

Meme Kanseri Hücre Dizilerinde HIF-1 alfa Ekspresyonunun PI3K/Akt Yolağı İnhibitörleri ile Kontrolü

[Regulation of HIF-1 alpha Expression By PI3K/Akt Pathway Inhibitors in Breast Cancer Cell Lines]

A.Lale Dogan¹,
Eren Çimen²,
Sevil Oskay¹,
Samet Oksuz¹,
Dicle Guç¹

Hacettepe Üniversitesi ¹Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı,

²Çocuk Hastanesi, Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, Ankara

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Doç. Dr. A. Lale Doğan

Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü,
Temel Onkoloji Anabilim Dalı 06100 Sıhhiye, An-
kara, Türkiye
Tel. 312-305 44 07
Faks.312 -324 20 09
E-Mail: laled@hacettepe.edu.tr

Kayıt Tarihi : 20 Mart 2012; Kabul Tarihi : 14 Haziran 2012

[Registered: 20 March 2012; Accepted: 14 June 2012]

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, PI3K/Akt sinyal yolağı normal olan MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre dizisi ile bu sinyal yolağında defekt taşıyan (EGFR amplifikasyonu ve PTEN mutasyonu) MDA-MB-468 hücrelerinde, dual etkili bir PI3K/mTOR inhibitörü olan PI-103'ün etkisini karşılaştırmak ve bu inhibisyonun HIF-1 alfa ekspresyonu üzerindeki düzenleyici rolünü belirleyerek PI-103'ün etkisini PI3K inhibitörü olan Wortmannin ile kıyaslamaktır.

Yöntem: Kültürdeki MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre dizileri PI3K/Akt sinyal yolağı inhibitörleri (Wortmannin ve PI-103) ile inkübe edilmiştir. Tümör hücrelerinin PI-103'e duyarlılığı MTT testi ile ölçülmüştür. Sinyal molekülleri p-Akt, total Akt, p-p70S6K ekspresyonlarına ve inhibitörlerin HIF-1 alfa ekspresyonu üzerindeki etkilerine western blot yöntemiyle bakılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: PI3K inhibitörü olan Wortmannin'in, her iki hücre dizisinde de PI3K/Akt sinyal iletimini inhibe ettiği ve HIF-1 alfa protein sentezini azalttığı saptanmıştır. PI3K-mTOR dual inhibitörü olan PI-103'ün, her iki hücre dizisinde de etkili sinyal yolağı inhibisyonu yapmasına rağmen, sadece MDA-MB-231 hücrelerinde HIF-1 alfa protein sentezini belirgin olarak azalttığı tespit edilmiştir. PTEN defekti olan MDA-MB-468 hücreleri PI-103'e daha duyarlı bulunmakla beraber, bu sonuç HIF-1 alfa ekspresyonunu belirgin olarak etkilememiştir.

Sonuç: Çalışmamız, PI-103'ün meme kanseri hücrelerinde HIF-1 alfa protein ekspresyonunu düzenlendiğini ilk kez göstermektedir. Wortmannin'in HIF-1 alfa düzeyini azaltan etkisi, PI-103'ün etkisinden daha güçlü bulunmuştur. HIF-1 alfa'nın sitoplazmik birikiminin sinyal yolağı inhibitörleri aracılığıyla azalması, PI3K/Akt inhibitörlerinin tedavi stratejilerinde artan önemi açısından dikkate değerdir.

Anahtar Kelimeler: HIF-1 alfa, PI-103, PI3K, meme kanseri, EGFR, PTEN

Çıkar çatışması: Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to compare the effect of PI-103, which is a dual PI3K/mTOR inhibitor, on MDA-MB-231 human breast cancer cell line that has an intact PI3K/Akt pathway with MDA-MB-468 cells defected in this pathway (EGFR amplification and PTEN mutation) and also to compare the effect of PI-103, to Wortmannin, which is a PI3K inhibitor, by determining the regulatory role of this inhibition on HIF-1 alpha expression.

Materials and Methods: Cultured MDA-MB-231 and MDA-MB-468 human breast cancer cell lines were incubated with PI3K/Akt signaling pathway inhibitors (Wortmannin and PI-103). Sensitivity of tumor cells to PI-103 was assessed by MTT assay. Signaling molecules p-Akt, total Akt, p-p70S6K expressions and effect of these inhibitors on HIF-1 alpha expression have been evaluated by western blotting.

Results: Wortmannin (PI3K inhibitor), inhibited PI3K/Akt signaling in both cell lines and decreased HIF-1 alpha protein expression. PI-103, which is a dual PI3K-mTOR inhibitor, decreased HIF-1 alpha expression only in MDA-MB-231 cells despite of achieving effective inhibition of signaling in both cell lines. Although PTEN deficient MDA-MB-468 cells were found to be more sensitive to PI-103, this result had no marked effect on HIF-1 alpha expression.

Conclusion: Our study shows for the first time that , PI-103 regulates HIF-1 alpha protein expression in breast cancer cells. Wortmannin was found to have much stronger effect of decreasing HIF-1 alpha protein level than PI-103. The decrease in cytoplasmic accumulation of HIF-1 alpha provided by signaling inhibitors is noteworthy with respect to the increasing impact of PI3K/Akt inhibitors in treatment strategies.

Key Words: HIF-1 alfa, PI-103, PI3K, breast cancer, EGFR PTEN

Conflict of interest: Authors have no conflict of interest.

Giriş

HIF-1 (Hipoksi ile indüklenen faktör-1) transkripsiyon faktörü, hipoksiye adaptasyon cevabının gelişiminde anahtar rol oynayan düzenleyici bir proteindir [1-3]. Bu proteinin etki ettiği mekanizmalar, çok sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücrelerin dedifransiyasyonu, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktörü üretimi, proliferasyon, invazyon ve metastaz, metabolik yeniden programlanma, tümör büyümesinin artması olarak sıralanabilir [4,5]. HIF-1 proteini, hücrede sürekli olarak ekspres edilen HIF-1 beta altünitesi ile HIF-1 alfa altünitesinin bir araya gelmesi ile oluşan bir heterodimerdir. HIF-1 alfa altünitesi, ortamda oksijen konsantrasyonunun azalmasına bağımlı olarak aktive olmaktadır. HIF-1 transkripsiyon faktörünün işlevinin düzenlenmesinde rol oynayan iki temel unsur, HIF-1 alfa'nın hipoksik koşullarda stabilizasyonu ve normoksik koşullarda degradasyonudur [6]. Hipoksik koşullar altında, HIF-1 alfa altünitesi sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirerek HIF-1 beta ile dimer oluşturur. Çekirdekteki diğer kofaktörlerin de bağlanması ile aktive olan HIF-1, DNA üzerinde "hipoksi cevap elemanı" olarak tanımlanan özgül diziyeye bağlanır ve hedef genlerin ekspresyonunu tetikler. Normoksik koşullar altında ise, HIF-1 alfa altünitesi ubiquitinasyon yolu ile proteozomda degrade olur [1,6]. Fosfatidilinozitol 3-kinaz/Akt (PI3K/Akt) sinyal yolağı insan kanserlerinin çoğunda kontrolsüz olarak aktivite göstermektedir. Kontrolsüz aktivasyonda, büyüme faktörü reseptörlerinin (EGFR,HER2) amplifikasyonu, aşırı sentezi ve/veya mutasyonları da etkili olmaktadır [7]. Bu yolak, tümör hücrelerinin proliferasyonu ve sağkalımı, migrasyon ve invazyon, tümör büyümesi ve anjiyogenez gibi karsinogenezde çok önemli yeri olan süreçlerin idamesinde rol oynayan moleküllerin aktivitelerini düzenler [7-9]. PI3K/Akt yolağının aktivasyonu sonucunda *mammalian target of rapamycin* (mTOR) proteini aracılı olarak HIF-1 alfa'nın translasyonu artmaktadır (Şekil 1). Bu yolağın negatif düzenleyicisi olan *phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10* (PTEN) tümör baskılayıcı proteininin mutasyona bağlı olarak aktivite kaybına uğraması, PI3K/Akt aracılı sinyal iletiminin denetimsiz bir aktivasyon artışı ile sonuçlanmaktadır [10]. Böylece, mTOR aktivitesinin artmasına bağlı olarak HIF-1 alfa protein sentezi de artmaktadır [11]. Buna göre, HIF-1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve diğer hedef genlerin ekspresyonunun artması ve anjiyogenezin hızlanması söz konusudur [12-13]. PI-103 (piridofuropirimidin), PI3K ve mTOR moleküllerini inhibe ederek PI3K/Akt aracılı sinyal iletimini durdurur [14]. mTOR proteini, bir serin/treonin kinaz olup, hem mTORC1 hem de mTORC2 komplekslerinin içinde yer alır. Hücrenin besin ve enerji kaynakları yeterli olduğunda mTORC1 p70S6K'ı fosforile ederek hücrede protein sentezini uyarır. mTORC2 ise büyüme ve sağkalım sinyallerine etki etmektedir [15]. PI-103'ün hem PI3K'e hem de mTOR'un içinde

yer aldığı komplekslere karşı etkili olduğu gösterilmiştir [16,17]. Potent bir inhibitör olan bu ajan insan kanser hücre dizilerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve sağkalımını inhibe etmektedir. Bu etki prostat, akciğer, meme, kolon ve glioblastoma hücre dizilerinde gösterilmiştir [16].

PI3K/Akt yolağının etkili bir şekilde inhibisyonu HIF-1 sentezini de baskılayarak antitümöral etkiyi güçlendirebilir. Bu çalışmanın amacı; meme kanseri hücre dizilerinde PI3K/Akt sinyal yolağının PI-103 ile farmakolojik olarak inhibisyonunu sağlamak ve ilk kez bu inhibisyonun normoksik koşullarda HIF-1 alfa ekspresyonuna etkisini incelemektir. Buna göre, PI-103'ün etkisi, PI3K/Akt yolağı normal olan MDA-MB-231 ile PTEN mutasyonu ve EGFR amplifikasyonu nedeniyle kontrolsüz yolak aktivasyonu olan MDA-MB-468 meme kanseri hücrelerinde karşılaştırılacak ve HIF-1 alfa ekspresyonu üzerindeki düzenleyici rolüne açıklık getirilecektir. Ayrıca, her iki hücre dizisinde, dual etkili bir PI3K/mTOR inhibitörü olan PI-103'ün etkisi, PI3K inhibitörü olan Wortmannin ile karşılaştırılacaktır.

Gereç ve Yöntemler

Kimyasallar

Tavşan anti-p-p70S6 kinaz (S371) mAb, fare anti-p-Akt (S473) mAb, tavşan anti-Akt mAb ve Wortmannin Cell Signaling Technology'den, fare anti-HIF-1 alfa mAb BD Biosciences'dan, keçi anti-tavşan peroksidaz bağlı Ab Dako'dan, PI-103 Cayman Chemical'dan, Akriamid, Tris ve Tween 20 Appllichem'den, MTT, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), bütül alkol, Sodyumdodesil sülfat (SDS), dimetil formamide (DMF), fare anti- β -aktin Ab ve tripan mavisi Sigma'dan, Amonyum per sülfat (APS) Riedel-de haen'den, TEMED ve dimetilsülfoksit Amresco'dan, keçi anti-fare peroksidaz bağlı Ab, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), tripsin, NP40 ve West femto ECL analiz kiti Thermo Scientific'den, I blot gel transfer stacks PVDF regular, jel Nupage %4-12 bis-tris gel ve epidermal büyüme faktörü Invitrogen'den, fetal sığır serumu (FBS) Biological Industries'ten, L-glutamin ve penisilin/streptomisin Biochrom'dan, *phosphate buffered saline* (PBS) Oxoid'den, Proteaz inhibitör kokteyl (PIC) Roche Diagnostic'ten, protein kantitasyon kiti Biorad'tan, brom fenol mavisi ve merkaptotanol Merck'ten ve gliserol Biotech'ten sağlandı.

Hücre Kültürü

MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 insan meme kanseri hücre dizileri ATCC (*American Type Culture Collection*) tarafından sağlandı. Çalışmamızda kullanılan MDA-MB-231 hücreleri, orta düzeyde EGF reseptörü taşıyan ve PTEN defekti olmayan, ancak mutant Ras proteini taşıyan meme kanseri hücre dizisidir. Buna karşılık, MDA-MB-468 meme kanseri hücre dizisinde EGF reseptör ekspresyonu yüksek düzeyde olup, PTEN defekti mevcuttur [18,19,20]. Hücreler DMEM kültür or-

tamında 2 mM L-glutamin, %10 FBS, %1 (v/v) antibiyotik eklenerek çoğaltıldı. Her dört günde bir besi yeri değiştirilerek ve haftada bir kez tripsinle pasaj yapılarak kültür ortamının devamlılığı sağlandı. Deneylerde ilk 10 pasaj kullanıldı.

PI-103'e Duyarlılığın MTT Testi ile Ölçümü

Çalışmamızda Hansen ve arkadaşlarının MTT yöntemi modifiye edilerek kullanıldı [21]. Buna göre, tümör hücreleri, 96 kuyulu plaklara 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler 37°C 'de %5 CO_2 'li etüvde bir gece bekletildikten sonra, son konsantrasyon aralığı 0.01-100 μM olacak şekilde PI-103 uygulandı. Aynı koşullarda ilaçsız olarak inkübe edilen hücreler kontrol olarak kullanıldı. 72 saat sonra hücrelerin üzerine MTT (1mg/ml) ilave edildi. 4 saat inkübasyondan sonra % 45 DMF içinde çözülmüş % 23 SDS çözeltisi eklendi. 12 saat sonra 570 nm'de ekstraksiyon tamponuna karşı (OD) değerleri okundu. Ortalama OD değerleri hesaplandıktan sonra % canlılık saptandı. Wortmannin'in subtoksik dozu bilindiği için, bu ajan ile MTT testi yapılmadı.

Hücrelerin Kültür Ortamında EGF ve İnhibitörler ile İnkübasyonu

Hücreler 2×10^6 sayıda olacak şekilde 6 kuyulu plaklara ekildi. Bir gün sonra serumsuz besiyeri eklendi. 24 saat serum starvasyonundan sonra, son konsantrasyonu 50 ng/ml olacak şekilde EGF (1-8 saat) ile inkübe edildi. İnhibitör ile muamele edilen hücrelerde ise, serum starvasyonundan sonra, ilk olarak bir saat süreyle Wortmannin (1 μM) ve PI-103 (1 μM) ile inkübasyon uygulandı. Hücreler bu işlemin arkasından 50 ng/ml EGF ile muamele edildi. İnkübasyon sonrasında, kuyulardaki hücreler $+4^\circ \text{C}$ 'de PBS ile yıkandı. Kuyulara proteaz inhibitör kokteyli içeren lizis tamponu (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM EDTA, %1 NP-40) eklenerek hücrelere buz üzerinde kazıma işlemi uygulandı. Kazınan hücreler buz üzerinde bekletilmiş eppendorflara alındı ve $+4^\circ \text{C}$ 'de 13000 rpm de 5 dk santrifüjlendi ve örnekler deneyler yapılınca kadar -80°C 'de saklandı [22].

Hücrelerde p-Akt, total Akt, p-p70S6K ve HIF-1 alfa Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi ile Gösterilmesi

Wortmannin veya PI-103 ile bir saat muamele edilmiş ve EGF ile uyarılmış olan hücre lizatlarında Bradford kiti ile protein tayini yapıldı. Her bir örnekten 100 μg protein %10'luk poliakrilamid jel elektroforezine yükledi ve 1 saat süresince yürütüldü. Daha sonra jel üzerindeki proteinler PVDF membrana transfer edildi. HIF-1 alfa için, anti- HIF-1 alfa fare mAb (1:1000), p-Akt için, p-Akt (Ser473) fare mAb, (1:1000), total Akt için, Akt tavşan mAb (1:1000), p-p70S6 kinaz için, p-p70S6 kinaz (Ser371) tavşan Ab (1:1000), beta aktin için, fare mAb (1:5000) kullanıldı. Ertesi gün primer mAb uzaklaştırıldı ve membran distile su ile yıkanarak ikincil anti-kor ile muamele edildi. İkincil anti-kor olarak, HIF-1 alfa,

p-Akt ve total Akt için keçi anti-tavşan Poliklonal İmmunoglobulin / HRP (1:1000) kullanıldı. P-p70S6K için (1:1000) ve beta aktin için (1:5000) Pierce tavşan anti-fare IgG (H+L) antikoru kullanıldı. Membran üzerinde işaretlenmiş olan bantlar West Femto ECL kiti kullanılarak görünür hale getirildi ve Kodak Gel Logic 1500 Imaging System (Carestream Healty Inc) ile görüntüledi. Kodak *Molecular Imaging Software Standard Edition* v.5.0.0.27 programı ile dansitometrik analiz yapıldı.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler "Student t testi" ile *GraphPad Prism Version 5.0* programı kullanılarak yapıldı ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

PI-103 'ün Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisi

PI-103'ün doza bağımlı etkisi incelendiğinde, 1 μM inhibitör dozu ile MDA-MB-231 hücrelerinde % 89 ve MDA-MB-468 hücrelerinde ise % 56 canlılık elde edildi (Şekil 2) Her iki hücre dizisinde de subtoksik olan bu doz ile inhibisyon deneylerine geçildi.

EGF ile PI3K/Akt Yolağı Uyarımının HIF-1 alfa Ekspresyonu Üzerine Olan Etkisi

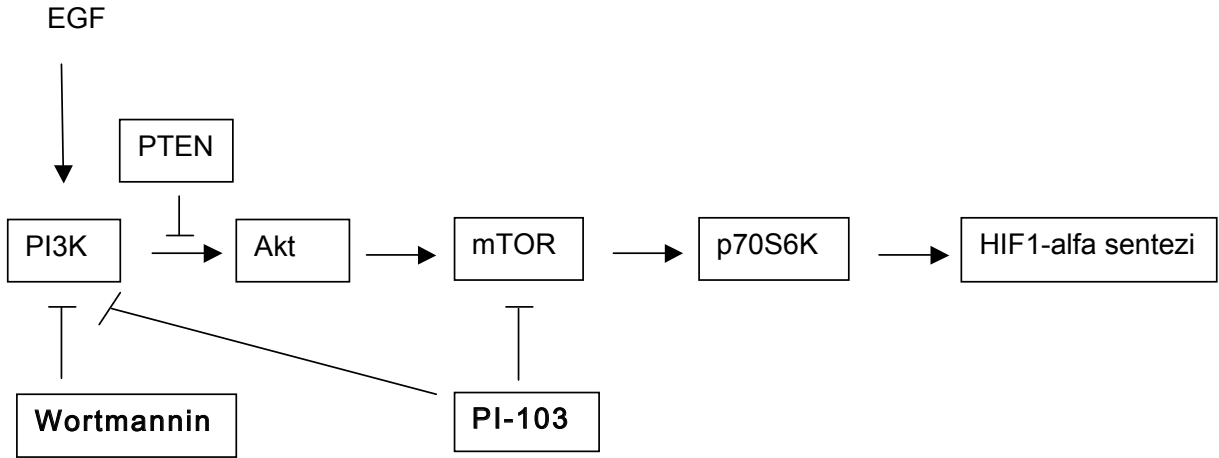
Hücre dizileri EGF ile farklı süreler ile uyarıldığında, MDA-MB-231 hücrelerinde zamana bağlı HIF-1 alfa ekspresyonu artışı daha yavaş olarak izlendi ve 8 saatin sonunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 3). MDA-MB-468 hücrelerinde ise, bir saatin sonunda HIF-1 alfa ekspresyonunda anlamlı artış izlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4).

MDA-MB-231 Hücrelerinde PI3K/Akt Sinyal Yolağı İnhibisyonunun HIF-1 alfa Ekspresyonu Üzerine Olan Etkisi

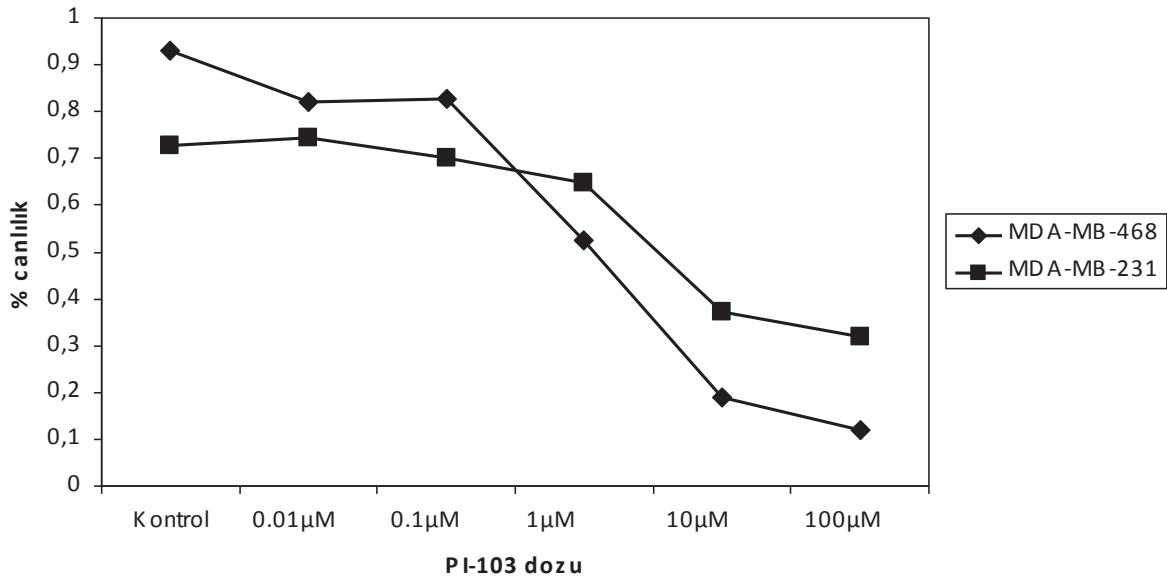
MDA-MB-231 hücrelerinde EGF varlığında ve yokluğunda Wortmannin ve PI-103 ile inhibisyona bağlı olarak p-Akt ekspresyon düzeylerinde belirgin azalma gözlenirken total Akt düzeyinin değişmediği saptandı. Her iki inhibitörün, p-p70S6K ekspresyonu üzerine olan etkisi zayıf bulundu. HIF-1 alfa ekspresyonu EGF ile uyarılmayan hücrelerde çok düşük düzeyde tespit edildi. EGF ile uyarılan hücrelerde ise, inhibitörlere bağlı olarak HIF-1 α ekspresyonlarının azaldığı gözlemlendi. PI-103 ile % 30,3 oranında azalma tespit edilirken, Wortmannin ile bu oranın % 42,6'ya ulaştığı saptandı. Wortmannin'in HIF-1 α ekspresyonunu daha güçlü olarak inhibe ettiği belirlendi (Şekil 5).

MDA-MB-468 Hücrelerinde PI3K/Akt Sinyal Yolağı İnhibisyonunun HIF-1 alfa Ekspresyonu Üzerine Olan Etkisi

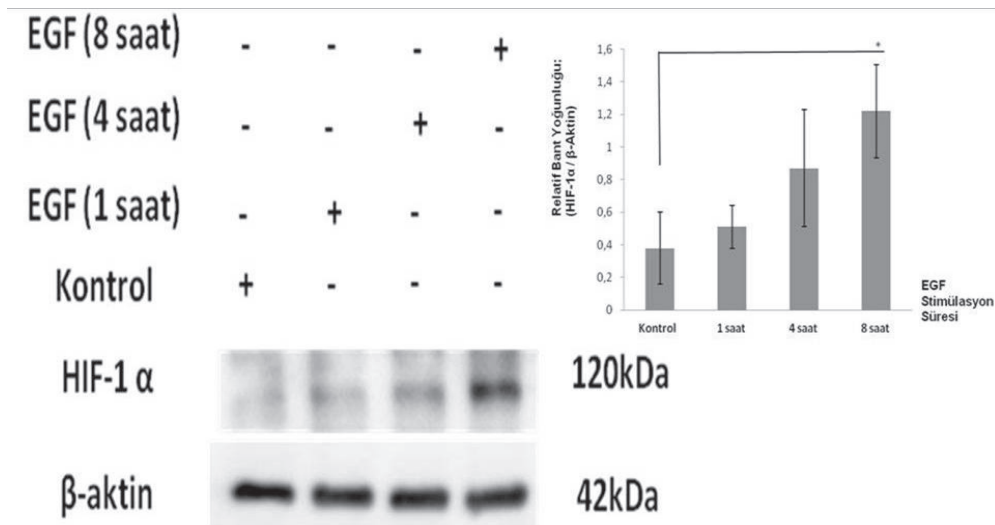
MDA-MB-468 hücre dizisinde, EGF ile uyarılmayan hücrelerde, PI-103 ve Wortmannin varlığında p-Akt ekspresyon düzeyinde % 90'ın üzerinde azalma tespit



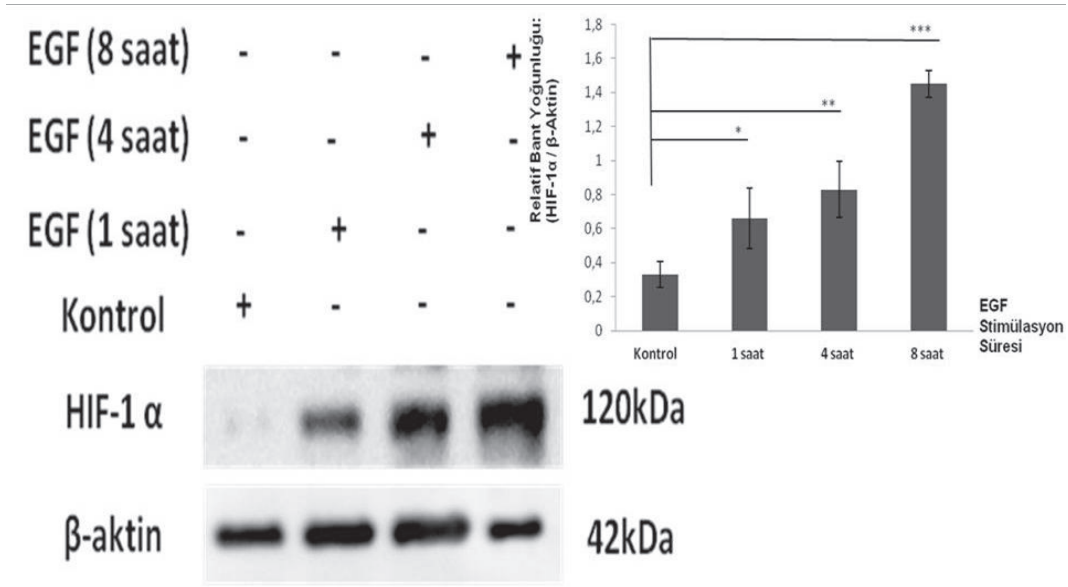
Şekil 1. PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonu ve HIF1-alfa sentezinin düzenlenmesi



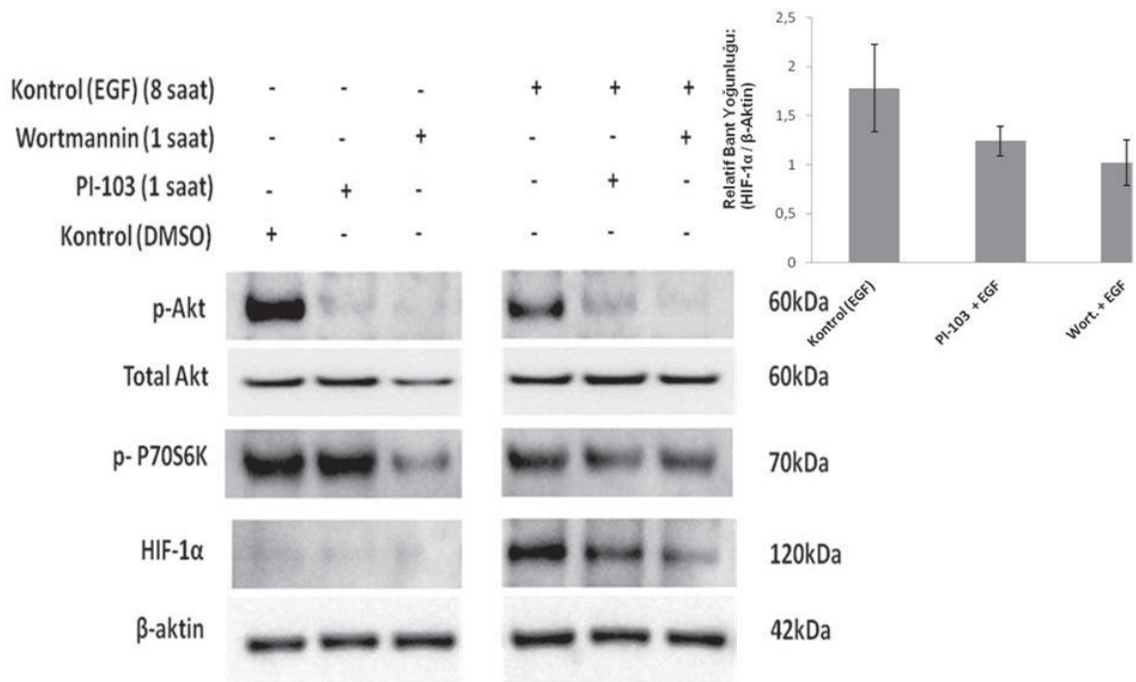
Şekil 2. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre dizilerinde PI-103 1 µM konsantrasyonda subtoksik etki göstermektedir.



Şekil 3. MDA-MB-231 hücrelerinde EGF stimülasyonu HIF1-alfa ekspresyonunu 8.saatte anlamlı olarak artırmaktadır (*p<0,05, n=3).



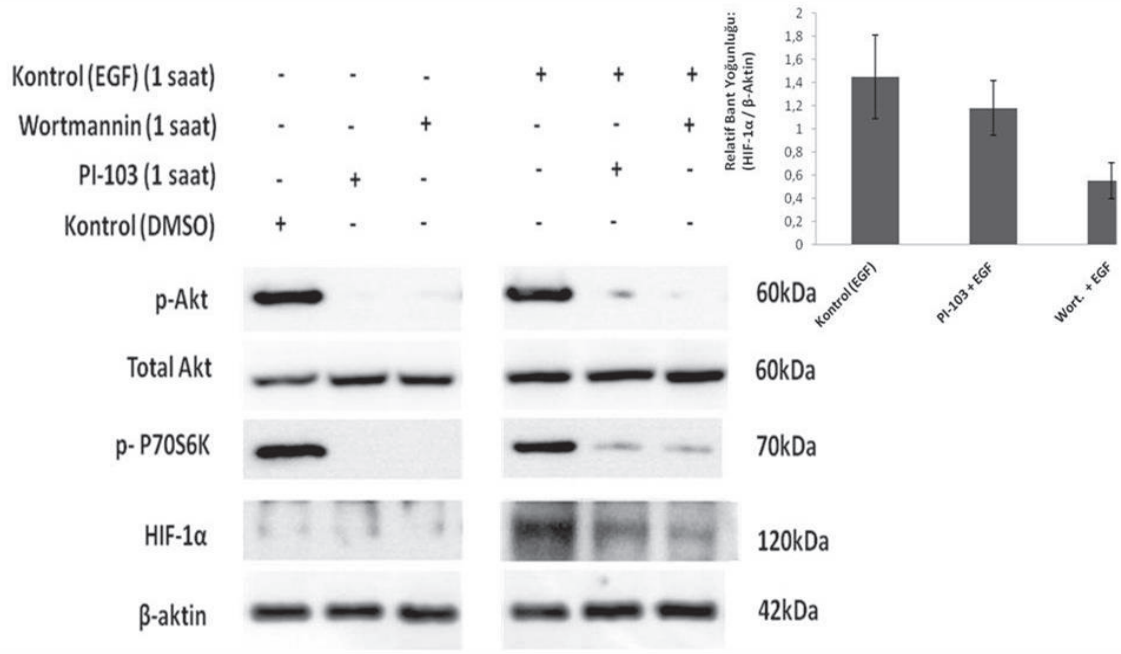
Şekil 4. MDA-MB-468 hücrelerinde EGF stimülasyonu HIF1-alfa ekspresyonunu birinci saatten itibaren anlamlı olarak artırmaktadır (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, n=3).



Şekil 5. EGF ile uyarılan MDA-MB-231 hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının Wortmannin ve PI-103 ile inhibisyonuna bağlı olarak HIF1-alfa ekspresyonu inhibe olmaktadır.

edildi. EGF ile uyarılan hücrelerde de, bu etki yine güçlü olarak izlendi. MDA-MB-231 hücreleri ile kıyaslandığında, MDA-MB-468 hücrelerinde daha güçlü p-Akt inhibisyonu görüldü. Her iki inhibitör ile total Akt düzeyinin değişmediği gözlemlendi. MDA-MB-468 hücrelerinde, EGF varlığında ve yokluğunda inhibitörlere bağlı olarak p-p70S6K ekspresyon düzeylerinde de belirgin azalma saptandı. MDA-MB-468 hücre dizisinde, MDA-MB-231 hücrelerine kıyaslandığında, p-p70S6K inhibisyonunun daha güçlü olduğu izlendi. MDA-MB-468 hücrelerinde

de, HIF-1 alfa ekspresyonu EGF ile uyarılmayan hücrelerde çok düşük düzeyde tespit edildi. EGF ile uyarılan hücrelerde ise, inhibitörlere bağlı olarak HIF-1α ekspresyonlarının azaldığı gözlemlendi. PI-103 varlığında %18,6 oranında azalma tespit edilirken, Wortmannin'e bağlı azalma oranı % 62 olarak saptandı. MDA-MB-468 hücrelerinde PI-103'ün HIF-1 alfa'nın ekspresyonuna etkisi zayıf olarak izlendi. Buna karşılık Wortmannin'in etkisi ise daha belirgin tespit edildi (Şekil 6).



Şekil 6. EGF ile uyarılan MDA-MB-468 hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının Wortmannin ve PI-103 ile inhibisyonuna bağlı olarak HIF1-alfa ekspresyonu inhibe olmaktadır.

Tartışma

PI3K/Akt yolağının aktivasyonu, normoksik koşullarda HIF-1 alfa proteininin *de novo* sentezini arttırmak suretiyle, hücre içindeki HIF1α havuzunu genişletmekte ve böylece bu transkripsiyon faktörünün etkinliğine katkı sağlamaktadır. Meme kanserinde, HIF-1 alfa ekspresyonunun arttığı ve bunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir [3]. Meme kanseri hücrelerinde, hem intratumöral hipoksiye bağlı olarak HIF1α aktivasyonu tetiklenmekte, hem de onkogenik sinyal iletimine bağlı olarak protein sentezinde artış olabilmektedir.

PI-103'ün tümör hücreleri üzerindeki doza bağlı sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile incelendiğinde, her iki hücre dizisinde de 1 µM ilaç dozunun subtoksik etkili olduğu teyit edildi [16]. PTEN defekti olan meme kanseri hücre dizilerinin, bu defekti taşımayan dizilerle kıyaslandığında, çeşitli PI3K inhibitörlerine karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir [10,23]. Bizim deneylerimizde de, MDA-MB-468 hücrelerinin 1 µM PI-103'e daha duyarlı yanıt verdiği saptandı.

HIF-1 alfa protein düzeyi ve bu proteinin fonksiyonel etkinliği hücre tipine ve hücrenin uyarılma şekline göre değişmektedir. *In vitro* olarak reseptör aktivasyonu ile ortaya çıkan HIF-1 alfa sentezindeki artışın hipoksidede görülen artışa kıyasla daha zayıf olduğu savunulmaktadır [11]. Çalışmamızda, MDA-MB-231 hücrelerinde EGF ile 8 saat stimülasyonun ardından HIF-1 alfa ekspresyonunda anlamlı artış saptanmıştır. PTEN defekti taşımayan DU145 prostat kanseri hücrelerinde de, EGF'nün HIF-1 alfa ekspresyonunu posttranskripsiyonel olarak arttırdığı bildirilmektedir [24]. MDA-MB-468 hücrelerin ise, EGF ile stimülasyon sonrası birinci saatin sonunda HIF-1α ekspresyonunda anlamlı ar-

tış saptanmıştır. İki hücre dizisi arasında, EGF uyarısının HIF1 alfa protein sentezine etkisinin ortaya çıkışında görülen zamana bağlı farklılık, hücrelerin PTEN düzeyi ile ilişkili olabilir. PTEN defektinin, Akt aktivasyonunu arttırması ve HIF-1 alfa protein sentezinin daha kısa sürede indüklenmesine yol açması mümkündür. Bu sonuçlarımız, PTEN defektinin HIF-1 alfa protein düzeylerinde artışa neden olduğunu gösteren diğer çalışmalar ile uyumludur [24,25].

Çalışmamızda, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre dizilerinde HIF-1 alfa ekspresyonunda EGF uyarısına bağlı olarak gördüğümüz artışın PI3K bağımlı olup olmadığını ortaya koymak için, bir PI3K inhibitörü olan Wortmannin ile dual etkili bir PI3K/mTOR inhibitörü olan PI-103'ün etkileri karşılaştırılmıştır. PI3K'ın p110 adlı katalitik altbirimi ile mTOR proteini yapısal benzerlikler taşırlar. Böylelikle, küçük molekül yapısındaki dual etkili inhibitörler sıklıkla her iki proteini de inhibe ederler. p110 altbiriminin tüm izoformlarının (α, β, δ) ve mTORC1 ile mTORC2 protein komplekslerinin tam inhibisyonu sağlandığında, PI3K/Akt/mTORC1 sinyali etkin bir şekilde kesilmektedir [7]. Dual etkili inhibitörlerin PI3K/Akt/mTORC1 sinyaline karşı daha etkili olmaları ve güçlü inhibisyon sağlamaları beklenmektedir. PI3K, substratı olan Akt proteininin Treonin-308 rezidüsünden fosforilasyonunu sağlar. Bu fosforilasyon, Akt'ın kinaz aktivitesi için esansiyeldir [26]. Akt'ın mTORC2 tarafından düzenlenen Serin-473 rezidüsünden fosforilasyonu ise, proteinin aktif konformasyonunu stabilize etmektedir [27]. Wortmannin, tersinmez bir PI3K inhibitörüdür ve hücre kültürlerinde yarı ömrü 8-13 dakika olarak bilinmektedir. Çalışmamızda, bir saat süreyle 1 µM Wortmannin ile inkübe edilen MDA-MB-231 hü-

relerinde p-Akt (Ser 473) ekspresyonunda azalma izlenmiştir. Wortmannin'in uygulanmasının ardından EGF ile uyarılan hücrelerde de bu inhibisyon tespit edilmiştir. Bu deneylerimizde, PI-103 ile inkübasyon süresi de bir saat ile sınırlandırılarak, Wortmannin'in etkisi ile kıyaslama yapıldığında, PI-103'ün, 1 µM dozda p-Akt oluşumuna etkisi belirgin azalma olarak tespit edilmiştir. mTORC1'in birinci jenerasyon inhibitörleri olan Rapamisin ve analogları, p70S6K 'ın fosforilasyonunu önlerken, PI3K'ın da geri-bildirim yolu ile yeniden aktivasyonuna yol açarlar [28,29]. Dual etkili PI3K-mTOR inhibitörlerinin, bu yeniden aktivasyonu yatıştırma ve daha güçlü terapötik etki oluşturma olasılığı söz konusudur. MDA-MB-231 hücrelerinin Rapamisin ve analoglarına dirençli olduğu bilinmektedir [28]. Bu durum, PI-103'ün bu hücrelerdeki etkisini daha da dikkate değer kılmaktadır. Deneylerimizde, MDA-MB-231 hücrelerinde, bütün koşullarda, p-p70S6K ekspresyonundaki azalmanın zayıf olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, bu hücrelerde PI-103'ün mTORC1 seviyesindeki etkisinin, PI3K seviyesindeki etkisi kadar güçlü olmadığına işaret etmektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde, PI3K/Akt yolağının inhibisyonuna rağmen rezidüel fosforile p70S6K ekspresyonunun görüldüğü ve bu sonucun MDA-MB-231 hücrelerinde mevcut olan mutant Ras ekspresyonuna bağlı olduğu bildirmiştir [20]. Çalışmamızın PI-103 ile elde edilen sonuçları, bu tespit ile de korelasyon göstermektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde, PI-103 aracılı mTOR inhibisyonuna kısmen direnç görülmeyle beraber, p-Akt oluşumunda inhibisyonun izlenmesi, dual etkili inhibitörün, bu hücre dizisinde sinyal yolağını başlangıç kinazı konumundaki PI3K seviyesinde kesintiye uğratan potent bir ajan olduğunu göstermektedir. Torbett NE ve arkadaşları da, MDA-MB-231 dizisinin, PI-103 ile mTOR'un inhibisyonuna kısmen duyarlı olduğunu bildirmektedir [20]. MDA-MB-231 hücrelerinde, hem Wortmannin hem de PI-103 aracılı olarak PI3K seviyesinde sağlanan etkili inhibisyon, HIF-1 alfa protein düzeyinin önemli ölçüde azalmasını sağlamıştır. PI3K'ın HIF1 ekspresyonunu HIF-1 alfa alt ünitesine özgül olarak etkilediği bilinmektedir [24]. Çalışmamızda, MDA-MB-231 hücrelerinde bazal HIF-1 alfa düzeyinin düşük olması dikkat çekerken, EGF stimülasyonu ile uyarılan HIF-1 alfa sentezinin, PI3K inhibitörlerine yanıt vermesi, bu sinyal yolağının, MDA-MB-231 hücrelerinde HIF-1 alfa proteini üzerindeki düzenleyici rolünü doğrulamaktadır. MDA-MB-468 hücrelerinde, hem Wortmannin hem de PI-103 ile PI3K /Akt yolağının çok etkili biçimde inhibisyonunun sağlanması, literatürde yer alan diğer çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur [10,20]. Ancak, bu güçlü inhibisyonun HIF1 alfa ekspresyonu üzerindeki etkisi açısından iki inhibitör arasında farklılık gözlenmiştir. Wortmannin ile inhibisyon sonrasında, HIF-1 alfa ekspresyonunun güçlü düzeyde azaldığı saptanmıştır. Buna karşılık, PI-103'ün düzenleyici etkisi daha zayıf bulunmuştur. MDA-MB-468 hücrelerinde,

bir mTOR inhibitörü olan AZD8055 reseptör tirozin kinaz ekspresyonunda ve aktivitesinde artışa yol açmaktadır [17]. AZD8055 ile PI-103'ün etki mekanizmalarının aynı olması (ATP-kompetitif mTOR inhibitörü) dikkate alındığında, PI-103'ün de benzer bir aktivasyonu tetiklemesi olasıdır. Bu aktivasyonun, MDA-MB-468 hücrelerinde HIF-1 alfa protein ekspresyonunda güçlü bir inhibisyon görmemize engel olması mümkündür. Son olarak, bu hücrelerde Hsp70 şaperon proteininin normoksik koşullarda HIF-1 alfa 'nın stabilizasyonunu tetiklemesi de, HIF-1 alfa yüksekliği ile ilişkili olası mekanizmalar arasında sayılabilir [30]. PI-103'ün MDA-MB-468 hücrelerinde migrasyon ve invazyonu inhibe ettiği bilinmektedir [16]. Dolayısıyla, dual etkili bu inhibitörün MDA-MB-468 hücreleri için potent bir ajan olduğunu göz ardı etmemek gerekir.

HIF-1 alfa transkripsiyon faktörü, sadece HIF-1 beta ile dimer oluşturmaktadır ve bu heterodimerin oluşumunda kısıtlayıcı rol oynayan bileşendir [24]. HIF-1 alfa'nın ekspresyon düzeyinde azalma, HIF1'in DNA'ya bağlanma yeteneğini de bozacak ve etkilediği hedef genlerin ekspresyonlarını azaltacaktır. Bu nedenle, PI3K/Akt yolağı inhibitörlerin HIF-1 alfa protein sentezi üzerindeki düzenleyici rollerinin açıklığa kavuşturulması, HIF1 protein kompleksinin tümör hücrelerindeki etkisini ortadan kaldırma stratejilerine önemli katkılar sağlayacaktır.

Teşekkür

Çalışmamızda kullandığımız MD-MB-231 hücre dizisini hediye eden Dr. Elif Erson'a ve MDA-MB-468 hücre dizisini hediye eden Dr. Işık Yuluğ'a teşekkür ederiz.

Yazarların Görev Dağılımı: **ALD;** Çalışmanın planlanması, hücre kültürlerinin hazırlanması ve idamesi, MTT deneyleri, sonuçların analizi ve makalenin yazılması; **EÇ;** HIF1 alfa ekspresyon analizlerinin yürütülmesi, sonuçların analizi ve makalenin yazılması; **SO;** Fosfoprotein ekspresyon analizlerinin yürütülmesi; **SÖ;** İlaç uygulamaları, lizat hazırlama ve fosfoprotein analizlerinin yürütülmesi; **DG;** Sonuçların analizi, makalenin hazırlanmasına katkı.

Çıkar çatışması: Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

- [1] Shafee N, Kaluz S, Ru N, Stanbridge EJ. PI3K/Akt activity has variable cell-specific effects on expression of HIF target genes, *CAG* and *VEGF*, in human cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2009; 282(1):109-15.
- [2] Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 2010; 29(5):625-34.
- [3] Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *N Engl J Med* 2011; 365(6):537-47.
- [4] Patiar S, Harris AL. Role of hypoxia-inducible factor-1 α as a cancer therapy target. *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13:61-75.
- [5] Semenza GL. Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Cancer Lett* 2007;12(19-20):853-59.

- [6] Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 alpha. *Cell Death Differ* 2008; 15(4):621-27.
- [7] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(8):550-62.
- [8] Berchner-Pfannschmidt U, Frede S, Wotzlaw C, Fandrey J. Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing. *Eur Respir J* 2008; 32(1):210-17.
- [9] Baselga J. Targeting the phosphoinositide-3 (PI3) kinase pathway in breast cancer. *Oncologist* 2011;16(1):12-19.
- [10] DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, Grünwald V, Ray RB, *et al*. Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. *Ann Oncol* 2004; 15(10):1510-16.
- [11] Bilton RL, Booker GW. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation. *Eur J Biochem* 2003; 270(5):791-98.
- [12] Chen L, Endler A, Shibasaki F. Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp Mol Med* 2009; 41(12):849-57.
- [13] Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1784(1):150-8.
- [14] Park S, Chapuis N, Bardet V, Tamburini J, Gallay N, *et al*. PI-103, a dual inhibitor of Class IA phosphatidylinositide 3-kinase and mTOR, has antileukemic activity in AML. *Leukemia* 2008; 22(9):1698-1706.
- [15] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(1):21-35.
- [16] Raynaud FI, Eccles S, Clarke PA, Hayes A, Nutley B, *et al*. Pharmacologic characterization of a potent inhibitor of class I phosphatidylinositide 3-kinases. *Cancer Res* 2007; 67(12):5840-50.
- [17] Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, Poulikakos PI, Scaltriti M, *et al*. mTOR Kinase Inhibition Causes Feedback-Dependent Biphasic Regulation of AKT Signaling. *Cancer Discovery* 2011; 1:248-59.
- [18] Ripple MO, Kalmadi S, Eastman A. Inhibition of either phosphatidylinositol 3-kinase/Akt or the mitogen/extracellular-regulated kinase, MEK/ERK, signaling pathways suppress growth of breast cancer cell lines, but MEK/ERK signaling is critical for cell survival. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 93(2):177-88.
- [19] She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, *et al*. Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS ONE* 2008; 3(8):1-10.
- [20] Torbett NE, Luna-Moran A, Knigh ZA, Houk A, Moasser M, *et al*. A chemical screen in diverse breast cancer cell lines reveals genetic enhancers and suppressors of sensitivity to PI3K isoform-selective inhibition. *Biochem J* 2008; 415 (1):97-110.
- [21] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989; 119:203-10.
- [22] Yoo YG, Kong G, Lee MO. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia inducible factor-1 α protein by recruiting histone deacetylase. *The EMBO Journal* 2006; 25(6):1231-41.
- [23] Yu K, Toral-Barza L, Shi C, Zhang WG, Zask A. Response and determinants of cancer cell susceptibility to PI3K inhibitors: combined targeting of PI3K and Mek1 as an effective anticancer strategy. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(2):307-15.
- [24] Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001; 12(7):363-9.
- [25] Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, *et al*. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000; 14(4):391-6.
- [26] Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, *et al*. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr Biol* 1997; 7(4):261-9.
- [27] Yang J, Cron P, Thompson V, Good VM, Hess D, *et al*. Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell* 2002; 9(6): 1227-40.
- [28] He X, Wang Y, Zhu J, Orloff M, Eng C. Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling. *Cancer Lett* 2011; 301(2):168-76.
- [29] O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, *et al*. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006; 66(3):1500-8.
- [30] Jones DT, Pugh CW, Wigfield S, Stevens MF, Harris AL. Novel thioredoxin inhibitors paradoxically increase hypoxia-inducible factor-alpha expression but decrease functional transcriptional activity, DNA binding, and degradation. *Clin Cancer Res* 2006; 12(18):5384-94.