer alır. S veya G<sub>2</sub>/M fazındaki hatalar büyüklüklerine göre diğer check pointler tarafından kontrol edilirler. Siklüs G<sub>1</sub> de D siklinin ekspresyonunun artması ile başlar. D siklin CDK4 ve CDK6 ile ilişkilidir birleşerek bir kmpleks oluşturular ve CDKs aktive olur. Aktive olmuş CDKs retinoblastoma proteinini fosforilize eder ve G<sub>1</sub> fazının regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.

Klinik olarak hücre siklusu kanser kemoterapisinde önemli bir rol oynamaktadır. Kemoterapatik olarak kullanılan pek çok ilaç hücre siklüsündeki belirli fazları inhibe ederek etki gösterirler.

#### **4.2.1. Hücre Proliferasyon İşaretleyicileri**

İki grup hücre proliferasyon işaretleyicisi kullanılmaktadır; nitrojen baz analogları ve endojen proliferasyon işaretleyicileri.

#### **4.2.2. BrdU İnkorporasyonu**

Hücre proliferasyonu sırasında DNA sentezinin ölçülmesinde kullanılır. Yapılan çalışmalarda hücresel DNA'da timidin yapısının ölçülmesi DNA sentezinin hücre proliferasyonu sırasında ölçülmesi açısından önemlilik kazanmıştır. Timidi'nin DNA içerisine dahil olması otoradiografi ile tanımlanabilir. Bu oldukça pahalı bir yöntem olduğundan buna alternatif olarak 5-bromo 2'- deoksi - üridine (BrdU) DNA'ya inkorporasyonu ölçülmektedir.

Bir nitrojen baz analogu olan BrdU proliferasyondaki hücreleri işaretlemek için sıklıkla kullanılmaktadır (18). Radyoaktif olmayan bir timidin analogudur ve immünohistokimyasal yöntem ile görüntülenebilir. BrdU, 1970'lerden beri izole kromozomlarda, hücre ve dokularda DNA sentezini ölçmek için kullanılan bir araçtır. DNA zincirlerine inkorpore olan BrdU'ni tayin etmek için spesifik monoklonal antikolar kullanılır. BrdU'nin antikor tarafından tanınması için DNA'nın önce denatüre edilmesi gerekir. HCl, NaOH ve bazı enzimler bu amaçla kullanılmaktadır (19). Hücre yapısındaki DNA'ya katılan BrdU buna karşılık reaksiyon gösteren monoklonal antikolar ile kolaylıkla tanımlanabilir.

#### **4.2.3. PCNA Ekspresyonu**

En sık kullanılan endojen proliferasyon işaretleyicisi PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)'dir. DNA polimeraz enzimi için gerekli bir proteindir (20,21). PCNA'nin yarılanma ömrü yirmi saattir ve ekspresyonu geç G1 ve S fazlarında artmaya başlar, G2 ve mitoz fazlarına doğru düşer (22). PCNA, DNA'nın replikasyonu ve tamiri sırasında görev alır. Klinik olarak aşırı ekspresyonu invaziv büyüme ve nükleer atipi ile ilişkilidir.

### **4.3. MEME TÜMÖRLERİ**

Her yıl dünyada bir milyon kadın meme kanseri teşhisi konularak tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Meme kanser oluşumundaki risk faktörleri şu şekilde sınıflandırılabilir: Cinsiyet, yaş ve genetik faktörler. Meme kanserleri içerisinde en sık karşılaşılan grup memenin duktal karsinomudur. Histolojik olarak memenin süt kanal epitelinden köken alır. İkinci sıklıkla karşılaştığımız ise lobuler karsinomdur. Meme kanserlerinde prognozu tümör büyüklüğü, tümör gradi, mitoz sayısı, nükleer polimorfizm, tubuler oluşum, östrojen ve

progesteron reseptör varlığı ve peritümoral vasküler invazyonun varlığı belirlemektedir. Meme kanserinde etkili olan genlerden bazıları EGFR, ErbB2, BRCA1, p53, E-Kaderin'dir.

Meme kanserleri östrojen reseptör (ER ) pozitif ve negatif olarak tanımlanabilir. ER (+) tümörler hormon tedavisine çok iyi cevap verdikleri için prognozları oldukça iyidir. ER (-) olanlar ise kötü prognozludur ve hormon tedavisine direnç gösterirler (23,24). ER (-) tümörlerde EGFR ve ErbB2 daha yüksek düzeylerde eksprese olurlar. Bu durum meme kanserlerinde prognoz açısından önemlidir. EGFR ve ErbB2 aktivasyonu, Ras/MAPK aktivitesinin artmış olduğunu gösterir ve buna bağlı olarak gen transkripsiyonu da artar. Böylece hormon terapisine dirençli meme kanser hücrelerinde artış söz konusu olur.

## 5. MATERYAL VE YÖNTEM

### 5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- 1) NaCl, Atabay AT091-950
- 2) KCl, Carlo Erba 360107
- 3) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Riedel-de Hæn 81890
- 4) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Riedel-de Hæn 8210A
- 5) HCl, Merck K23226314 632
- 6) Triton X-100, Applichem R 11116
- 7) DMEM, Sigma D5546
- 8) Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
- 9) L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
- 10) Penisilin+Streptomisin, Sigma
- 11) Fetal Calf Serum, Seromed S0115
- 12) Anti-fosfotirozin antikoru, NeoMarkers
- 13) Anti-EGFR antikoru, NeoMarkers
- 14) Anti-ErbB2 antikoru, Santa Cruz
- 15) Anti-ErbB3 antikoru, Santa Cruz
- 16) Anti-PCNA antikoru, Santa Cruz
- 17) Anti-BrdU antikoru, Sigma
- 18) Biyotinile HRP, Lot 40480457 Zymed
- 19) Biyotin-bağlı sekonder antikoru, Lot 40480457 Zymed
- 20) Streptavidin, Lot 40480457 Zymed
- 21) Aminoethylkarbazole (AEC), Lab Vision TA-060-HA
- 22) Metanol, Riedel-DC-Haen 24229
- 23) Tripsin EDTA, Biological idutries 243338
- 24) DMSO, Sigma D 2650
- 25) Boric Asit, Sigma B0252
- 26) Na<sup>2+</sup> tetra borat, Sigma

## 5.2. KULLANILAN ÇÖZELTİLER

### 1) 1XPBS

NaCl	8 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KCl	0.2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24

### 2) Borat Tamponu

Borik Asit 0,12M

Na<sup>2+</sup> tetra borate 0,05M

## 5.3. KULLANILAN YÖNTEMLER

### 5.3.1. Hücre Kültürü

MDA-MB-231 ve T47 D hücreleri %10 fetal sığır serumu ve antibiotik (100 U/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomycin) içeren (Dulbecco's modified Eagle's medium) DMEM-F12 medyumunu içinde flasklar içerisinde 37 °C de 5% CO<sub>2</sub> ve 95% O<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatörde büyütüldü.

### 5.3.2. İmmünohistokimya

Koverslipler üzerinde büyütülen hücreler ekildikten 2 gün sonra PBS ile yıkayıp metanol ile 5 dakika -20 °C'de fikse edildi. BrdU boyanacak hücreler ise fiksasyon öncesi BrdU ile 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Hücrelerin çift zincirli DNA'sı 2N HCl ile 37°C'de 30 dakika denature edildi, sonra borat tamponu ile (pH:8) nötralize edildi. PBS ile yıkandıktan sonra primer antikolar, anti-EGFR, anti-ErbB2, anti-ErbB3 ve Anti-fosfotirozin antikoru (1:1000) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra biyotin-bağlı sekonder antikor ve streptavidin ve biyotin ile HRP 30 dakika oda sıcaklığında uygulandı. Aminoethylkarbazole (AEC) substrat olarak uygulanarak hücreler görüntülendi.



## 6. BULGULAR

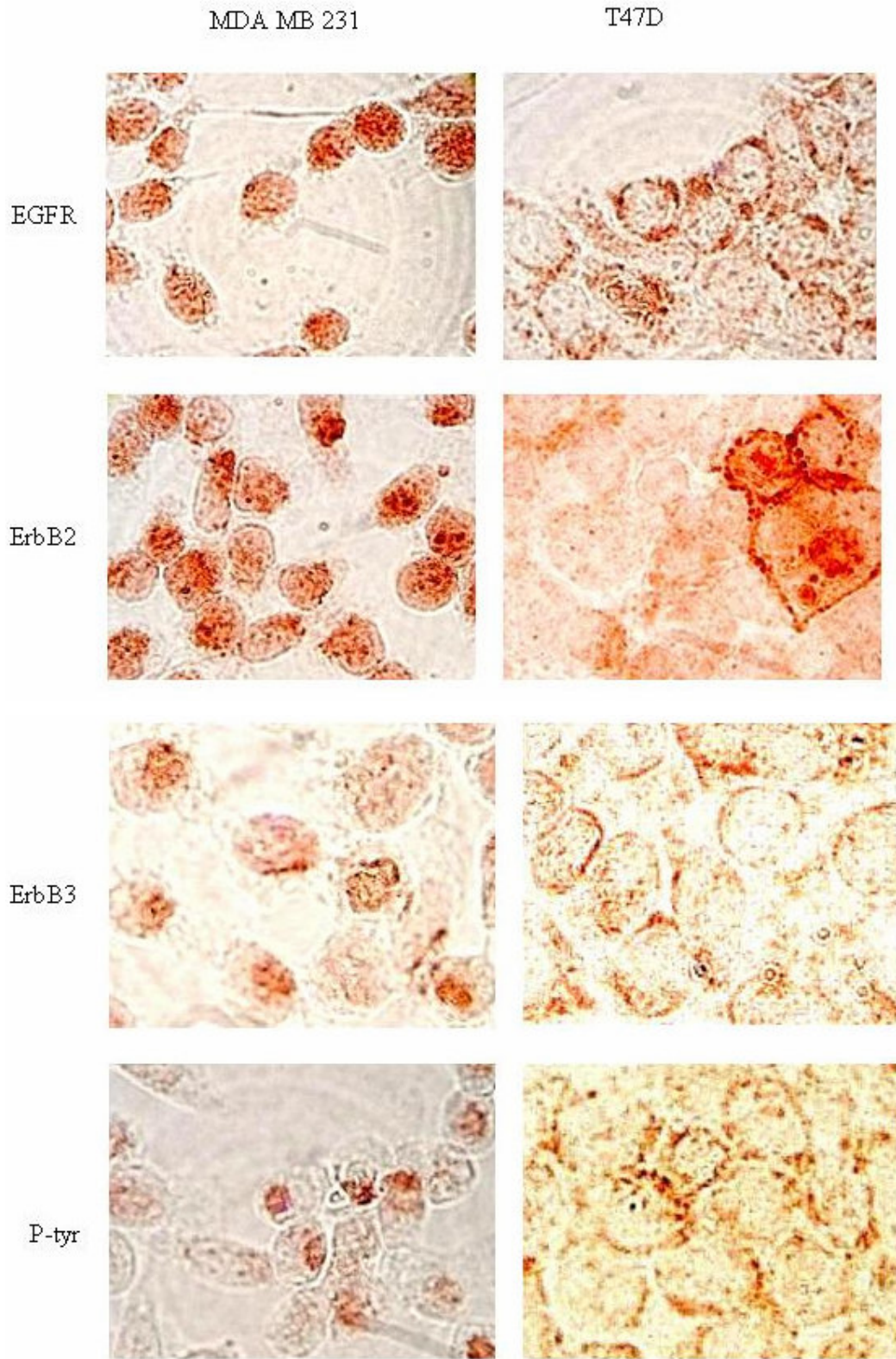
### 6.1. MDA MB 231 VE T47D MEME KANESERİ HÜCRELERİNDE ErbB RESÖPTÖRLERİNİN DAĞILIMI

Malign birer meme kanseri hücre soyu olan MDA MB 231 ve T47D hücrelerinde meme kanser hücre proliferasyonunda önemli bir aracı olan ErbB reseptörlerinin dağılımını bu reseptörleri tanıyan spesifik antikoları kullanarak immünohistokimyasal yöntemle inceledik. Daha malign bir hücre soyu olan MDA MB 231 hücrelerinde ErbB1 (EGFR) reseptörleri nükleus içinde yoğun olarak saptanırken, T47D hücrelerinde seyrek olarak hücre membranında oldukları görüldü (Şekil 2).

Bu hücrelerde daha sonra meme kanser oluşumunda overekspresyonunun malignite ile doğru orantılı olduğu bilinen ErbB2 (HER2) reseptörlerinin dağılımını karşılaştırdık. ErbB2 reseptörleri MDA MB 231 hücrelerinde EGFR'leri gibi nükleer lokalizasyon gösterirken, T47D hücrelerinde bazı hücrelerin membranında saptandı. Heregulin adlı büyüme faktörünün direkt olarak bağlanarak EGFR ve ErbB2 reseptörleri ile dimerize olmasını ve meme kanser hücre proliferasyonunu sağlayan ErbB3 reseptörleri de iki hücre soyunda ErbB2 reseptörlerine benzer fakat daha az yoğun bir dağılım gösterdi (Şekil 2).

EGFR, ErbB2 ve ErbB3 reseptörleri tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler olduklarından hücre içi tirozin fosforilasyon düzeyini anti-fosfotirozin antikoru kullanarak inceledik. Tirozin fosforilasyonu ErbB3 reseptör dağılımına benzer bir dağılım gösterdi; MDA MB 231 hücrelerinde nükleer lokalizasyon gösterirken, T47D hücrelerinde bazı hücrelerin membranında az yoğunlukta saptandı (Şekil 2).

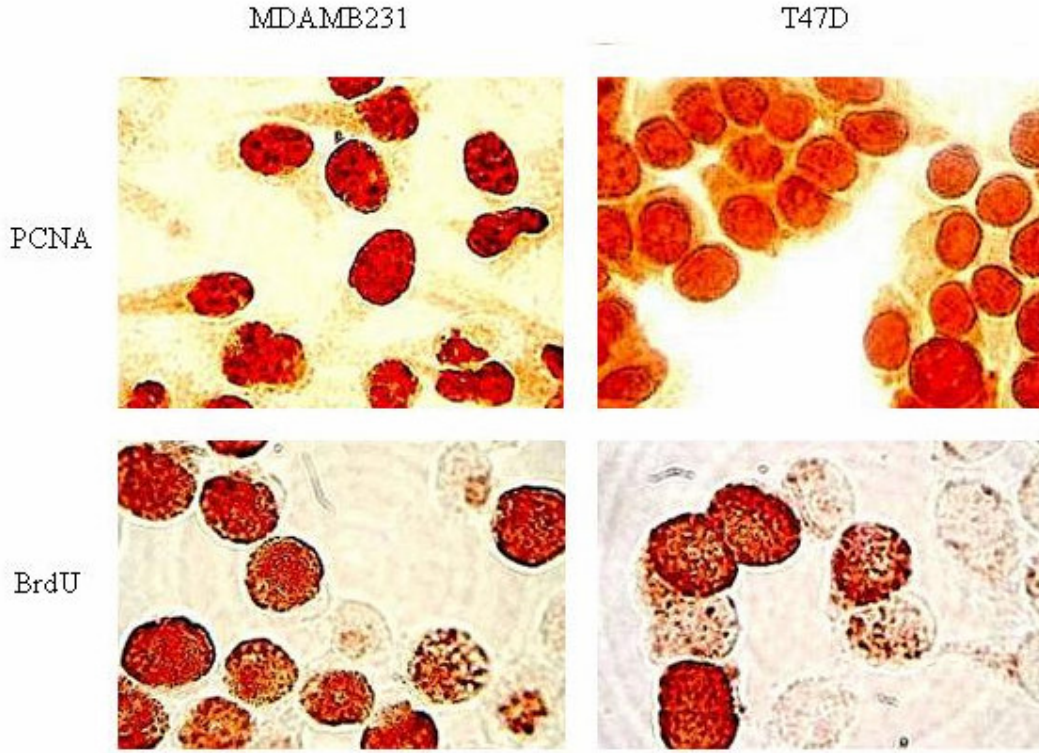
Bu çalışmada, MDA MB 231 hücrelerinde ErbB reseptör ailesinin nükleer lokalizasyon göstermesi literatürde daha malign ve metastatik olduğu bildirilen bu hücre soyunun T47D hücrelerine göre daha hızla proliferasyon göstermektedir. Fakat, yoğun nükleer EGFR ve ErbB2 ekspresyonuna rağmen fosfotirozin aktivitesinin az olması özellikle MDA MB 231 hücrelerinde ErbB reseptör aktivasyonundan başka faktörlerin de maligniteye katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.



**Şekil 2.** MDA MB 231 ve T47D hücrelerinde EGFR, ErbB2 ve ErbB3 reseptör dağılımı ve tirozin fosforilasyonunun gösterilmesi.

## 6.2. MDA MB 231 VE T47D HÜCRE PROLİFERASYONUNUN PCNA VE BrdU İLE GÖSTERİLMESİ

PCNA, pek çok tümörde işaretleyici olarak kullanılan hücre proliferasyonunu ve DNA sentezini gösteren bir proteindir. Prolifere hücrelerin nükleusunda G1-fazında sentezlenen ve bütün hücre siklusü boyunca var olan PCNA proteinine karşı üretilmiş olan antikor ile hücreleri boyadığımızda her iki hücre tipinde de nükleusta 100% boyama görüldü (Şekil 3). Bu bulgu, MDA MB 231 ve T47D hücrelerinin tamamının proliferasyonda olduğunu göstermektedir.



**Şekil 3.** MDA MB 231 ve T47D hücrelerinde PCNA ve BrdU ile hücre proliferasyonunun gösterilmesi.

PCNA proteini hücre siklusünün geç G1-fazında sentezlendiği hücre siklusü boyunca ve DNA replikasyonu sırasında var olduğu için MDA MB 231 ve T47D hücrelerinin hücre siklusünün hangi fazında olduğunu araştırdık. Bu nedenle, DNA'ya selektif olarak hücre

siklüsünün G1-S fazında inkorpore olan BrdU antikoru ile hücreleri immunositokimyasal yöntemle boyadık. MDA MB 231 hücrelerinde hücrelerin yaklaşık 63%'ü, ve T47D hücrelerinin 28%'i BrdU antikoru ile boyandı (Şekil 3). Bu durum, MDA MB 231 hücrelerinin 63%'nün G1-S-fazında olduğunu ve T47D hücrelerine göre 2.5 kat daha hızlı proliferasyon gösterdiklerini göstermektedir.

MDA MB 231 ve T47D hücrelerine ErbB2 reseptör antikoru Herceptin, veya EGFR tirozin kinaz inhibitörü Tyrophostin (AG1478) uygulandığında hücre proliferasyonunda bir değişiklik olmadığı görüldü (veriler gösterilmedi).

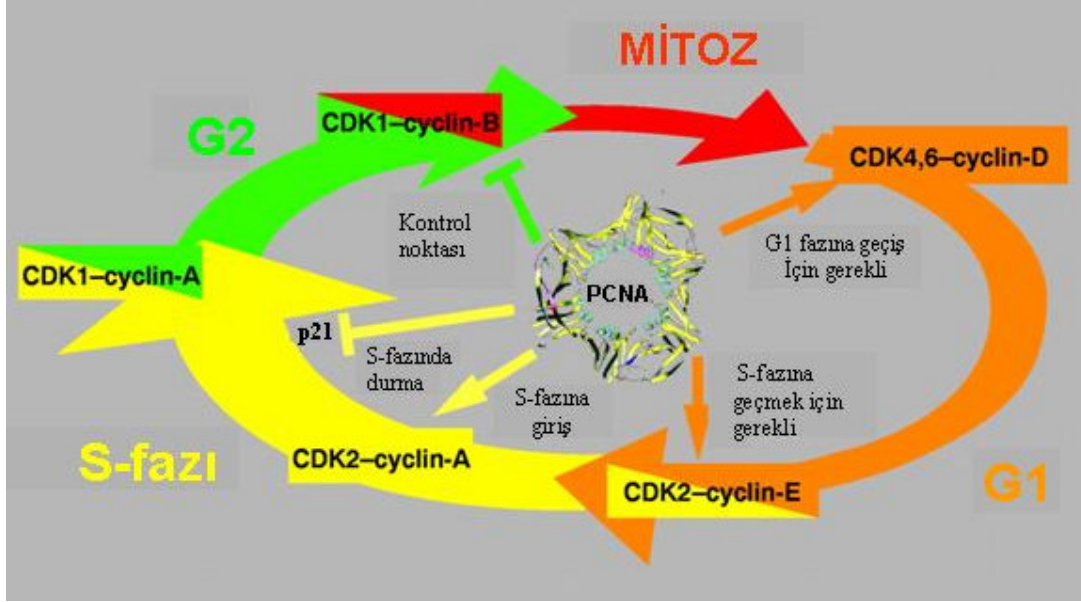
## 7. TARTIŞMA

Bu çalışmada, MDA MB 231 ve T47D insan meme kanser hücrelerinde ErbB reseptörlerinin dağılımını ve hücre proliferasyon durumunu immunositokimyasal yöntemle inceledik. MDA MB 231 hücrelerinde EGFR ekspresyonunun yüksek, ErbB2 ve östrojen reseptör (ER) ekspresyonunun ise az olduğu bundan önceki yayınlarda bildirilmiştir (25,26). Biz de buna paralel olarak MDA MB 231 hücrelerinde EGFR'lerinin ErbB2 reseptörlerine göre daha yoğun olduğunu saptadık. Her iki reseptör de nükleer lokalizasyon gösterdi, bu da MDA MB 231 hücrelerinin bildirilen yüksek oranda malign ve metastatik özelliğine paralel bir bulgudur. Heregulin'in bağlandığı ErbB3 reseptörleri ise yine nükleer fakat EGFR ve ErbB2 reseptörlerine göre daha az yoğunlukta bulundu. Ligand bağlandığında veya konstitutif olarak aktive olduklarında EGFR, ErbB2 ve ErbB3 reseptörleri homo- veya heterodimerize olarak tirozin uçlarından fosforile olurlar. Fakat, anti-fosfotirozin antikoru ile MDA MB 231 hücrelerini boyadığımızda hücre içi fosfotirozin aktivasyonun ErbB3 reseptör dağılımına benzer olsa da belirgin şekilde yüksek olmadığını gördük. Bu durum, bu hücrelerde ErbB reseptör aktivasyonundan çok downstream bir sinyal ileti proteininin konstitutif olarak aktif olduğunu ve daha çok serin/treonin fosforilasyonun hücre proliferasyonunda rol oynadığını düşündürmektedir. Buna kanıt olarak MDA MB 231 hücrelerinde Ras mutasyonu sonucu basal ERK1/ERK2 aktivasyonun yüksek olduğu bildirilmiştir (25).

T47D hücrelerinde ErbB reseptörlerinin dağılımını araştırdığımızda, MDA MB 231 hücrelerinde nükleer olan EGFR, ErbB2 ve ErbB3 reseptörlerinin T47D hücrelerinde sitoplazma membranında olduğunu gördük. ER pozitif olan bu hücrelerde (26). ErbB2 ve EGFR'lerinin az sayıda olduğu bildirilmiştir. ErbB3 reseptör dağılımı ile fosfotirozin aktivasyonu MDA MB 231 hücrelerinde olduğu gibi T47D hücrelerinde de paralellik göstermiştir. EGFR, ErbB2 ve ErbB3 reseptörlerinin plasma membranında olması ve fosfotirozin boyamasının azlığı T47D hücrelerinin MDA MB 231 hücrelerine göre daha az malign karakterli olması ile örtüşmektedir. Bu bulgular, T47D hücre proliferasyonun ErbB reseptör aktivasyonu yerine ER reseptör aktivasyonuna bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

MDA MB 231 ve T47D hücrelerini proliferasyon özelliklerine göre karşılaştırdığımızda, proliferasyon olan hücrelerde hücre siklü boyunca var olan ve hücre siklüsünün bütün fazları sırasında DNA'ya bağlı olan PCNA proteininin her iki hücrede de spesifik antikoru ile tamamen boyandığını gördük. Bu durum, MDA MB 231 ve T47D

hücrelerinin hücre siklusünün çeşitli fazlarında aktif proliferasyonda olan hücreler olduklarını göstermektedir.



Şekil 4. PCNA proteininin hücre siklusundeki rolü ( Kaynak 27’den uyarlanmıştır.)

DNA’ya selektif olarak hücre siklusünün S-fazında inkorpore olan BrdU antikorü ile hücreleri boyadığımızda ise MDA MB 231 hücrelerinin T47D hücrelerine göre yaklaşık iki katının G1-S-fazında olduğunu gördük. Bu durum, MDA MB 231 hücrelerinin daha hızlı proliferasyon gösterdiğini göstermektedir.

MDA MB 231 ve T47D hücrelerine inhibitör anti-ErbB2 reseptör antikorü *Herceptin*, EGFR tirozin kinaz inhibitörü *Tyrophostin (AG1478)* uygulandığında hücre proliferasyonunda bir değişiklik görülmemesi bu insan meme kanser hücrelerinin çoğalmasının ErbB reseptörlerinden başka faktörlere (p53, NFκ-B gibi) ya da downstream bir sinyal ileti proteininin (Ras/MAPK gibi) konstitutif olarak aktif olduğunu düşündürmektedir.



## 8. SONUÇ

- İnsan meme kanseri hücreleri olan MDA MB 231 hücrelerinde EGFR nükleus içinde yoğun olarak saptanırken, T47D hücrelerinde hücre membranında oldukları görüldü.
- ErbB2 reseptörleri MDA MB 231 hücrelerinde EGFR'leri gibi nükleer lokalizasyon gösterirken, T47D hücrelerinde bazı hücrelerin membranında saptandı.
- ErbB3 reseptörleri iki hücre soyunda seyrek, fakat ErbB2 reseptörlerine benzer bir dağılım gösterdi.
- Hücre içi tirozin fosforilasyonu ErbB3 reseptör dağılımına paralel bir dağılım gösterdi; MDA MB 231 hücrelerinde nükleer lokalizasyon gösterirken, T47D hücrelerinde bazı hücrelerin membranında az yoğunlukta saptandı.
- Yoğun nükleer EGFR ve ErbB2 ekspresyonuna rağmen fosfotirozin aktivitesinin az olması özellikle MDA MB 231 hücrelerinde ErbB reseptör aktivasyonundan başka faktörlerin de maligniteye katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.
- Pek çok tümörde işaretleyici olarak kullanılan PCNA protein ekspresyonu MDA MB 231 ve T47D hücrelerinin tamamının proliferasyonunu gösterdi.
- Hücre siklusunun G1-S fazında gerçekleşen BrdU inkorporasyonu ise MDA MB 231 hücrelerinin T47D hücrelerine göre 2.5 kat daha hızlı proliferasyonunu gösterdi.
- Bu bulgular, MDA MB 231 ve T47D hücrelerinde ErbB reseptör aktivasyonundan çok downstream bir sinyal ileti proteininin konstitutif olarak aktif olmasının veya başka faktörlerin hücre proliferasyonunda rol oynadığını düşündürmektedir.

## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin oluşmasında yol gösterici tavırlarıyla her türlü katkıyı sağlayan ve tezimi okumak için defalarca zaman ayıran sayın hocam Doç. Dr. Nedret Altıok'a, eğitim süresince ve deneylerin yapılması sırasındaki yardımlarından dolayı şakin, sevecen mizacıyla değerli hocam Yard. Doç. Dr. Meral Koyutürk'e, yoğun çalışmaları arasında deneylere yardımcı olan laboratuvar sorumluları Melike Ersöz ve Türkan Sarıoğlu'na, yetişmedi zaman yok derken hep zaman yaratıp yardıma koşan becerikli enstitü sekreterimiz İlknur Karaosmanoğlu'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim sırasında ve yaşam boyu her zaman destek olan ve arkamda durup bana güç veren annem Sevinç Karaca, babam Ömer Bestami Karaca ve abim Zafer Karaca'ya teşekkür ederim.

Tüm zorluklara rağmen bir ömür paylaşmaya karar verdiğim bana destek olan, sevdiğim, eşim Sedat Güzel'e teşekkür ederim.



## 10. KAYNAKLAR

1. Gerard Manning, Gregory D. Plowman. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in biochemical sciences*. 2002, 27: 10.
2. Favoni R. E., de Cupis A. The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: new targets for a novel pharmacological approach. *Pharmacol Rev*. 2000, 52:179-206.
3. Dan R. Robinson. The protein tyrosine kinase family of human genome. *Oncogene*. 2000, 49: 5548-5557.
4. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell*. 1995, 80: 225-236.
5. Schlessinger J. Cell Signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000, 103: 211-225.
6. Schenk P.W., Snarr-Jagalska B. E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta*. 1999, 1449:1-24.
7. Heldin G. H. Dimerization of cell surface receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1995, 80: 213-223.
8. Bertram J. S. The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med*. 2001, 21:167-223.
9. Nishikawa R. E. A. A mutant epidermal growth factor receptor common in human Glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1994, 91: 7727-7731.
10. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European J. Cancer*. 2000, 37: 3-8.
11. Wells A. Molecules in focus EGF receptor. *Int J. Biochem cell Biol*. 1999, 31: 637-642.
12. Eric K. Rowinsky, Signal Events: Cell Signal Transduction and Its Inhibition in Cancer. *The Oncologist*. 2003, 8:5-17.
13. Atalay G., Cardoso F., Awada A., Piccart M. J.. Novel therapeutic strategies targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. *Annals of Oncology*. 2003, 14:1346-1363.
14. Tovey S. M., Witton J. Caroline, Barlett J. M., Stanton P. D., Reeves J. R., Cooke T.G. Outcome and Human Epithelial Growth Factor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated using bromodeoxyuridine (BrdU) labelling. *Breast Can. Res*. 2004, 6: 3.

15. Moniola A. Olayioye. Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER2 and family members. *Breast Can. Res.* 2001, 3: 385-389.
16. Walker R. A., Dearing S. J. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Can. Res. Treat.* 1999, 53: 167-176.
17. Israels E. D., Israels L. G. The Cell Cycle. *The Oncologists.* 2000, 6: 510-513.
18. Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine: Part I. Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J.* 1995, 27: 339-369.
19. Dover R., Patel K. Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. *Histochemistry.* 1994, 102: 383-387.
20. Chuang L. S., Ng H. H., Xu G., Li B. F. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science.* 1997, 26: 277.
21. Bravo R., Macdonald B. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites, *J. Cell Biol.* 1987, 105: 1549-1554.
22. Kurki P., Ogata K. Tan E. M. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry, *J. Immunol. Methods.* 1988, 109: 49-59.
23. Knight W. A. Steroid hormone receptors and carcinoma of the breast. *Am J. Physiol.* 1982, 99: 243.
24. Livingston R. B., Gregory E. J., McGuire W. L. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Can. Res.* 1977, 37: 4669-4671.
25. Jamie N. Holloway, Shalini Murthy, Dorraya El-Ashry. A Cytoplasmic substrate of mitogen-activated protein kinase is responsible for estrogen receptor- $\alpha$  down-regulation in breast cancer cells: The Role of nuclear factor  $\kappa$ B *Molecular Endocrinology.* 2004, 18: 1396-1410.
26. Debajit K. Biswas, Antonio P. Cruz, Eva Gansberger, Arthur B. Pardee. Epidermal growth factor-induced nuclear factor  $\kappa$ B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *PNAS.* 2000, 15: 8542-8547.
27. Maga G., Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* 2003, 116: 3051-3060.

