

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

AKCİĞER KARSİNOMU HÜCRE HATLARINDA
EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ
EKSPRESYONUNDA P38, JUN-N-TERMİNAL KİNAZ,
PROTEİN KİNAZ A VE GLİKOJEN SENTAZ KİNAZ-
3B’NİN ROLÜ

İrem Hicran ÖZBUDAK

DOKTORA TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

AKCİĞER KARSİNOMU HÜCRE HATLARINDA
EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ
EKSPRESYONUNDA P38, JUN-N-TERMINAL KİNAZ,
PROTEİN KİNAZ A VE GLİKOJEN SENTAZ KİNAZ-
3B’NİN ROLÜ

İrem Hicran ÖZBUDAK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-3460 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

TEŐEKKÖR

Bu yola ıkıamda, almış olduğum tÖm eğitimim sırasında, çalıőmamın gerçekleőtirilmesinde, her konuda bilgisini, desteğini, yardımını ve hoőėÖrÖsÖnÖ esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam; Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÖZÖÖM'e,

Çalışma konumu seçerken derslerinden ilham aldığım Prof. Dr. Osman Nıdai ÖZEş'e, bu sÖrete hep yanımda olan değerli arkadaőım Dr. Öėr. Öyesi Sema AVCI'ya, tez projesinde yer alan Dr. Öėr. Öyesi Mustafa Gökhan ERTOSUN'a, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın kıymetli hocalarına ve değerli arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri EnstitÖsÖ alıőanlarına,

Bana daima destek olan değerli eőim Prof. Dr. Ömer ÖZBUDAK'a ve canım kızlarım Selin ve Elif'e sonsuz teőekkÖrlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) özellikle küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) hastalarının çoğunda aşırı eksprese edilebilmekte veya aktive edici mutasyonlarla tümör patogenezinde rol almaktadır. Çalışmamızın amacı, KHDAK hücre hattında P38, Jun-N-terminal Kinaz (JNK), Protein Kinaz A (PKA) ve Glikojen Sentaz Kinaz-3 β (GSK-3 β) inhibitörlerini kullanarak EGFR ekspresyon seviyesi üzerine etkilerini araştırmaktır.

Yöntem: A549, H1299 ve H1650 olarak bilinen akciğer kanseri hücre hatları içinde en yüksek EGFR ekspresyonuna sahip olan hücre hattı belirlenmiş ve bu hücre hattında, ayrı ayrı P38, JNK, PKA ve GSK-3 β 'nın spesifik inhibitörleri ile muamele sonrası Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) indüksiyonu yapılarak ve yapılmadan EGFR ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Elde edilen ekspresyon seviyeleri kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular: H1299 hücre hattında, P38, JNK, PKA ve GSK-3 β 'nın spesifik inhibitörleri ile muamele sonrasında EGF indüksiyonu yapılan ve yapılmayan gruplarda, EGFR ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanmıştır. EGF ile muamele edilen gruplarda, EGF muamelesi yapılmayanlara göre daha yüksek EGFR ekspresyon seviyesi tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmamız P38, JNK, PKA ve GSK-3 β 'nın EGFR'nin hücre içi protein miktarı üzerine etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Ancak sadece ekspresyon seviyesine bakarak bu sonuca ulaşılmamalı, hücre içi EGFR seviyesine etkili mekanizmalar kompleks olarak değerlendirilmelidir. EGFR hedefli tedaviler yanı sıra ilişkili sinyal yollarının belirlenerek hedeflenmesi, kanser tedavisinde daha etkili sonuçlar almamıza katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: KHDAK, EGFR, MAPK, PKA, GSK-3 β

ABSTRACT

Objective: In most of the non-small cell lung carcinoma (NSCLC) patients, overexpression of epidermal growth factor receptor (EGFR) or activating mutations in EGFR has been playing a critical role in tumor pathogenesis. The aim of this study is to investigate the effects of P38, Jun-N-terminal kinase (JNK), Protein kinase A (PKA) and Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) on EGFR expression level in an NSCLC cell line.

Method: First of all, the cell line which has the highest EGFR expression level was detected among the lung carcinoma cell lines known as A549, H1299, and H1650. And then the rest of the experiments has been done in this cell line. After treatment of this cell line with specific inhibitors for P38, JNK, PKA and GSK-3 β , each group evaluated for EGFR expression level by treating with epidermal growth factor (EGF) or without EGF induction. The expression levels obtained from inhibitor groups were compared with control groups.

Results: In the H1299 cell line, after treatment with specific inhibitors of P38, JNK, PKA and GSK-3 β , a statistically significant decrease in EGFR expression levels was found in groups with and without EGF induction. A higher level of EGFR expression was detected in groups treated with EGF than in those without EGF treatment.

Conclusion: Our study suggests that P38, JNK, PKA and GSK-3 β may have effects on the intracellular protein level of EGFR. However, this conclusion should not be reached only by evaluating the expression level, the mechanisms affecting the intracellular EGFR level should be considered in a complex manner. In addition to EGFR-targeted therapies, identifying and targeting related signaling pathways will contribute to more effective results in cancer treatment.

Key words: NSCLC, EGFR, MAPK, PKA, GSK-3 β

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. EGFR Sinyal Yolağı	3
2.2. EGFR Kontrolünde Yer Alan Temel Yolaklar	11
2.2.1. RAS-RAF-MEK-ERK Mitojenle Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı	13
2.2.2. Fosfatidilinozitol 3-Kinaz (PI3K)-Akt-mTOR Sinyal Yolağı	14
2.2.3. Fosfolipaz C- γ (PLC- γ)-Protein Kinaz C (PKC) Sinyal Yolağı	15
2.2.4. Src (Sarkoma) Kinaz Yolağı	16
2.2.5. STAT	17
2.2.6. Endositik Yolak	17
2.2.7. Stres Yolağı	18
2.2.8. Otofaji Yolağı	18
2.2.9. Nüklear EGFR Sinyali	20
2.3. Akciğer Karsinomu	20
2.4. EGFR-Hedefli Tedaviler	23
2.4.1. EGFR Monoklonal Antikorları	23
2.4.2. EGFR Hedefli TKI'lar	24
2.5. EGFR Ekspresyonunda Etkili Olabilecek Muhtemel Kinazlar	24
2.5.1. P38	25
2.5.2. JNK	26

2.5.3. PKA	28
2.5.4. GSK-3 β	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Hücre Kültürü	30
3.2. Hücre Hatlarının Pasajlanması	32
3.3. Hücre Sayımı	32
3.4. Hücre Kültüründen Hücre Hatlarının Kuyucuklara Alınması	33
3.5. Hücre Hatlarının EGF ve Spesifik Kinaz İnhibitörleri ile Muameleleri	33
3.6. Hücre Hatlarının EGF ile Muamele Edilme Süresinin Belirlenmesi	33
3.7. Hücre Hatlarının Muamele Edileceği Spesifik Kinaz İnhibitör Dozlarının Belirlenmesi	34
3.8. Spesifik Kinaz İnhibitörleri ve EGF Muamelesine Göre Deney Gruplarının Oluşturulması	34
3.9. Spesifik Kinaz İnhibitörlerinin Uygulanması	35
3.10. Hücre Lizatı Eldesi	35
3.11. Hücre Lizatlarının Protein Konsantrasyonunun Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi	35
3.12. Western Blot Yöntemi	36
3.12.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)	36
3.12.2. Yüklenecek Örneklerin Hazırlanması ve Jelde Yürütülmesi	38
3.12.3. Yürütülmüş Proteinlerin Polivinilidin Florid (PVDF) Membrana Transferi	38
3.12.4. PVDF Membranın İşaretlenmesi	39
3.13. Grafikler ve İstatistiksel Analizler	40
3.14. Deneyler için Gerekli Kimyasallar ve Hazırlanışları	40
4. BULGULAR	42
4.1. A549, H1299 ve H1650 Hücre Hatlarında EGFR Ekspresyonu Analizi Sonuçları	42
4.2. H1299 Hücre Hattında EGF Muamelesi Sonrası En Yüksek EGFR	

Ekspresyonu Elde Edilen Süre	43
4.3. H1299 Hücre Hattının Spesifik Kinaz İnhibitörleri İle Muamelesi	
Sonrası EGFR Ekspresyonu	44
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	67

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	A549, H1299 ve H1650 hücre hatlarının özelliklerinin karşılaştırması	30
Tablo 3.2.	Ayrıştırıcı Jel Hazırlama Ölçüsü	37
Tablo 3.3.	Yükleme Jeli Hazırlama Ölçüsü	37



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** EGFR geninin kromozomal konumu, ekzon yapısı ve EGFR protein domainleri. (Martin ve ark., 2006) 'den uyarlanmıştır. 3
- Şekil 2.2.** EGF ile bağlanmış EGFR'nin ekstrasellüler bölgesinin çizimi. (Ogiso ve ark., 2002) 'den uyarlanmıştır. 5
- Şekil 2.3.** EGFR homodimerizasyonu: Ekstrasellüler domainlerin (ECD) ligand bağlanması sonrası sırt sırta (back-to-back) dimer yapısında konfigürasyonu ve transmembran domain ile ECD'ye birleşik intrasellüler asimetrik tirozin kinaz dimeri izlenmektedir. C-terminal kuyruğunda tirozinlerin fosforilasyonu ve efektörlerin reseptöre çekilmesi ile EGFR aktivasyonu sağlanmış olur. JM: Jukstamembran; TKD: Tirozin kinaz domaini. (Zanetti-Domingues ve ark., 2020)'den uyarlanmıştır. 6
- Şekil 2.4.** EGFR'de liganda bağlı dimerizasyon ve konformasyonel değişiklikler. I. domain, mavi; II. domain, yeşil; III. domain, sarı; IV. domain, kırmızı; İntrasellüler tirozin kinaz domaini, gri. A) Ligand bağlı olmayan EGFR'nin çoğu, otoinhibe veya bağlı konformasyon halinde bulunur (II. ve IV. domain bağlıdır). (B) Ligand bağlı olmayan açılmış EGFR'de, bu bağlantı kopmuştur ve EGFR uzamış halde bulunur. (C) Ligand genellikle bağlı konformasyonda olmayan EGFR'lere bağlanır ve eşzamanlı olarak I. ve III. domain ile etkileşime girerek, II. domainin açığa çıktığı uzamış formu stabilize eder. (D) Dimerizasyon, reseptör aracılıdır ve II. domainin etkileşimleri tarafından yönetilir. Dimer kompleksinde, intrasellüler kinaz domainlerinin C-terminal reseptör kuyruğundaki rezidüleri birbirlerini çapraz olarak fosforile ederler. (Lammerts van Bueren ve ark., 2008)'den uyarlanmıştır. 6

Şekil 2.5. EGFR'nin intrasellüler domaininin kristalografik yapısı. N- terminal ATP-bağlayan lob β -sheet yapısı ve C-terminal substrat bağlayan lob α -heliks yapısı izleniyor. (Warnault ve ark., 2013)'den uyarlanmıştır. 7

Şekil 2.6. EGFR homodimerizasyonu: Ekstrasellüler domainlerin (mavi) ligand (kırmızı) ile bağlanması sonrası sırt sırta (back-to-back) dimer yapısında konfigürasyonu, transmembran domain ve intrasellüler asimetrik tirozin kinaz dimeri izlenmektedir. C-terminal kuyruklarda tirozinlerin fosforilasyonu ile EGFR aktivasyonu sağlanmış olur. JM: Jukstamembran. <https://www.oldwestbury.edu/icare/kimy>'den uyarlanmıştır. 8

Şekil 2.7. EGFR'nin kinaz domaini. (Tamirat ve ark., 2019)'den uyarlanmıştır. 9

Şekil 2.8. Şekil 2.8. EGFR C-terminal kuyruğa bağlanan aracı moleküllerin moleküler modelleme yöntemiyle gösterimi. (A) EGFR kinaz domaininin asimetrik modeli. (B) Shc (mor), Grb2 (sarı), PLC γ 1 (yeşil) ve Stat5'in (mavi) moleküler modelleri. (C) EGFR'nin sitoplazmik etkileşim yaptığı 4 aracı molekülün c-terminal kuyruktaki bağlanma yerleri izleniyor. Dört adaptör protein ve EGFR arasındaki olası yerleşme bölgeleri; (D) PLC γ 1, pY992'ye (E) PLC γ 1 pY1173'e (F) PLC γ 1, Shc ve Grb2 sırasıyla pY992, pY1148 ve pY1068'e ve (G) Stat5, Shc ve Grb2 pY992, pY1148 ve pY1068'e bağlanmaktadır. (Hsieh ve ark., 2010)'den uyarlanmıştır. 10

Şekil 2.9. EGFR sinyal yolağının fonksiyonları özetlenmektedir. 11

Şekil 2.10 EGFR'nin sinyal yolları ve inhibitörleri. EGFR'nin aktivasyonu, 12
homodimerizasyonu ya da heterodimerizasyonu, spesifik tirozin
rezidülerinin fosforilasyonuna ve reseptörlerin hücre içi kısmında
çeşitli proteinlerin reseptöre çekilmesine yol açar. Fosfolipaz C γ
(pembe) ve STAT transkripsiyon faktörleri (gri) doğrudan
reseptöre bağlanırken, Ras / Raf / MAPK yolu (turuncu) ve PI3K
yolu (yeşil) birkaç spesifik adaptör molekülüne (sarı) ihtiyaç duyar.
PI3K ayrıca EGFR heterodimerlerinin herhangi bir erbB partnerine
doğrudan bağlanabilir. Eşzamanlı olarak, aktive edilmiş reseptörler
endositoza uğrar ve iki olası yol izlenir: Lizozomal degradasyon
veya importin- aracılı nükleer translokasyon. Çekirdeğe girdikten
sonra, EGFR ya uygun bir transkripsiyon faktörü gibi (siklin D1
upregülasyonu) ya da diğer gen transaktivatörlerinin düzenleyicisi
olarak davranabilir. Her iki yol da hücre proliferasyonu, hayatta
kalma, invazyon ve metastaz ile ilgili genlerin nükleer
aktivasyonu ile sonuçlanır. EGFR kinaz inhibisyonu için iki ana
strateji mevcuttur: Monoklonal antikorlar (mAb) ve küçük
moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler). mAb'ler hücre
dışında rol alır ve EGFR ligandlarının bağlanmasını önler, oysa
TKI'ler reseptörün kinaz domainine ATP bağlanması ile yarışır.
DAG 1,2-diaçilgliserol; IP3, inositol 1,3,5-trifosfat; PLC γ ,
fosfolipaz C γ ; Erk-1, ekstrasellüler sinyalle regüle kinaz-1; Erk-2,
ekstrasellüler sinyalle regüle kinaz-2; FAK, fokal adezyon kinazı;
PKC, protein kinaz C (Scaltriti ve Baselga, 2006).

Şekil 2.11 Ras sinyal yolağı. Ras nanokümeleri oluşturur ve Raf / MEK / 13
ERK (MAPK) yolunda Raf dimerizasyonunu sağlayarak yolağı
aktif hale getirir. (Nussinov ve ark., 2019) 'den uyarlanmıştır.

- Şekil 2.12** PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağındaki düzenleyici p85 subunitesi ve katalitik p110 subunitesine sahip PI3K enziminin reseptör tirozin kinaz (RTK) ile aktivasyonu izlenmektedir. p85 subunitesi yerleşme proteini Gab-1 aracılığıyla EGFR ile etkileşime girmektedir. (Nussinov ve ark., 2019) 'den uyarlanmıştır. 14
- Şekil 2.13** PLC- γ -PKC sinyal yolağı. PLC- γ aktive EGFR ile etkileşime girerek PKC aktivasyonunda kofaktör olan DAG oluşumunu sağlar ve PKC aktivasyonu gerçekleşir. (Jang ve ark., 2018) 'den uyarlanmıştır. 15
- Şekil 2.14** Src kinaz sinyal yolağı. Src, FAK, PI3K ve STAT proteinleri dahil pek çok substratı aktive etmektedir. Böylece hücrenin hayatta kalması, çoğalması, anjiogenez, migrasyon, invazyon ve metastaz yeteneği gibi pek çok onkogeneze ile ilişkili özelliği kazanmasını sağlar. (Hsu ve ark., 2020) 'den uyarlanmıştır. 16
- Şekil 2.15** EGFR yapısal STAT aktivasyonunu düzenler ve güçlendirir. (Collin de Lhortet ve ark., 2012)'den uyarlanmıştır. 17
- Şekil 2.16** EGFR birden fazla endositik yolla hücre içine alınmaktadır. (Chen ve ark., 2012)'den uyarlanmıştır. 18
- Şekil 2.17** EGFR'nin nonkanonik fonksiyonları şematize edilmiştir. Aktif EGFR varlığında ligand ile uyarılmış EGFR, fosforile (P) ve ubiquitine (Ub) olarak hem klatrin aracılı endositoza (gösterilmemiştir) hem de klatrinden bağımsız endositoza uğrar. Liganda bağlanmamış EGFR ise LAPTM4B tarafından erken ve geç endozomlara internalizasyon ile dağıtılmıştır. Burada, inaktif EGFR Rubicon ile etkileşime girerek Beclin-1'den ayrılmasına neden olur. Beclin-1 kompleksi ise ER membranında otofajiyi başlatmaktadır. (Sigismund ve ark., 2018)'den uyarlanmıştır. 19

Şekil 2.18	EGFR'nin bir kısmı internalizasyon ve lizozomal degradasyondan kaçabilir. Çekirdekte transkripsiyon faktörü veya transkripsiyon faktörlerinin kofaktörü gibi davranabilir. (Gururaj ve ark., 2011)'den uyarlanmıştır.	20
Şekil 2.19	Akciğer karsinomu genel sınıflaması.	21
Şekil 2.20	Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde EGFR mutasyonları. (Sharma ve ark., 2007) 'den uyarlanmıştır.	22
Şekil 2.21	EGFR-hedefli tedaviler şematik olarak gösterilmektedir. (Bhatia ve ark., 2020)'den uyarlanmıştır.	23
Şekil 2.22	EGFR intrasellüler kinaz domaini aminoasit dizilimi. Farklı renklerle P38, JNK, PKA ve GSK-3 β 'nın fosforilasyon yapabilecekleri muhtemel motifler işaretlenmiştir.	25
Şekil 3.1	Hücre kültürünün 24. saatinde, inverted mikroskop altında hücrelerin konfluensi oranı %30 olarak belirlenmiştir.	31
Şekil 4.1	A549, H1299 ve H1650 akciğer kanseri hücre hatlarında Western blot yöntemi ile belirlenen EGFR ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.	42
Şekil 4.2	H1299 hücre hattında EGF muamelesi sonrası 0. dk, 5. dk, 15. dk, 30. dk, 45. dk ve 60. dk'da elde edilen EGFR ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.	43
Şekil 4.3	H1299 hücre hattında, JNK inhibitörü, GSK-3 β inhibitörü p38 inhibitörü ve PKA inhibitörü ve muamelesi sonrası elde edilen ve kontrol grubunda izlenen EGFR ekspresyon seviyeleri.	44

Şekil 4.4 H1299 hücre hattında JNK inhibitörü, GSK-3 β inhibitörü, p38 45 inhibitörü, PKA inhibitörü uygulamasını takiben EGF muamelesi sonrası elde edilen EGFR ekspresyon seviyelerinin GAPDH ile kıyaslanmasını gösteren grafik.

Şekil 4.5 H1299 hücre hattında p38 inhibitörü, JNK inhibitörü, PKA 46 inhibitörü ve GSK-3 β inhibitörü uygulanan gruplarla, EGF stimülasyonu yapılan aynı inhibisyonun uygulandığı grupların karşılaştırıldığı, EGFR ekspresyon seviyelerinin GAPDH ile kıyaslanmasını gösteren grafik ve Western blot sonuçları.

SİMGELER ve KISALTMALAR

A	: Alanin
A-loop	: Aktivasyon loop
AP2	: Apetala 2
APS	: Amonyum persülfat
AREG	: Amfiregulin
BKM1	: Big MAP kinaz 1
BSA	: Bovin Serum Albumin
BTC	: Betasellulin
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
Cbl	: Casitas B-lineage Lenfoma
c-JUN	: Jun proto-onkogen
cMET	: Tirozin protein kinaz Met
CREB	: cAMP response element-bağlayıcı protein
CRL	: Cell Repository Line
DAG	: 1,2-diaçilgliserol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
E	: Glutamik asit
E1A	: Adenovirus early region 1A
E2F1	: E2 promoter bağlanma faktör 1
ECACC	: European Collection of Authenticated Cell Cultures
ECD	: Ekstrasellüler domain
ECL	: Elektrokemilüminesans

EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EPG	: Epiregulin
EPGN	: Epigen
ErbB	: Eritroblastik lösemi viral onkojen homolog
ERK	: Ekstrasellüler sinyalle regüle kinaz
FAK	: Fokal adezyon kinazı
FBS	: Fetal Bovin Serum
FGFR	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
Gab-1	: Grb2- -associated-binding protein 1
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
Grb2	: Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz-3 β
HB-EGF	: Heparin bağlayıcı EGF
Hh	: Hedgehog
IC50	: Maksimum inhibitör konsantrasyonunun yarısı
IP3	: İnositol 1,3,5-trifosfat
JM	: Jukstamembran
JNK	: Jun-N-terminal kinaz
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu
L	: Lösin
mAb	: Monoklonal antikorlar
MAPK	: Mitojenle aktive protein kinaz

MEK	: Mitojen-aktive protein kinaz kinaz
MKK	: Stres kinaz mitojen-aktive protein kinaz kinaz
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
NF-κB	: Nüklear Faktör kappa B
P	: Fosforile (P)
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PBS-T	: PBS-Tween 20
PDGFR	: Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü
PI3K	: Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
PLC-γ	: Fosfolipaz C γ
P-loop	: Fosfat bağlama halkası
PVDF	: Polivinilidin florid
R	: Arginin
RAF	: Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	: Rat sarkoma
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
S	: Serin
SAPK	: Stres-aktive protein kinaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SH2	: Src Homoloji 2
Shc	: Src homology 2 domain containing transforming protein

Smurf1	: SMAD Spesifik E3 Ubikitin Protein Ligaz 1
Sp1	: Specificity protein 1
Src	: Sarkoma
STAT	: Sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri
T	: Treonin
TEMED	: Tetrametiletilediamin
TGF-α	: Transforme edici büyüme faktörü- α
TKD	: Tirozin kinaz domaini
TKI	: Tirozin kinaz inhibitörü
TM	: Transmembran
Ub	: Ubikitine
WNT	: Wingless ve Int-1
Y	: Tirozin

1. GİRİŞ

EGFR, Eritroblastik lösemi viral onkojen homolog (ErbB) ailesine ait reseptörlerin prototipi olup c-ErbB1/HER1 olarak da bilinmektedir (Yarden ve Sliwkowski, 2001; Hynes ve Lane, 2005; Scaltriti ve Baselga, 2006). EGFR sinyal yolağı, memeli hücresinde büyümeyi, yaşamın devamlılığını, farklılaşmayı, çoğalmayı ve hücre göçünü düzenleyen en önemli yolaklardan birisidir. Normal şartlar altında EGFR, ‘kanonikal’ ligand olarak da bilinen EGF yanısıra transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α), betasellulin (BTC), heparin bağlayıcı EGF (HB-EGF), amfiregulin (AREG), epiregulin (EPR) ve epigen (EPGN) tarafından da aktive edilebilmektedir (Wilson ve ark., 2009; Macdonald-Obermann ve Pike, 2014; Singh ve ark., 2016; Butti ve ark., 2018). Ekstrasellüler ligand bağlama bölgesine ligand bağlanması ile reseptör ektodomainin konformasyonel değişimi indüklenir ve reseptör homodimerizasyonu/heterodimerizasyonu meydana gelir. Reseptörün C-terminal kuyruğu içindeki tirozin (Y) rezidülerinin otofosforilasyonu sonucu sitoplazmik proteinler için spesifik bağlanma bölgeleri oluşur. Hücre içi sinyal oluşumu ve iletiminde rol oynayacak çok sayıda proteinin bu bağlanma bölgelerine çekilmesi ve aktive formlarının oluşmasıyla EGFR aktivasyonu gerçekleşmiş olur (Scaltriti ve Baselga, 2006).

EGFR, insan kanserlerinin patogeneğinde yer alan önemli moleküllerden biridir. Normal hücrelerde, hücre başına $4-10 \times 10^4$ EGFR eksprese edildiği tahmin edilirken, tümör hücrelerinde hücre başına 10^6 ’dan fazla reseptörün aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (Wee ve Wang, 2017). EGFR’nin anormal aktivitesi tümör hücre proliferasyonu, anjiyogenez, apoptozdan kaçış, hücre motilitesi, adezyon ve metastaz yapabilme yeteneği gibi pek çok biyolojik kanser mekanizmasında rol alır. Hücreye kazandırdığı bu özellikler nedeniyle EGFR bir proto-onkogen olarak tanımlanmıştır.

EGFR, çeşitli sinyal kaskatları aracılığıyla bu aktivitelerini düzenler ve diğer reseptör tirozin kinazlar (RTK) ile birlikte çalışır. Bu nedenle EGFR aktivitesinin karmaşık düzenlenmesini ve downstream sinyal olaylarını anlamak kanser biyolojisinin henüz tam açıklığa kavuşmamış kısımlarını aydınlatmak için de gerekli görülmektedir (Tomas ve ark., 2014).

EGFR tümör hücresinde ya aşırı ekspresyonu ile (sayısal artış) karşımıza çıkmaktadır ya da mutasyona bağlı ligand aracılı veya ligandan bağımsız mekanizmalar yoluyla aşırı aktivite (fonksiyonel artış) göstermesiyle tümör gelişimi ve ilerlemesine yol açmaktadır. EGFR'nin aşırı ekspresyonu birçok kanser dokusunda sık izlenen bir durum olup meme, akciğer, over, serviks, mesane, ösefagus, beyin ve baş-boyun kanserlerinde daha agresif davranış ve kötü klinik gidişle ilişkili olarak bildirilmiştir (Nicholson ve ark., 2001; Evangelopoulos ve ark., 2005; Zhu ve ark., 2009; Park ve ark., 2014; Lee ve ark., 2015; Liao ve ark., 2015; Butti ve ark., 2018). EGFR'nin farklı mutant formları pek çok kanser tipinde tanımlanmıştır ve kanser heterojenitesine katkıda bulunmaktadır. Bu mutasyonlar, uyarı olmadan aktivasyonun meydana gelmesi, alt sinyal yollarının sürekli uyarımı veya reseptör aktivasyonunun sonlandırılmaması gibi pek çok mekanizma üzerinden artmış ve sürekli EGFR aktivitesine neden olmaktadır.

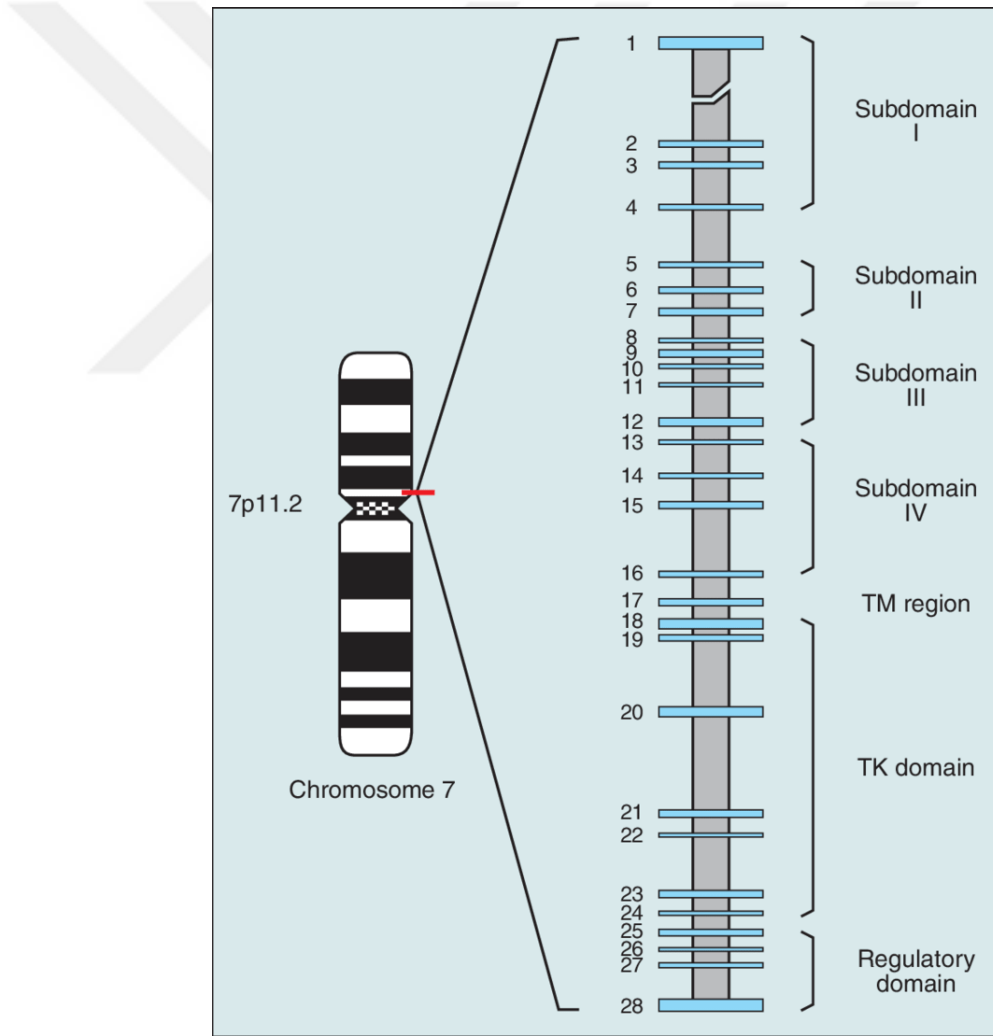
EGFR, KHDAK hastalarının yaklaşık %50'sinde aşırı eksprese edilirken (Casaletto ve McClatchey, 2012), sıklıkla EGFR geni 19.ekzon delesyonu, L858R nokta mutasyonu ile EGFR reseptör aktivasyonu gözlenmektedir. EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin (TKI) kullanımının KHDAK hastalarında sağkalım sürelerini uzattığı bilinmektedir (Otsuka ve ark., 2015; Chung, 2016). Ancak zaman içinde TKL'lara direnç gelişebilmektedir. Bu nedenle birden fazla ve farklı yollarla işlevlerini gerçekleştiren EGFR inhibitörünü kombine etmek veya diğer önemli kanser fenotipini düzenleyen moleküller üzerinden etkili ajanları EGFR inhibitörleri ile kombine etmek değerli olabilir. Bu nedenle daha farklı mekanizmalar üzerinden EGFR aktivitesinin farmakolojik inhibisyonu, umut vaat edici hedeflerden biri olarak araştırmalar için güncelliğini korumaktadır.

RTK'lar tarafından aktive edilen karmaşık sinyal ağları ile ilgili literatüre sürekli yeni bilgilerin ekleniyor olması nedeniyle özellikle KHDAK'da etkili EGFR hedefli tedavileri her açıdan optimum seviyeye çıkarmak için EGFR'nin hücre içi diğer kinazlarla etkileşiminin aydınlatılması gerekmektedir. Bu bağlamda, çalışmamızda KHDAK hatlarında EGFR'nin ekspresyonu üzerine etkili olabilecek muhtemel kinazlar arasında yer alan P38, JNK, PKA ve GSK-3 β 'ın inhibitörlerini kullanarak EGFR ekspresyon düzeyi üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EGFR Sinyal Yolağı

EGFR yolağının ilk çalışmaları EGF'nin 1963'te Stanley Cohen tarafından bulunmasıyla ve sonrasında 1983'te *EGFR* geninin keşfiyle başlamıştır. EGFR proteini, 1186 aminoasitten oluşmakta olup 7 numaralı kromozomun kısa kolunda p11.2 lokusunda yerleşmiş 110kb'lık 28 ekzondan oluşan gen tarafından kodlanmaktadır (Kondo ve Shimizu, 1983) (Şekil 2.1).



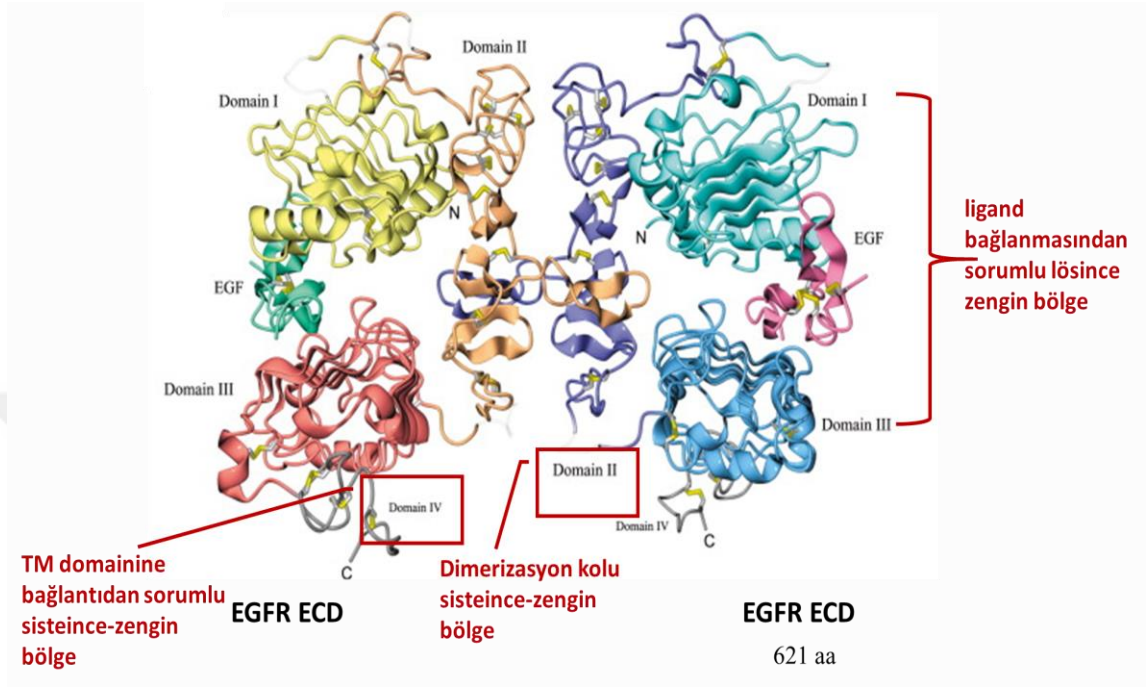
Şekil 2.1. EGFR geninin kromozomal konumu, ekzon yapısı ve EGFR protein domainleri. (Martin ve ark., 2006) 'den uyarlanmıştır.

RTK'lar içinde yer alan EGFR, birçok polipeptit büyüme faktörü, sitokin ve hormona yüksek afiniteye sahip hücre yüzeyi reseptörüdür. Endojen EGF ligand ailesi içinde tanımlanmış moleküller arasında EGF yanısıra TGF- α , BTC, HB-EGF, AREG, EPR ve EPGN olmak üzere yedi farklı ancak aynı kökene sahip ligand yer almaktadır.

EGFR'nin kanonikal (normal) ligandı olarak da bilinen EGF'in EGFR'ye özgü transkripsiyon faktörü olarak isimlendirilen EGF'nin ekspresyonunu indüklediği ve EGFR mRNA ekspresyonunun arttığı, böylece EGF'in kendi reseptörünü düzenlediği bildirilmiştir (Clark ve ark., 1985). EGFR promotorunu modüle eden diğer proteinler arasında E1A (Adenovirus early region 1A), Sp1(specificity protein 1) ve AP2 (Apetala 2) yer alır. DNA topoizomeraaz I ve Jun proto-onkogen (c-JUN) arasındaki etkileşimin EGFR gen ekspresyonunu düzenlediği de gösterilmiştir (Wee ve Wang, 2017).

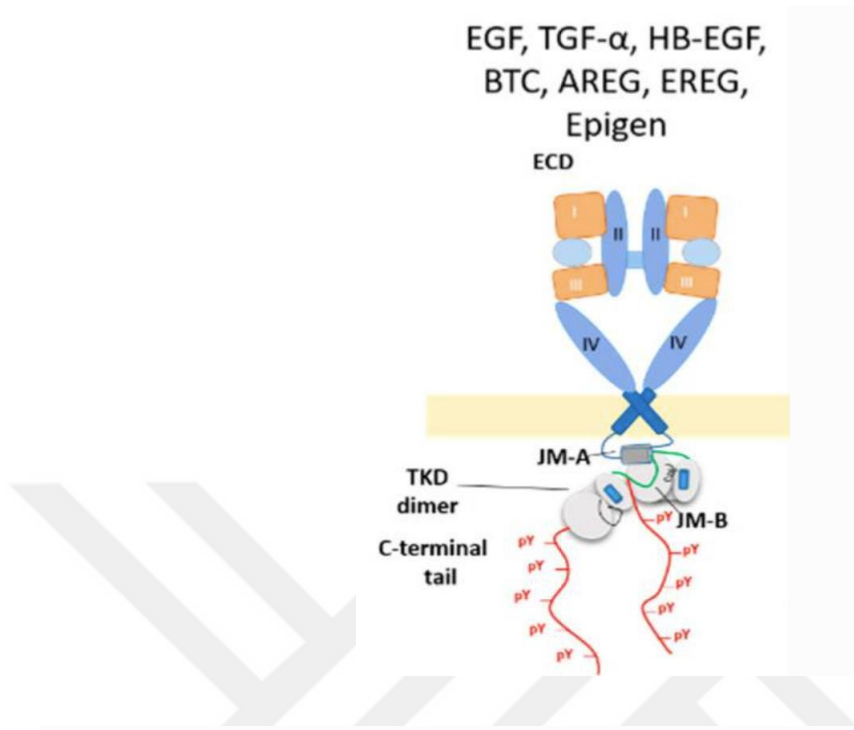
EGFR proteini üç domainden oluşmaktadır. N-terminalden C-terminale doğru gidildiğinde (1) bir ekstrasellüler ligand bağlama domaini ve dimerizasyon kolu (ekzon 1–16), (2) bir hidrofobik transmembran (TM) domaini (ekzon 17) ve (3) jukstamembran (JM) segment, intrasellüler tirozin kinaz ve C-terminal kuyruk domainlerinden (ekzon 18–28) oluşmaktadır (Roskoski, 2014).

EGFR'nin ekstrasellüler bölgesi 621 amino asitten oluşur ve dört domaine ayrılır. I. domain (amino asit 1–133, ekzon 1–4), II. domain (amino asit 134–312, ekzon 5–7), III. domain (amino asit 313–445, ekzon 8–12), IV. domain (amino asit 446–621, ekzon 13–16). I. ve III. domain, ligand bağlanmasından sorumlu lösin zengin parçalardır. II. domain homo veya heterodimerleri oluşturur. IV. domain, II. domaine disülfür bağları ile bağlıdır ve TM domainine bağlantıdan sorumludur. II. ve IV. domain, ligand ile temas etmez ve sistein-zengin bölgelerdir (Şekil 2.2). TM domain ise reseptörü membrana sabitleyen, 23 amino asit uzunluğunda, hidrofobik, membranda tek geçiş yapan ve dimerizasyonda rol oynadığı düşünülen bir yapıdır (Wee ve Wang, 2017).

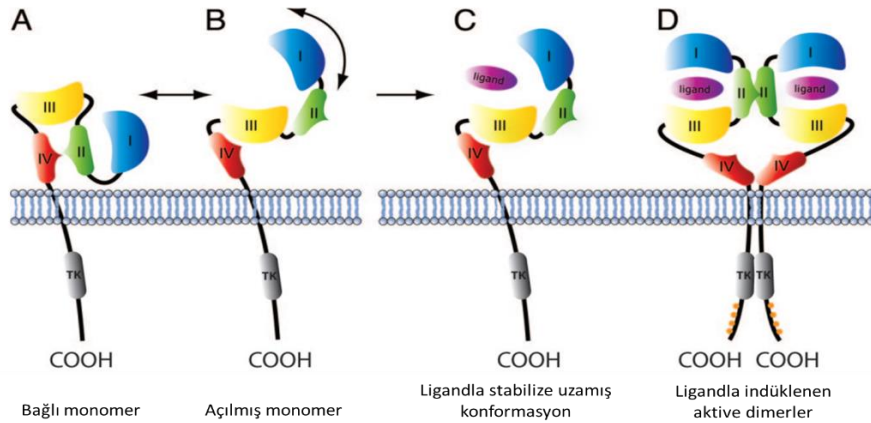


Şekil 2.2. EGF ile bağlanmış EGFR'nin ekstrasellüler bölgesinin çizimi. (Ogiso ve ark., 2002) 'den uyarlanmıştır.

Ekstrasellüler ligand bağlama bölgesine bir ligandın bağlanması ile reseptör dimerizasyonu gerçekleşir. Oluşan EGFR dimerinde sadece iki ekstrasellüler domain değil dimer oluşturan EGFR'lerin kinaz domainleri de temas halindedir. Dolayısıyla reseptör ektodomaininin konformasyonel değişiminin indüklenmesi, intrasellüler domainde yer alan C-terminal kuyruk içindeki tirozin rezidülerinin trans-otofosforilasyonuna aracılık eder (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4) (Burgess ve ark., 2003; Scaltriti ve Baselga, 2006).

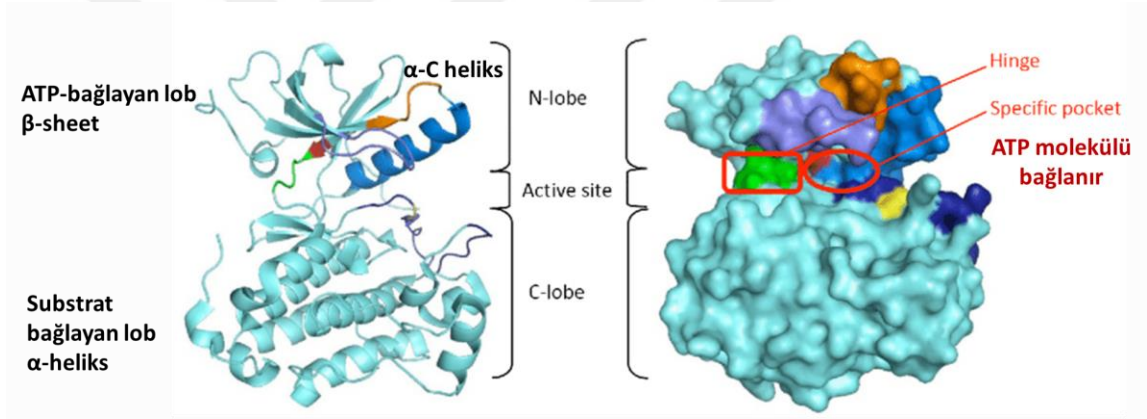


Şekil 2.3. EGFR homodimerizasyonu: Ekstrasellüler domainlerin (ECD) ligand bağlanması sonrası sırt sırta (back-to-back) dimer yapısında konfigürasyonu ve transmembran domain ile ECD'ye birleşik intrasellüler asimetrik tirozin kinaz dimeri izlenmektedir. C-terminal kuyruğunda tirozinlerin fosforilasyonu ve efektörlerin reseptöre çekilmesi ile EGFR aktivasyonu sağlanmış olur. JM: Jukstamembran; TKD: Tirozin kinaz domaini. (Zanetti-Domingues ve ark., 2020)'den uyarlanmıştır.



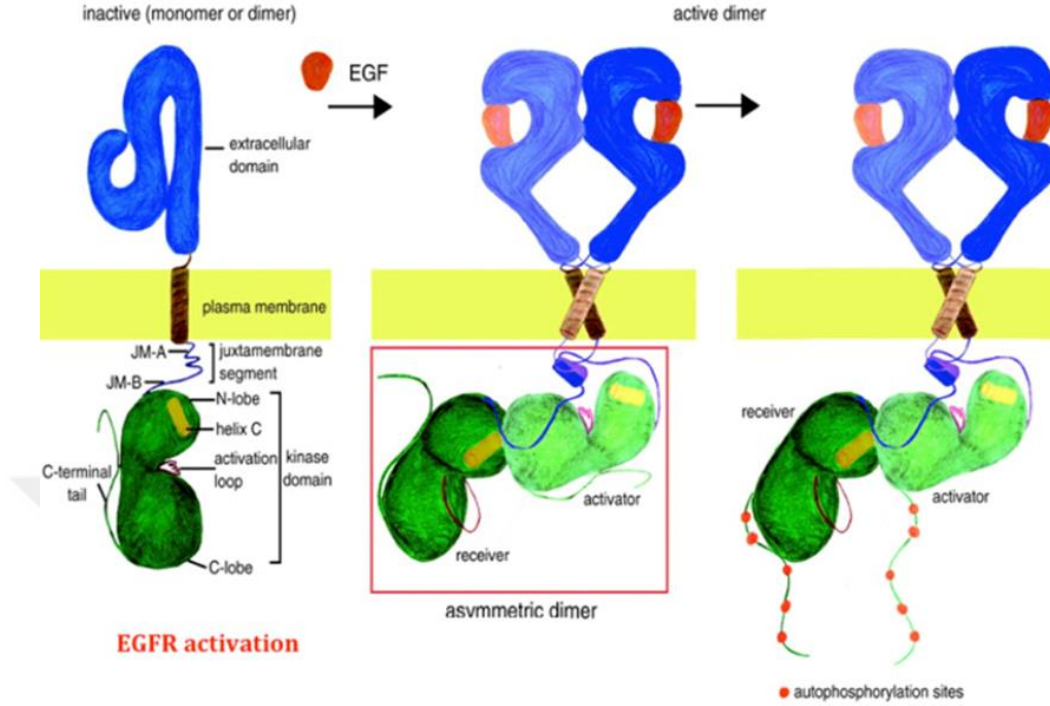
Şekil 2.4. EGFR'de liganda bağlı dimerizasyon ve konformasyonel değişiklikler. I. domain, mavi; II. domain, yeşil; III. domain, sarı; IV. domain, kırmızı; İntrasellüler tirozin kinaz domaini, gri. A) Ligand bağlı olmayan EGFR'nin çoğu, otoinhibe veya bağlı konformasyonda bulunur (II. ve IV. domain bağlıdır). (B) Ligand bağlı olmayan açılmış EGFR'de, bu bağlantı kopmuştur ve EGFR uzamış halde bulunur. (C) Ligand genellikle bağlı konformasyonda olmayan EGFR'lere bağlanır ve eşzamanlı olarak I. ve III. domain ile etkileşime girerek, II. domainin açığa çıktığı uzamış formu stabilize eder. (D) Dimerizasyon, reseptör aracılığıyla ve II. domainin etkileşimleri tarafından yönetilir. Dimer kompleksinde, intrasellüler kinaz domainlerinin C-terminal reseptör kuyruğundaki rezidüleri birbirlerini çapraz olarak fosforile ederler. (Lammerts van Bueren ve ark., 2008)'den uyarlanmıştır.

EGFR'nin özellikle intrasellüler kısmı aktivitesinin engellenmesi açısından çalışmaların yoğunlaştığı bölgedir. İntrasellüler domain 542 aminoasit uzunluğunda olup hareketli jukstamembran segment (~40 amino asit), tirozin kinaz domain (amino asit 690–953, ekzon 18–24), ve C-terminal kuyruktan (amino asit 954–1136, ekzon 25–28) oluşmaktadır (Walton ve ark., 1990). Tirozin kinaz domain daha küçük yapıda olan N-terminal ATP-bağlayan lob ve C-terminal substrat bağlayan lob olmak üzere ikiye ayrılmıştır. EGFR aktive olduğunda tirozin kinaz domaininde belirgin bir konformasyonel değişiklik meydana gelmekte ve bu loblar arasında oluşan cebe, ATP molekülü girmektedir (Stamos ve ark., 2002) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. EGFR'nin intrasellüler domaininin kristalografik yapısı. N-terminal ATP-bağlayan lob β-sheet yapısı ve C-terminal substrat bağlayan lob α-heliks yapısı izleniyor.(Warnault ve ark., 2013)'den uyarlanmıştır.

N-terminal ATP-bağlayan lob β-sheet yapısındadır. C-terminal substrat bağlayan lob oldukça iyi korunmuş α- heliks yapısında olup daha büyüktür. Trans-otofosforilasyon bir reseptörün N-lobu ile diğer reseptörün C-lobu arasında gerçekleşmektedir (Zhang ve ark., 2006) (Şekil 2.6).

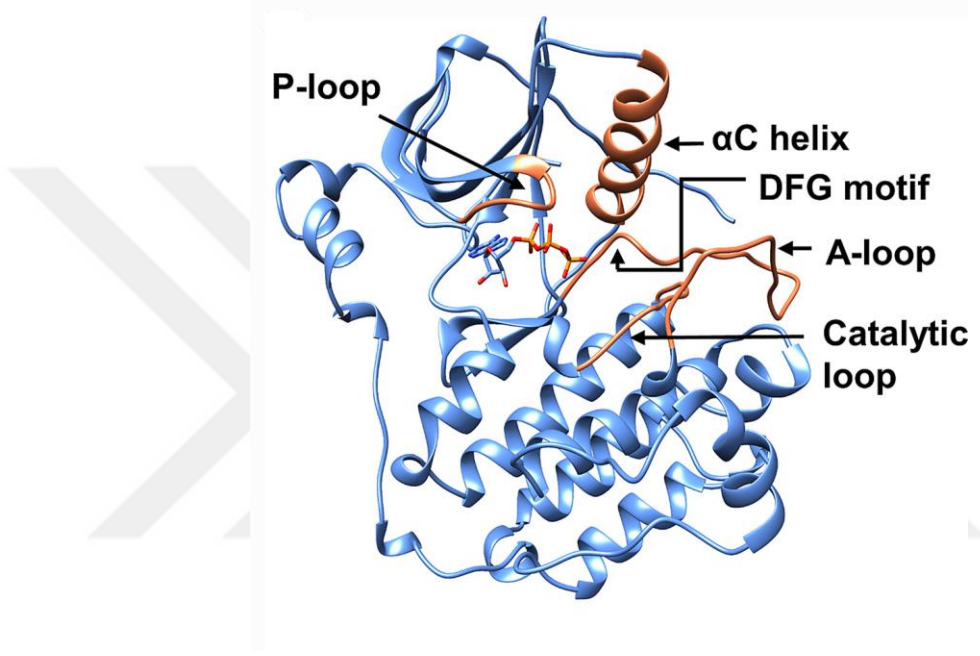


Şekil 2.6. EGFR homodimerizasyonu: Ekstrasellüler domainlerin (mavi) ligand (kırmızı) ile bağlanması sonrası sırt sırta (back-to-back) dimer yapısında konfigürasyonu, transmembran domain ve intrasellüler asimetrik tirozin kinaz dimeri izlenmektedir. C-terminal kuyruklarda tirozinlerin fosforilasyonu ile EGFR aktivasyonu sağlanmış olur. JM: Jukstamembran. <https://www.oldwestbury.edu/icare/kimy'den> uyarlanmıştır.

C-terminal substrat bağlayan lobun ATP bağlanma cebinin konformasyonel değişikliğinde baskın bir rolü bulunmaktadır. ATP'nin loblar arasındaki derin yarıklık şeklinde izlenen cebe bağlandığı ve oldukça korunmuş N-terminal lob yapısının fosfat bağlama halkası (P-loop) yakınında bulunduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.

Kinazlar açık (aktif) veya kapalı (pasif) iki farklı konformasyonel durumda bulunurlar (Kumar ve ark., 2008). Kinazlar aktive edildiğinde her zaman uzamış konformasyonel değişiklik (Molekülün intrastoplazmik alana doğru uzanmasına neden olan yapısal değişiklik) gösterirler. P-loop korunmuş bir glisin-zengin sekans motifi (GXGXΦG) içerir (Huse ve Kuriyan, 2002). Sekans motifinde yer alan Φ genellikle tirozin veya fenilalanin olduğundan, glisin rezidüleri ATP'nin fosfatlarına çok yakın olacak şekilde P-loopun yaklaşabilmesine izin verir. Ayrıca glisin rezidüleri, ATP yokluğunda loopun yapısındaki etkileşimleri değiştirerek küçük moleküllü inhibitörlerin bağlanabilmesini

sağlayacak şekilde loop yapısını oldukça esnek hale getirir. Kinaz domaini ayrıca lizin rezidülerine de sahiptir ve bu alanlar reseptör ubiquitinasyonu için primer bölgeleri oluşturmaktadır (Nie ve ark., 2012). Aktivasyon loop (A-loop) aktive durumda fosforile edilmiş haldedir ve bu durum downstream sinyal proteinleri için yerleşme bölgelerinin (docking sites) oluşmasını sağlar (Hubbard, 1999) (Şekil 2.7).

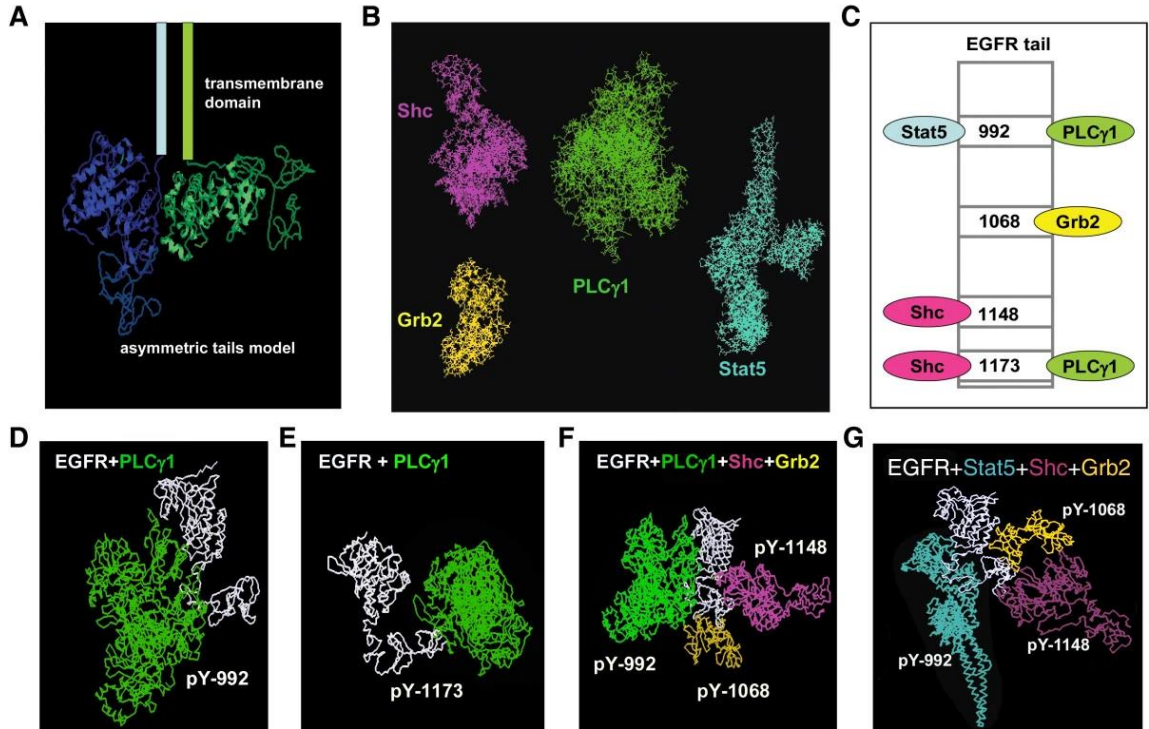


Şekil 2.7. EGFR'nin kinaz domaini. (Tamirat ve ark., 2019)'den uyarlanmıştır.

Aktif durumda, katalitik domainin konformasyonu, bir fosfatın ATP'den peptit substratına aktarılmasını sağlar ve böylece downstream sinyal yollarının kontrolü sağlanır. Aktivasyon için iki temel faktör vardır. Birincisi doğru amino asit rezidülerinin yerleşimi diğeri ise peptit substrat bağlanma bölgesinin açık tutulmasıdır. Aktif durumda, A-loop, peptit substrat bağlanmasına izin verecek şekilde yarıktan dışarı doğru uzanırken, C-heliks bir parçası olan katalitik glutamat rezidüsü, ATP'nin α ve β fosfatlarını koordine eden lizin rezidüsü ile iyonik etkileşime girmektedir. Tirozin kinaz aktif olmadığında ise, A-loopun konformasyonu peptit substratının bağlanmasını engellemek için dramatik bir şekilde değişir. C-heliks yapısı kritik katalitik glutamat rezidüsünün fosforilasyon ve defosforilasyon reaksiyonları tarafından modifiye

edilmesini engelleyecek şekilde rotasyon yaparak bu kritik glutamat rezidüsünü uzaklaştırmaktadır (Huse ve Kuriyan, 2002).

Reseptörün aktivasyonu ile EGFR'nin C-terminal kuyruk kısmı içindeki Y703, Y920, Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148 ve Y1173 gibi önemli tirozin rezidülerinin fosforilasyonu sağlanmaktadır. Böylece Src homology 2 ve fosfotirozin bağlama alanları içeren, çok çeşitli intrasellüler sitoplazmik proteinler için spesifik yerleşme bölgeleri oluşur (Pawson, 2004; Oda ve ark., 2005) (Şekil 2.8). Bu şekilde aracı proteinlerin fonksiyonlarını açığa çıkarmak için aktif reseptöre tutunması ve hücre içine sinyal iletimi sağlanmış olur (Yarden ve Sliwkowski, 2001; Scaltriti ve Baselga, 2006; Sigismund ve ark., 2018).

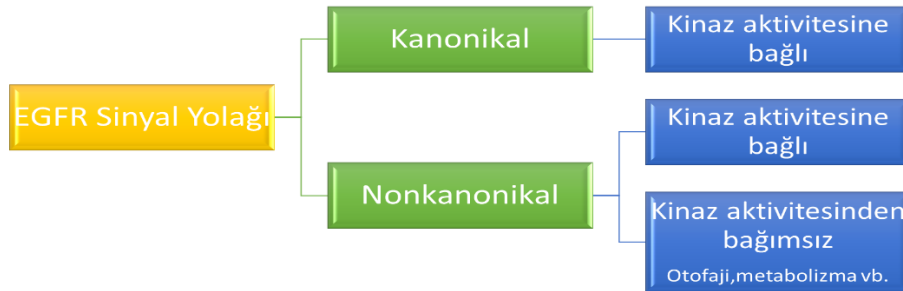


Şekil 2.8. EGFR C-terminal kuyruğa bağlanan aracı moleküllerin moleküler modelleme yöntemiyle gösterimi. (A) EGFR kinaz domaininin asimetrik modeli. (B) Shc (mor), Grb2 (sarı), PLCγ1 (yeşil) ve Stat5'in (mavi) moleküler modelleri. (C) EGFR'nin sitoplazmik etkileşim yaptığı 4 aracı molekülün c-terminal kuyruktaki bağlanma yerleri izleniyor. Dört adaptör protein ve EGFR arasındaki olası yerleşme bölgeleri; (D) PLCγ1, pY992'ye (E) PLCγ1 pY1173'e (F) PLCγ1, Shc ve Grb2 sırasıyla pY992, pY1148 ve pY1068'e ve (G) Stat5, Shc ve Grb2 pY992, pY1148 ve pY1068'e bağlanmaktadır. (Hsieh ve ark., 2010)'den uyarlanmıştır.

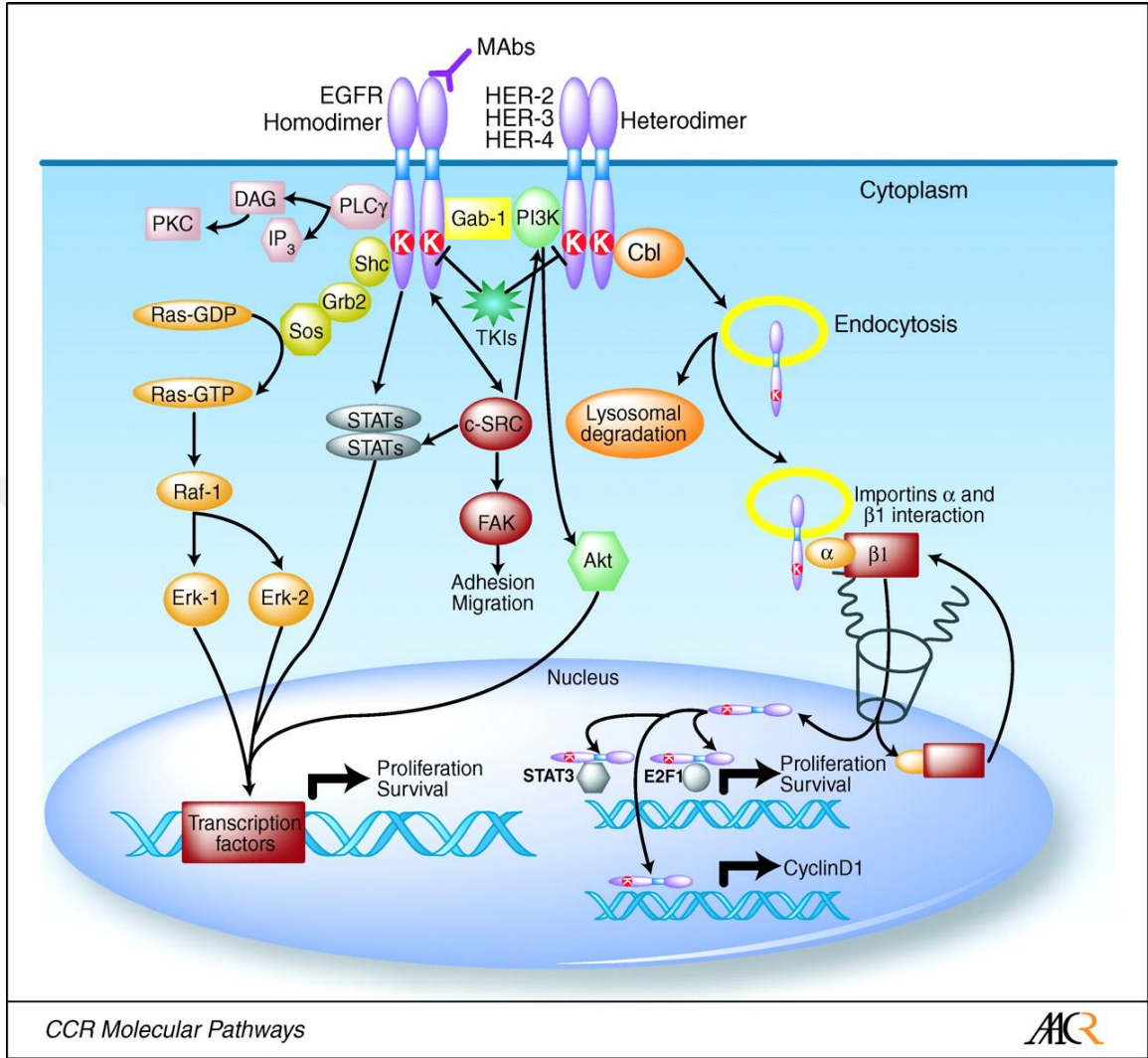
2.2. EGFR Kontrolünde Yer Alan Temel Yolaklar:

Biyokimyasal, yapısal ve genetik çalışmalarla genellikle ligand stimülasyonu ile ortaya çıkan reseptör trans-fosforilasyonunun altında yatan moleküler mekanizmalar ve bunun sonucunda meydana gelen hücre içi sinyal kaskadının aktivasyonu gösterilmiştir. Bu kaskad bilgiyi hücre yüzeyinden ve hücre içi veziküllerden çekirdeğe çok sayıda yolak aracılığıyla iletmekte, hücre çoğalması, hücre yaşamı ve hücre farklılaşmasından sorumlu genlerin aktivasyonunu sağlamaktadır (Lemmon ve Schlessinger, 2010; Schlessinger, 2014).

EGFR üzerine yapılmış çalışmaların sonuçları bir araya getirildiğinde çok kapsamlı bir yolak haritası oluşturulmuştur. EGFR işlev haritasında yer alan bu yolların aktive olması normal şartlar altında ligand-reseptör bağlanması ile meydana gelmektedir. EGFR'nin iyi tanımlanmış bu fonksiyonları, "kanonikal" EGFR sinyal yolağı olarak bilinmektedir (Lemmon ve Schlessinger, 2010). Ancak otofaji ve metabolizmanın düzenlenmesi gibi EGFR'nin beklenmedik fonksiyonları hem kinaza bağımlı hem de kinazdan bağımsız fonksiyonlar olarak yakın zamanda tanımlanmıştır ve EGFR'nin bu fonksiyonları, "nonkanonikal" fonksiyonlar olarak isimlendirilmektedir. Nonkanonikal EGFR regülasyonu, inflamatuvar sitokinler, ultraviyole ve DNA hasarı oluşturan ajanlar gibi çok çeşitli hücrel ve çevresel stresler tarafından yürütülmektedir (Şekil 2.9 ve Şekil 2.10) (Lee ve ark., 2015).



Şekil 2.9. EGFR sinyal yolağının fonksiyonları özetlenmektedir.

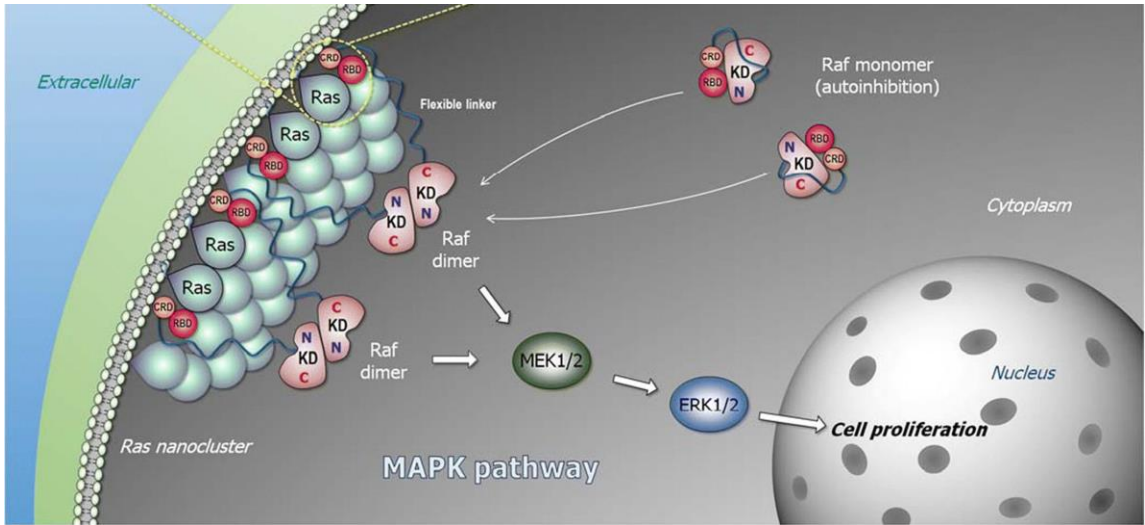


Şekil 2.10. EGFR'nin sinyal yolları ve inhibitörleri. EGFR'nin aktivasyonu, homodimerizasyonu ya da heterodimerizasyonu, spesifik tirozin rezidülerinin fosforilasyonuna ve reseptörlerin hücre içi kısmında çeşitli proteinlerin reseptöre çekilmesine yol açar. Fosfolipaz C γ (pembe) ve STAT transkripsiyon faktörleri (gri) doğrudan reseptöre bağlanırken, Ras / Raf / MAPK yolu (turuncu) ve PI3K yolu (yeşil) birkaç spesifik adaptör molekülüne (sarı) ihtiyaç duyar. PI3K ayrıca EGFR heterodimerlerinin herhangi bir erbB partnerine doğrudan bağlanabilir. Eşzamanlı olarak, aktive edilmiş reseptörler endositoza uğrar ve iki olası yol izlenir: Lizozomal degradasyon veya importin- aracılı nükleer translokasyon. Çekirdeğe girdikten sonra, EGFR ya uygun bir transkripsiyon faktörü gibi (siklin D1 upregülasyonu) ya da diğer gen transaktivatörlerinin düzenleyicisi olarak davranabilir. Her iki yol da hücre proliferasyonu, hayatta kalma, invazyon ve metastaz ile ilgili genlerin nükleer aktivasyonu ile sonuçlanır. EGFR kinaz inhibisyonu için iki ana strateji mevcuttur: Monoklonal antikorlar (mAb) ve küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler). mAb'ler hücre dışında rol alır ve EGFR ligandlarının bağlanmasını önler, oysa TKI'ler reseptörün kinaz domainine ATP bağlanması ile yarışır. DAG 1,2-diaçilgliserol; IP3, inositol 1,3,5-trifosfat; PLC γ , fosfolipaz C γ ; Erk-1, ekstrasellüler sinyalle regüle kinaz-1; Erk-2, ekstrasellüler sinyalle regüle kinaz-2; FAK, fokal adezyon kinazı; PKC, protein kinaz C (Scaltriti ve Baselga, 2006).

2.2.1. RAS-RAF-MEK-ERK Mitojenle Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı:

EGFR kontrolünde yer alan, en göze çarpan ve akışı oluşturan temel yollar arasında RAS-RAF-MEK-ERK (Rat sarkoma- Rapidly accelerated fibrosarcoma- Mitojen-aktive protein kinaz kinaz- Ekstrasellüler sinyalle regüle kinaz) MAPK yolağı yer almaktadır. Hücre büyümesi, proliferasyonu, migrasyonu ve apoptozisin inhibisyonundan sorumludur.

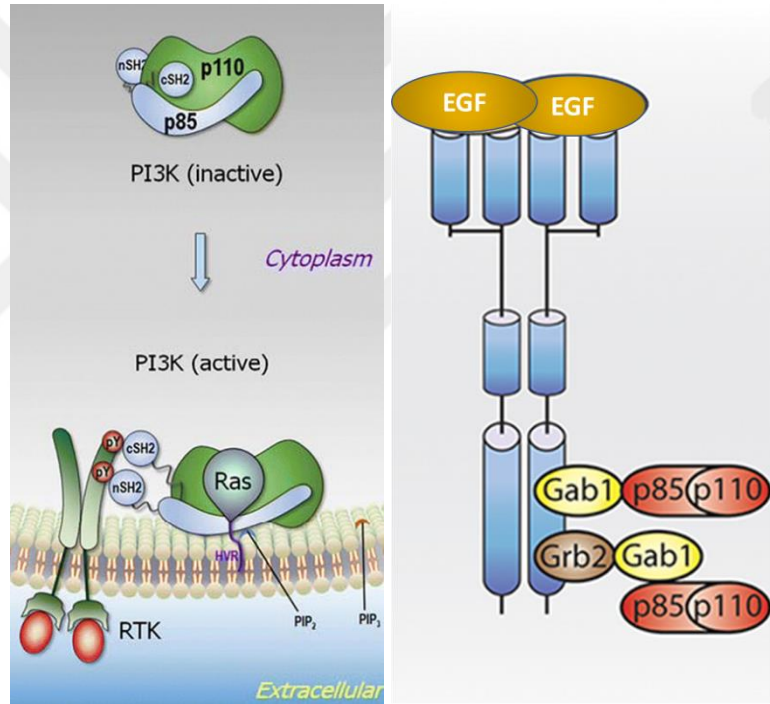
EGFR fosforile edildikten sonra, adaptör proteinleri Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) ve Sos tarafından oluşturulan kompleks, doğrudan veya adaptör molekülü Shc (Src homology 2 domain containing transforming protein) ile kompleks oluşturur ve EGFR üzerindeki belirli yerleşme bölgelerine bağlanır. Bu etkileşim, RAS-GDP'yi bu alana çeker ve RAS aktivasyonu (RAS-GTP) ile sonuçlanan Sos'un konformasyonel değişimine yol açar. RAS-GTP ise RAF-1'i aktive ederek MEK ve ERK 1 ve 2'yi fosforile eder. Aktive edilmiş MAPK'lar, hücre proliferasyonunda rol oynayan spesifik transkripsiyon faktörlerini fosforile etmek için çekirdeğe yönelirler (Scaltriti ve Baselga, 2006) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Ras sinyal yolağı. Ras nanokümeleri oluşturur ve Raf / MEK / ERK (MAPK) yolunda Raf dimerizasyonunu sağlayarak yolağı aktif hale getirir. (Nussinov ve ark., 2019) 'den uyarlanmıştır.

2.2.2. Fosfatidilinozitol 3-Kinaz (PI3K)-Akt- Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Sinyal Yolağı:

ErbB reseptöründeki spesifik yerleşme bölgesine tutunmadan sorumlu olan PI3K, düzenleyici bir p85 subunitesinden ve katalitik bir p110 subunitesinden oluşan dimerik bir enzimdir. P85 subunitesi ErbB reseptöründeki bağlanma bölgesine yerleşimden sorumludur. Katalitik p110 subunitesi ise bir protein serin/treonin kinaz olan Akt'nin fosforilasyonundan ve aktivasyonundan sorumlu olan, ikincil haberci PI3K'yı meydana getirmektedir (Şekil 2.12).



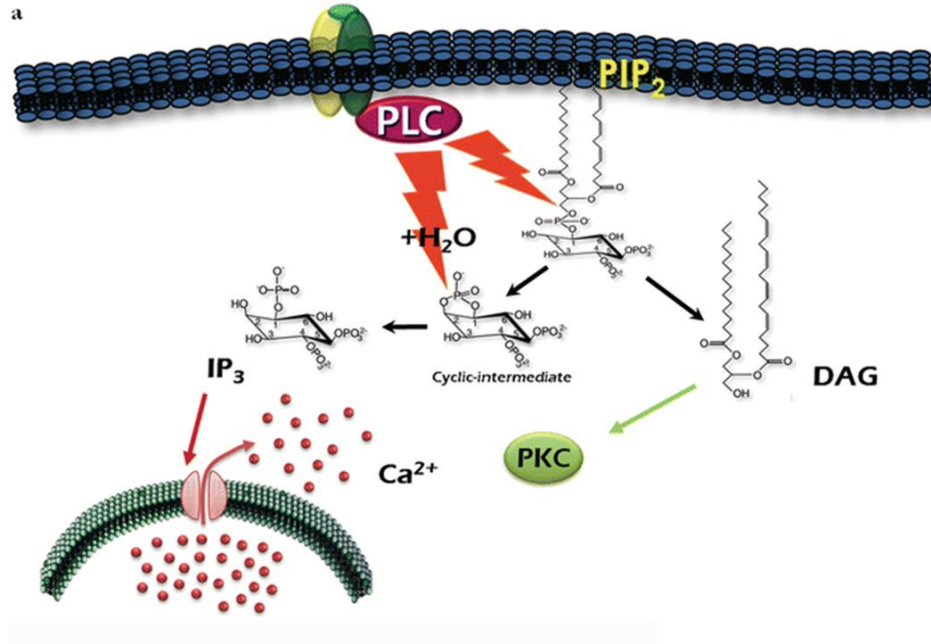
Şekil 2.12. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağındaki düzenleyici p85 subunitesi ve katalitik p110 subunitesine sahip PI3K enziminin reseptör tirozin kinaz (RTK) ile aktivasyonu izlenmektedir. p85 subunitesi yerleşme proteini Gab-1 aracılığıyla EGFR ile etkileşime girmektedir. (Nussinov ve ark., 2019) 'den uyarlanmıştır.

EGFR'ye bağımlı PI3K aktivasyonunu yönlendiren temel mekanizma, EGFR'nin HER-3 ile dimerizasyonudur. EGFR üzerinde p85 için yerleşme bölgesi mevcut değilken HER-3 üzerinde çok sayıda p85 için yerleşme bölgesi bulunmaktadır. Alternatif olarak, p85 subunitesi yerleşme proteini (docking protein) olan Gab-1 (Grb2- -associated-binding protein 1) aracılığıyla da EGFR ile etkileşime girebilmektedir (Scaltriti ve Baselga, 2006).

PI3K-AKT-mTOR sinyal kaskadı hücre büyümesini, apoptoz direncini, invazyonu, migrasyonu ve motiliteyi, metabolizmayı, proliferasyonu, yaşam süresini kontrol eden önemli yollardan biri olup özellikle kanser hücrelerinde aktive EGFR mutasyonlarına bağlı olarak hiperaktivasyon göstermektedir (Mattoon ve ark., 2004; Scaltriti ve Baselga, 2006).

2.2.3. Fosfolipaz C- γ (PLC- γ)- Protein Kinaz C (PKC) Sinyal Yolağı:

EGFR sinyalinin etkisinin genişleyerek hücre içine yayılmasında rol alan diğer önemli bir yolak PLC- γ -PKC yolağıdır (Ji ve ark., 1997; Chattopadhyay ve ark., 1999). PLC- γ aktive EGFR ile doğrudan etkileşime girer ve fosfatidilinositol 4,5-difosfatı hidrolize ederek çözülmüş halde bulunan ve hücre içi kalsiyum salınımından sorumlu inositol 1,3,5-trifosfat (IP₃) yanı sıra hücre membranında yer alan ve PKC aktivasyonunda kofaktör olan 1,2-diaçilgliserolü (DAG) oluşturur. PKC aktivasyonu sonucunda MAPK ve c-Jun aktivasyonuna yardımcı olur (Scaltriti ve Baselga, 2006) (Şekil 2.13).

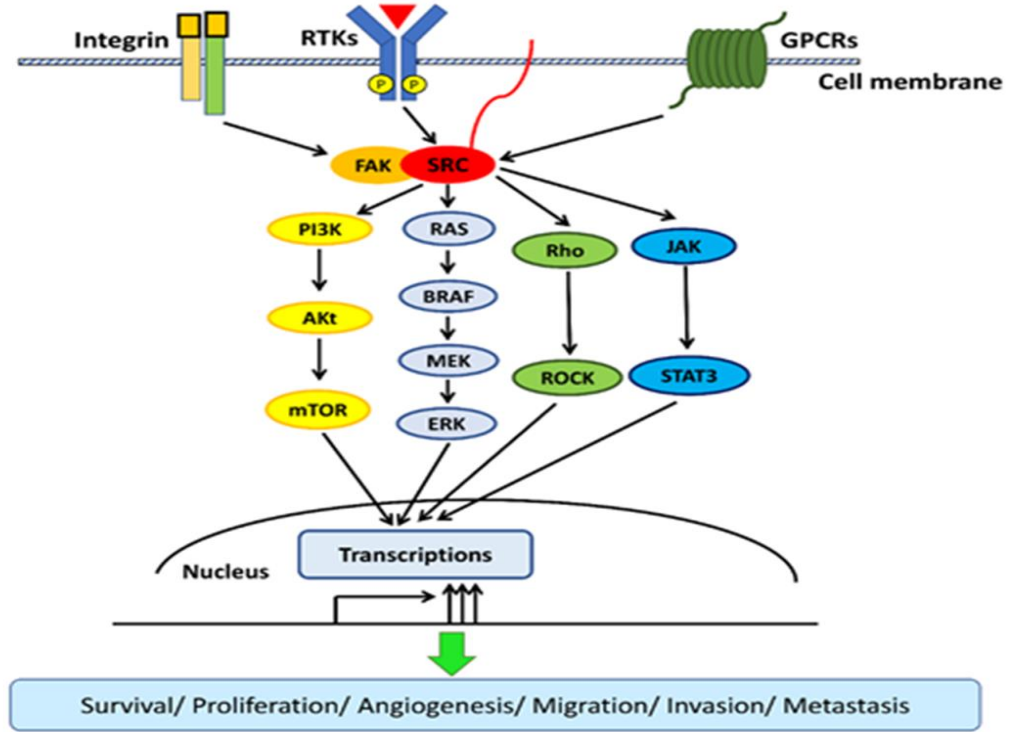


Şekil 2.13. PLC- γ -PKC sinyal yolağı. PLC- γ aktive EGFR ile etkileşime girerek PKC aktivasyonunda kofaktör olan DAG oluşumunu sağlar ve PKC aktivasyonu gerçekleşir. (Jang ve ark., 2018) 'den uyarlanmıştır.

2.2.4. Src (Sarkoma) Kinaz Yolağı:

Src, hücrenin proliferasyon, migrasyon, adezyon, anjiyogenez ve immün fonksiyonların regülasyonunda kritik rol oynayan, tirozin kinaz reseptörü olmayan dokuz genli ailenin en tipik üyesidir. Sitozolde bulunan Src, fokal adezyon kinaz (FAK), PI3K ve sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri (STAT) proteinleri dahil olmak üzere bir dizi substratı aktive eder. Src, bağımsız olarak fonksiyon göstermekle birlikte diğer reseptör tirozin kinazlar ile beraber de çalışabilmektedir.

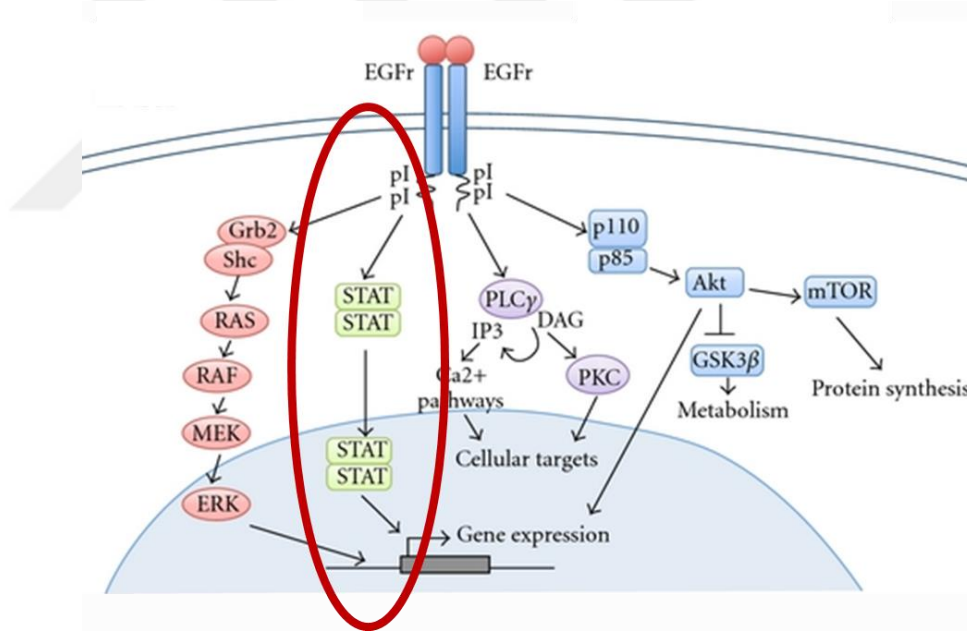
EGFR ve Src arasındaki etkileşim komplekstir. Bir taraftan Src bir sinyal dönüştürücü ve EGFR aktivasyonunun güçlendiricisi olarak çalışırken, diğer yandan bağımsız aktivasyonu nedeniyle veya diğer reseptörlerle ilişkili olarak EGFR tedavilerine dirençte de etkili olabilmektedir. Her ikisinin sinerjistik etkisi daha agresif kanserlere neden olmaktadır (Scaltriti ve Baselga, 2006) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Src kinaz sinyal yolağı. Src, FAK, PI3K ve STAT proteinleri dahil pek çok substratı aktive etmektedir. Böylece hücrenin hayatta kalması, çoğalması, anjiyogenez, migrasyon, invazyon ve metastaz yeteneği gibi pek çok onkogeneze ile ilişkili özelliği kazanmasını sağlar. (Hsu ve ark., 2020) 'den uyarlanmıştır.

2.2.5. STAT Yolağı:

STAT proteinleri, özellikle STAT3'ün sürekli aktivasyonu çok sayıda tümörde gösterilmiştir. EGFR, HER-2 ve trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) gibi membranla ilişkili tirozin kinazların aktivitesinin arttığı durumlarda STAT3'ün de kalıcı aktivasyonu ortaya çıkmakta, böylece onkogenез veya tümör progresyonu sağlanmaktadır. Çünkü STAT proteinleri SH2 domainleri aracılığıyla fosfotirozin rezidüleri ile etkileşime girer ve bu reseptörlerin dimerizasyonu durumunda çekirdeğe giderek spesifik hedef genlerin ekspresyonunu sağlarlar. Sonuç olarak EGFR yapısal STAT3 aktivasyonunu düzenleyerek ve güçlendirerek, kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşma kapasitesini kontrol eden önemli bir sinyal yolağı olarak karşımıza çıkmaktadır (Scaltriti ve Baselga, 2006) (Şekil 2.15).

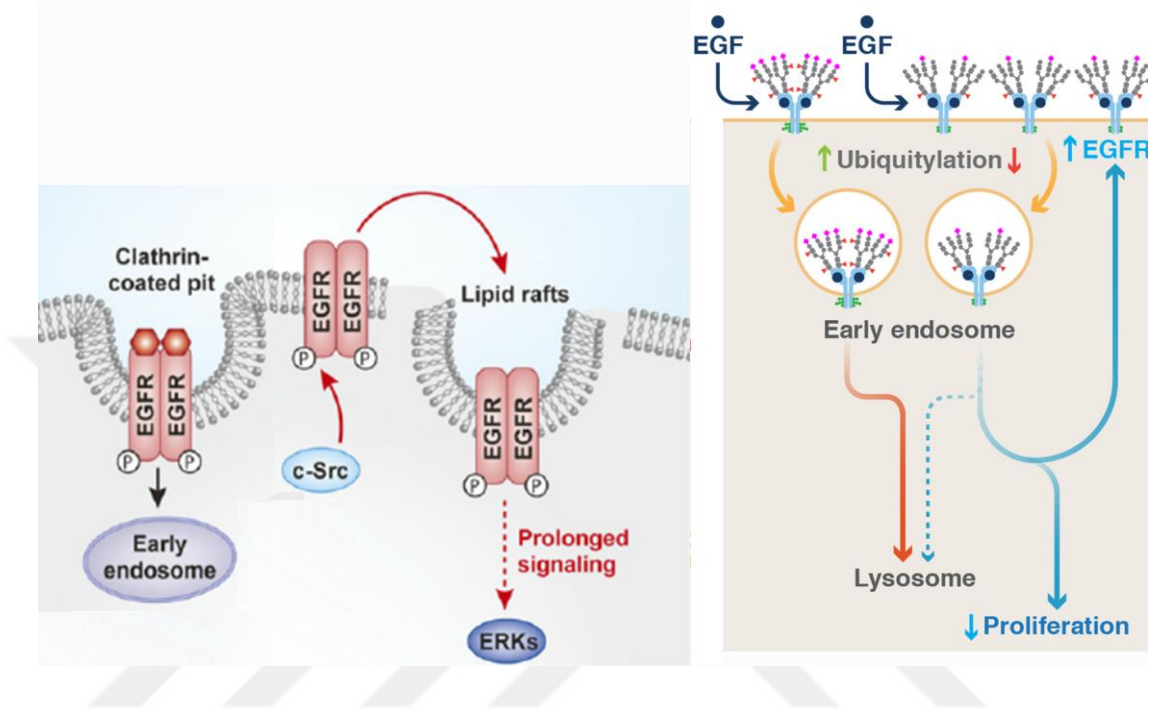


Şekil 2.15. EGFR yapısal STAT aktivasyonunu düzenler ve güçlendirir. (Collin de L'hortet ve ark., 2012)'den uyarlanmıştır.

2.2.6. Endositik Yolak:

EGFR birden fazla endositik yolla hücre içine alınır ve bir kez hücre içine girdiğinde internalizasyona uğrayan EGFR'ler erken endozomlara ulaşır. Bu durum EGFR sinyal yolağının farklı bir şekilde düzenlenmesine olanak sağlar. Örneğin endozom fisyon/füzyon oranı, endozom başına düşen EGFR demetlerinin sayısını değiştirebilir ve

böylelikle proliferasyon ve farklılaşma arasında karar verilmesini sağlayarak EGFR sinyal çıkışı regüle etmiş olur (Sigismund ve ark., 2018) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. EGFR birden fazla endositik yolla hücre içine alınmaktadır. (Chen ve ark., 2012)'den uyarlanmıştır.

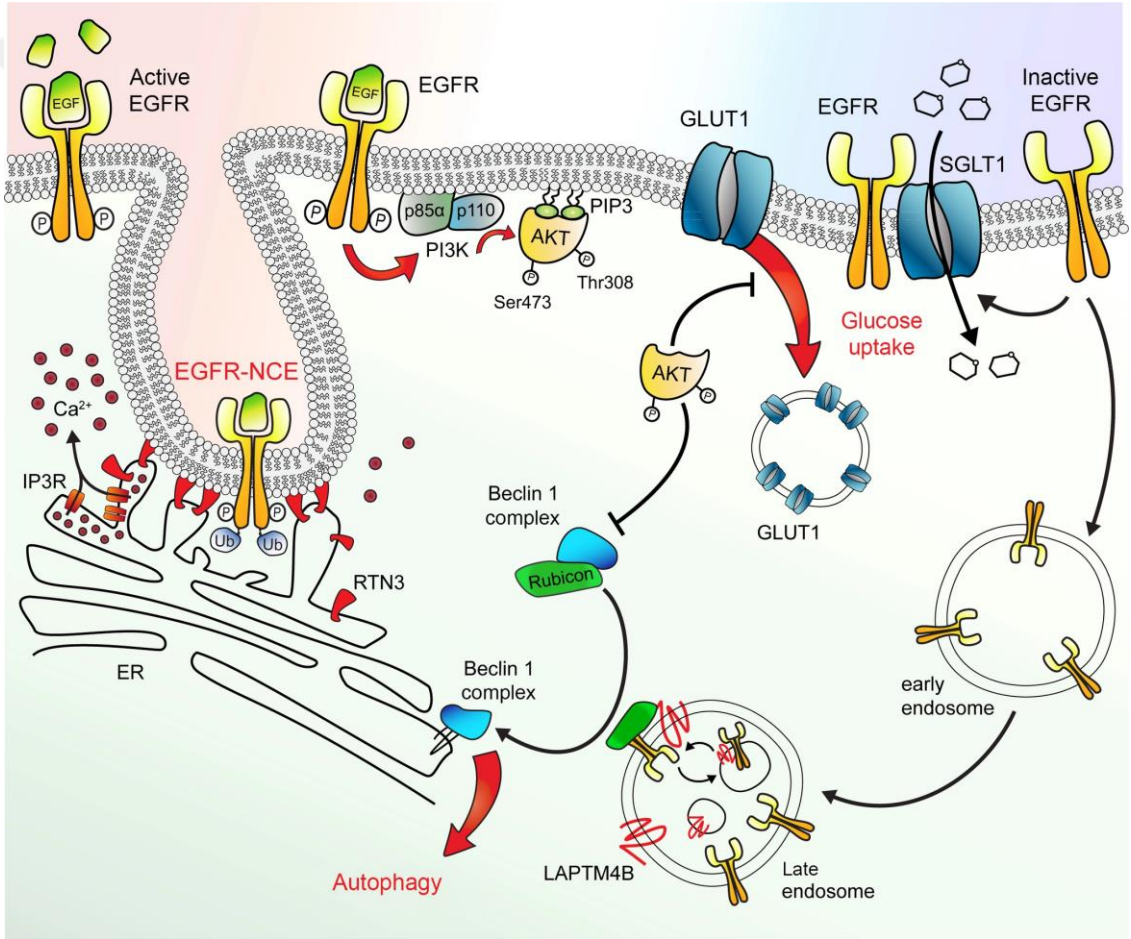
2.2.7. Stres Yolağı:

Hücreler strese girdiğinde (hipoksi, UV vb. yoluyla) EGFR endositozu ve EGFR hareketi ligandan bağımsız bir şekilde yürütülür (Sigismund ve ark., 2018).

2.2.8. Otofaji Yolağı:

EGFR, otofajinin çok önemli bir düzenleyicisidir. Besin açısından zengin koşullarda, EGFR sinyali hücre çoğalmasını indükler ve otofajiyi inhibe eder (Sigismund ve ark., 2018). Ancak serum kısıtlamasının yapıldığı koşullarda, inaktif EGFR otofajiyi başlatabilmektedir. Bu durumda, endozomlara doğru hareket eden liganda bağlı olmayan reseptörler, erken ve geç endozomların bir grubunda yer alan lizozom ilişkili protein transmembran 4β tarafından tutulur. Artmış EGFR endozomal havuzu, otofaji inhibitörü Rubicon ile etkileşime girerek, Rubicon'un Beclin-1'den ayrılmasına ve Beclin-1'in aktivasyonuna neden olur. Böylece EGFR aracılı otofaji başlar (Şekil 2.17). EGFR'nin

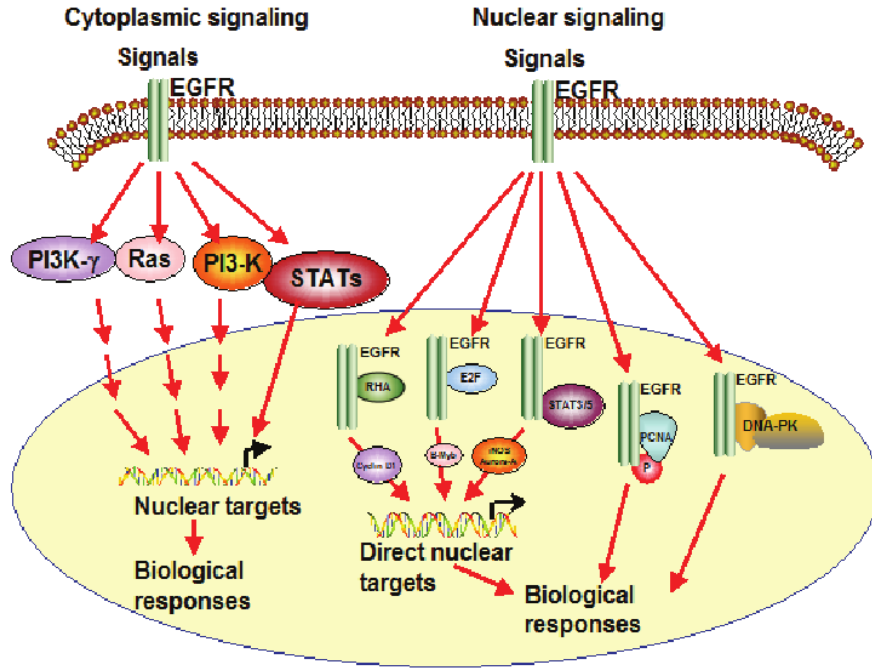
bu fonksiyonu kinaz domaini susturulmuş EGFR mutant hücrelerde de devam etmektedir. Dolayısıyla bu fonksiyonun kinaz aktivasyonundan bağımsız olduğu gösterilmiştir. EGFR'nin kaybı nedeniyle ortaya çıkan otofajinin başlatılamaması durumu, tirozin protein kinaz Met (cMET), PDGFR ve Fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR)-2 gibi diğer RTK'ların kaybı durumunda izlenmemiştir. Sonuç olarak otofajinin başlatılmasının EGFR'ye özgü bir işlev olduğu düşünülmektedir (Tan ve ark., 2015).



Şekil 2.17. EGFR'nin nonkanonik fonksiyonları şematize edilmiştir. Aktif EGFR varlığında ligand ile uyarılmış EGFR, fosforile (P) ve ubiquitine (Ub) olarak hem klatrin aracılı endositoza (gösterilmemiştir) hem de klatrinden bağımsız endositoza uğrar. Liganda bağlanmamış EGFR ise LAPTM4B tarafından erken ve geç endozomlara internalizasyon ile dağıtılmıştır. Burada, inaktif EGFR Rubicon ile etkileşime girerek Beclin-1'den ayrılmasına neden olur. Beclin-1 kompleksi ise ER membranında otofajiyi başlatmaktadır. (Sigismund ve ark., 2018)'den uyarlanmıştır.

2.2.9. Nüklear EGFR Sinyali:

Nüklear EGFR sinyali de hücre siklusunu indükleyerek tümör progresyonunda rol almaktadır. EGFR'nin bir kısmı internalizasyon ve lizozomal degradasyondan kaçabilir ve çekirdeğe gidebilir. Çekirdekte *siklin D1* geninin transkripsiyon faktörü gibi işlev görebilir veya STAT3, E2 promoter bağlanma faktör 1 (E2F1) gibi transkripsiyon faktörlerinin kofaktörü gibi davranabilir. Çekirdekte EGFR lokalizasyonunun fonksiyonel etkileri bilinmemektedir, ancak meme karsinomu hastalarında nüklear EGFR, azalmış genel sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (Hadzisejdic ve ark., 2010) (Şekil 2.18).

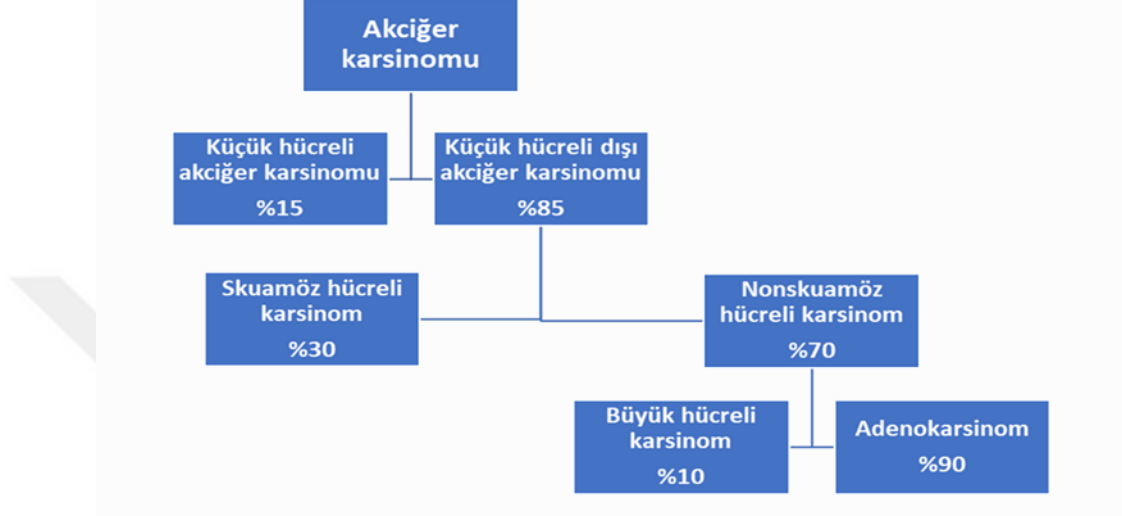


Şekil 2.18. EGFR'nin bir kısmı internalizasyon ve lizozomal degradasyondan kaçabilir. Çekirdekte transkripsiyon faktörü veya transkripsiyon faktörlerinin kofaktörü gibi davranabilir. (Gururaj ve ark., 2011)'den uyarlanmıştır.

2.3. Akciğer Karsinomu:

Akciğer kanserleri dünya genelinde kanserden ölümlerin ilk sırasında yer almaktadır. Küçük hücreli akciğer karsinomu ve küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) olmak üzere genel bir sınıflama yapılmaktadır. KHDAK'ları akciğer kanserlerinin

yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır ve başta adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom olmak üzere çok çeşitli histolojik tiplere ayrılmaktadır (Şekil 2.19).



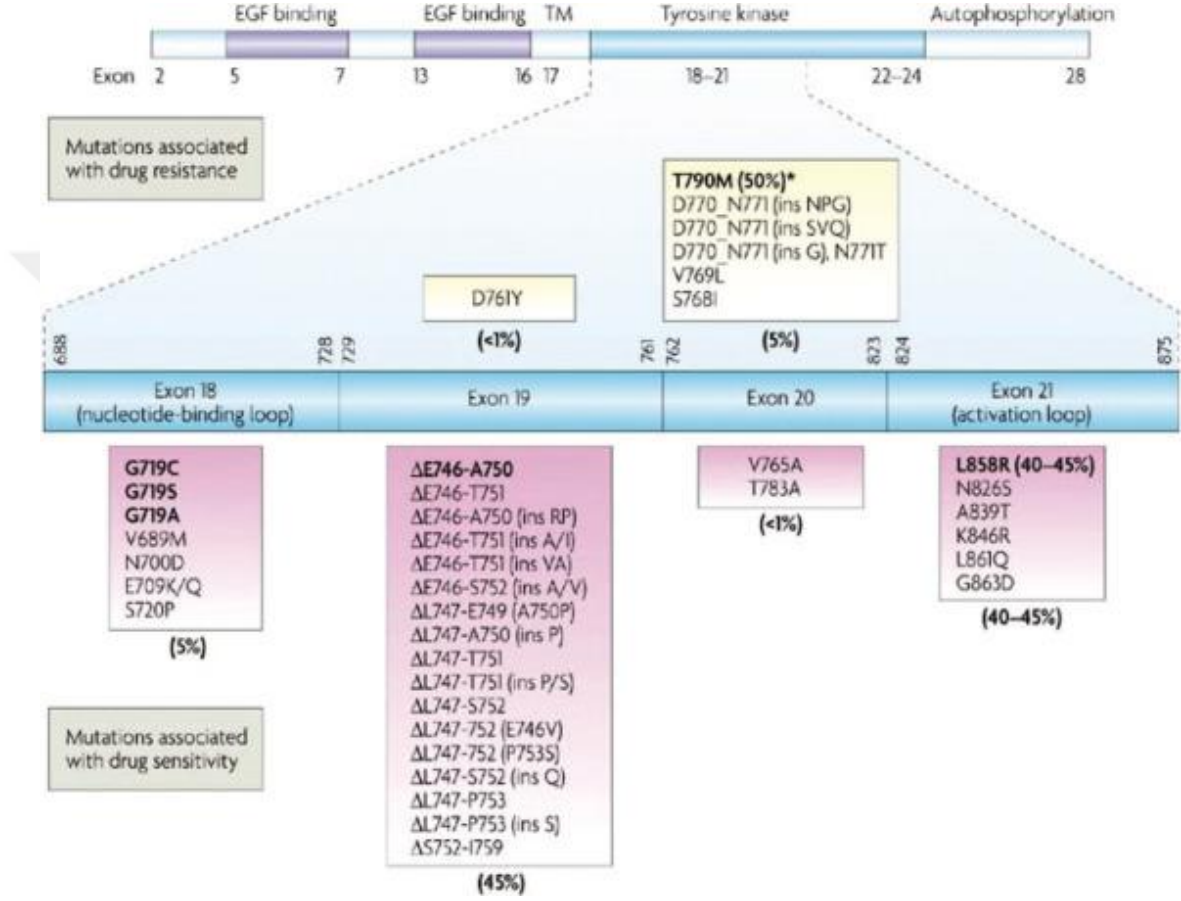
Şekil 2.19. Akciğer karsinomu genel sınıflaması.

Cerrahi işlem, en etkili tedavi olmakla birlikte KHDAK hastalarının çoğunluğu hastalığın ileri evresinde tanı aldığından yalnızca küçük bir hasta grubu için endikedir. İleri evre KHDAK hastaları için sitotoksik ajanlarla sistemik tedavi genellikle standart tedavi rejimi olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, mevcut standart platin bazlı kemoterapiler ile ileri evre KHDAK hastalarında genel sağ kalım 2 yılın altındadır (Hanna ve ark., 2017).

EGFR genindeki aktive edici mutasyonların keşfi ve EGFR hedefli TKI'ların kullanıma girmesi, ileri evre KHDAK hastalarının tedavi stratejisi üzerinde muazzam bir etki sağlamıştır. EGFR mutasyonlarına sahip KHDAK hastalarında platin bazlı kemoterapiye göre EGFR-TKI'lar üstün antitümöral aktivite göstermektedir (Hsu ve ark., 2018; Kalemkerian ve ark., 2018).

Akciğer adenokarsinomlu hastalarda çok çeşitli aktive edici EGFR mutasyonları saptanmıştır. En yaygın EGFR mutasyonları, 19. ekzondaki delesyonlar (747 lösin (L), 748 arginin (R), 749 glutamik asit (E) ve 750 alanin (A)-(ΔLREA)) ve 21.ekzondaki nokta mutasyonu (L858R)'dur. Bu aktive edici mutasyonlar, EGFR'nin yapısal olarak

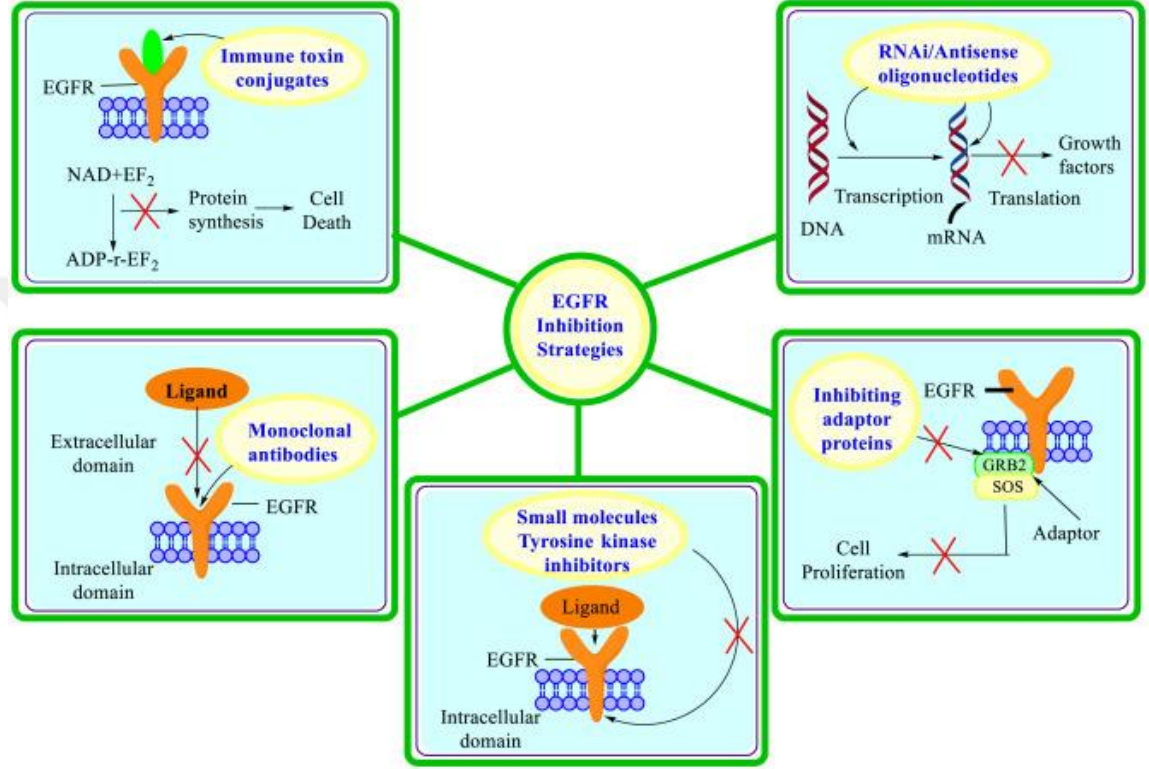
tirozin kinaz aktivasyonu göstermesi nedeniyle onkogeniktir ve KHDAK'nun gelişmesinden ve ilerlemesinden sorumludur (Kalemkerian ve ark., 2018) (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde EGFR mutasyonları. (Sharma ve ark., 2007) 'den uyarlanmıştır.

EGFR ve EGFR kontrolündeki yolların onkogenezdeki rolü göz önüne alındığında EGFR-hedefli tedaviler umut vadetmektedir (Şekil 2.21). Günümüzde bu tedaviler arasında ilk iki sırada monoklonal antikorlar ve EGFR hedefli TKI'lar yer almaktadır. Bu tedavilerden biri EGFR ekstrasellüler domainine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar (Anti-EGFR mAb) (Cetuximab, Panitumumab) ile ligand bağlanmasının engellenmesi veya EGFR protein miktarının azaltılması prensibine dayanmaktadır.

Diğer grup ise günümüzde pek çok ajanı bünyesinde barındıran EGFR hedefli TKI'lardan (Erlotinib, Afatinib, Gefitinib, Osimertinib, Dacomitinib) oluşmaktadır.



Şekil 2.21. EGFR-hedefli tedaviler şematik olarak gösterilmektedir. (Bhatia ve ark., 2020)'den uyarlanmıştır.

2.4.EGFR-Hedefli Tedaviler:

2.4.1. EGFR Monoklonal Antikorları:

Anti-EGFR mAb'ler tümör hücre membranlarında lokalize olan EGFR'ye bağlanır ve ligand EGF ile bağlanma yarışına girerek blokaj meydana getirir. Antikor reseptör kompleksleri daha sonra internalizasyona ve degradasyona uğrayarak tümör hücre membranlarındaki EGFR'nin downregülasyonunu sağlar, böylece EGFR sinyali susturulmuş olur. Ayrıca mAb'ler antikora bağımlı hücresel toksisite gibi immünolojik mekanizma yoluyla da etkinliğini gösterebilmektedir (Agustoni ve ark., 2019).

2.4.2. EGFR Hedefli TKI'lar:

ATP ile yarışan, EGFR'nin kinaz domainine bağlanan, küçük molekülü inhibitörler olan TKI'lar kinaz domainindeki ATP bağlanma cebine ATP'yi taklit ederek bağlanırlar ve bu yolla sinyal transdüksiyonunu engellerler (Ciardiello ve Tortora, 2008). Birçoğu yaygın klinik kullanımdadır.

İki tip inhibitör tanımlanmıştır. Erlotinib gibi tip I inhibitörler, α -C heliksin aktif bölge içine doğru uzandığı kinaz domaininin aktif konformasyonuna bağlanır. Lapatinib gibi Tip II inhibitörler ise α -C heliks uzantısının olmadığı kinaz domaininin inaktif konformasyonuna bağlanmaktadır. Her iki inhibitör de EGFR tirozin kinaz aktivitesini bloke etmektedir ancak farklı tümör tiplerinde farklı etkinlik göstermektedirler (Macdonald-Obermann ve Pike, 2018).

2.5. EGFR Ekspresyonunda Etkili Olabilecek Muhtemel Kinazlar:

EGFR-hedefli tedaviler moleküler bağlamda değerlendirildiğinde EGFR'nin küçük bir bölümünü hedef almış ancak onkolojik tedaviler açısından yeni bir dönem başlatmışlardır. KHDAK'da EGFR hedefli tedavileri daha etkin bir seviyeye çıkarmak için EGFR'nin hücre içi diğer kinazlarla etkileşimlerini değerlendirmek ve yeni tedavi hedefleri belirlemek gerekmektedir. Bu bağlamda KHDAK'da EGFR'nin ekspresyonu üzerine etkili olabilecek muhtemel kinazlar araştırılmıştır. EGFR'nin aminoasit dizilimine bakıldığında bazı spesifik kinazların fosforilasyon yaptıkları motifler dikkat çekicidir (Şekil 2.22). EGFR'nin ekspresyonu üzerine etkili olabilecek muhtemel kinazlar arasında farklı uyaranlarla aktive olabilen ve hücre içi farklı downstream yollar üzerinden çalışan p38, JNK, PKA ve GSK-3 β yer alabilir.

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMF
 NNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLLENLQIIIRGN
 MYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQGQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKL
 TKIICAQQCSGRRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTC
 PLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVDHGSVCVRACGADSYEMEE
 DGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVA
 FRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEII **RGRT**
 KQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSG
 QKTKIISNRGENSCKATGQVCHALC**S**PEGCWGPEPRDCVSC**RNV**SRGRECVDKCN
 LLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC
 PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGM
 VGALLLLLVALGIGLFMRRRHIV**RKRT**LRLLQERELVEPL**TP**SGEAPNQALLR
 ILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKEL**REAT****SP**KANKEIL
 DEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLL
 NWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLV**KTP**QHVKITDFGLAKLLGAEEKEYH
 AEGGKVPIKWMALLESILH**RIYT**HQSDVWSYGVTWELMTFGSKPYDGIPASEISS
 ILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLV
 IQGDERMHLP**SPT**DSNFYRALMDEEDMDDVDADEYLIPQQGFF**SSP**STSR**TPLL**
 SSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQ**RYSS**DPTGALTEDSIDDTFLPVP
 GEWLWKQSCSSTSTHSAAASLQCPQVL**PPAS**PEGETVADLQTQ

SP ve TP: **JNK ve p38 bölgeleri**
 RGRT, RNVS, RKRT, REAT, RIYT ve RYSS: **PKA bölgeleri**
 PPASP: **GSK3-Beta bölgesi**

Şekil 2.22. EGFR intrasellüler kinaz domaini aminoasit dizilimi. Farklı renklerle P38, JNK, PKA ve GSK-3β'nin fosforilasyon yapabilecekleri muhtemel motifler işaretlenmiştir.

2.5.1. P38:

Hücre dışı uyarılara verilen hücresel yanıt MAP kinaz yolları gibi pek çok hücre içi sinyal yolağı tarafından oluşturulmaktadır. MAP kinaz ailesi içinde (1) ERK'ler, (2) JNK, (3) ERK / big MAP kinase 1 (BMK1) ve (4) p38 protein kinaz grubu olmak üzere dört farklı alt grup tanımlanmıştır.

p38α (p38) ilk olarak lipopolisakkaridlere yanıtta fosforile edilen 38-kDa ağırlığında bir kinaz olarak tanımlanmıştır. p38 aktivasyonunun UV, ısı, ozmotik şok, inflamatuvar sitokinler (Tümör nekrozis faktör-α ve interlökin-1) ve büyüme faktörleri (koloni stimüle edici faktör-1) gibi hücre dışı uyarılara yanıt olarak meydana geldiği de gösterilmiştir. p38 ailesi içinde dört splice varyantı tanımlanmıştır: Bunlar; p38α, p38β, p38γ (ERK6, Stres-aktive protein kinaz-SAPK3) ve p38δ (SAPK4) olup, p38α ve p38β

her dokuda eksprese edilirken, p38 γ ve p38 δ doku tipine bağılı olarak belirli hücrelerde eksprese edilmektedir (Zarubin ve Han, 2005).

Aktive olmuş p38 MAPK'lar çok yönlü işlevlerini oldukça büyük bir substrat repertuarı aracılığıyla ortaya çıkarırlar. In vitro ve in vivo olarak 100'den fazla proteinin p38 MAPK'lar tarafından doğrudan fosforilasyona uğradığı ve bunların yaklaşık yarısının transkripsiyon faktörleri (Aktive edici transkripsiyon faktörü- 1, -2, -6, p53 gibi) olduğu gösterilmiştir. Diğer substratları arasında protein kinazlar (örn. MAPK-aktive protein kinaz 2 / 3, Mitogen- and stres-aktive protein kinaz 1 / 2, p38-regüle/aktive protein kinaz), fosfatazlar (örn. Protein fosfotaz 2A), hücre siklusu düzenleyicileri (örn. Siklin D1 ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri), apoptoz düzenleyicileri (örn. Bcl-2 ailesi proteinleri), büyüme faktörü reseptörleri (örn. FGFR-1) ve hücre iskeleti proteinleri (örn. tau, keratin 8) yer alır. Bu substratlar ve bunların hedefleri, inflamasyon, hücre siklusu regülasyonu, proliferasyon, hayatta kalma ve ölüm gibi çeşitli hücresel süreçlerde p38 sinyalinin fonksiyonlarına aracılık ederler (Zou ve Blank, 2017).

Diğer sinyal yollarıyla uyumlu olarak p38 sinyali, onkogen ekspresyonunu etkilemenin yanı sıra, kemoterapi gibi streslere yanıtta hücrenin hayatta kalması ile ölüme gitmesi arasındaki dengeyi belirlemektedir. Bu seçim büyük ölçüde stresin tipine, stresin gücüne ve hücre tipine bağılı ortaya çıkmaktadır. p38 bazı şartlar altında proliferasyonu inhibe ederek ve hücre ölümünü teşvik ederek tümör oluşumunu baskımlarken bazen de tümör hücrelerinin zorlu mikroçevrelere adapte olmalarına yardımcı olarak kanserin ilerlemesine ve kemorezistansa katkıda bulunabilmektedir (Martinez-Limon ve ark., 2020).

Bu ikili rolü nedeniyle p38 MAPK yolunu hedefleyen etkili antikanser tedavileri geliştirebilmek için p38 sinyalini düzenleyen, birlikte veya zıt etki gösteren hücre içi diğer sinyal yolları ile ilişkisinin derinlemesine anlaşılması gerekmektedir.

2.5.2. JNK:

JNK'lar, MAPK'nın stresle aktifleşen serin / treonin protein kinaz ailesidir. MAPK'lar, çoğunlukla inflamatuvar sitokinler, mitojenler, onkogenler, hücre farklılaşması indükleyicileri ve morfogenez indükleyicileri gibi çok çeşitli çevresel stresler tarafından

uyarılırlar (Kumar ve ark., 2015). JNK'lar, üç genden alternatif splicing (kırpılma) yoluyla meydana gelen 10 izoformdan oluşur: JNK1 ve JNK2 (her birinin dört izoformu bulunmaktadır) yaygın eksprese edilirken, JNK3 (iki izoformu bulunmaktadır) beyin, kalp ve testislerde eksprese edilmektedir (Weston ve Davis, 2007).

JNK'lar, stres kinaz mitojen-aktif protein kinaz kinaz (MKK) 4 ve MKK7 yoluyla treonin ve tirozin rezidüleri üzerinden fosforilasyon ile aktive edilirler. İnaktivasyonları ise genellikle negatif geribesleme (feedback) döngüsünde işlev gören MAPK fosfatazlar tarafından indüklenir (Kumar ve ark., 2015).

Proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma ve apoptoz gibi çok sayıda hücrel aktiviteyi düzenleyen başta transkripsiyon faktörleri ve nükleer hormon reseptörleri olmak üzere çok sayıda nükleer protein JNK'nın substrat proteinleri olarak tanımlanmıştır. JNK sinyal yolağının kompleks bir yapılması olup proteinlerin kontrollü degradasyonunda, hücre ve doku morfogenezinde, bağışıklık gibi normal hücrel fonksiyonların devamında önemli rol oynamaktadır (Gkouveris ve Nikitakis, 2017).

JNK'nın kanserdeki rolü tartışmalıdır. Başlangıçta, JNK'ların stres uyarılarına, inflamatuvar ve onkogenik sinyallere yanıt olarak apoptozu indükledikleri ve tümör supresör olarak rol oynadıkları düşünülüyordu. Ancak daha sonraki veriler, JNK'ların ve özellikle JNK1'in malign transformasyona götürebildiğini, tümör büyümesine katkıda bulunabildiğini (Chen, 2012), PTEN kaybı veya BCR-ABL onkogeninin ekspresyonu ile JNK kombinasyonunun hücrenin malign transformasyonunda ve progresyonunda önemli etkisi olduğunu göstermiştir. JNK'nın upregülasyonunun tümör büyümesini arttırdığı ve çeşitli kanser hücre hatlarında ilaç direncini indüklediği de belirtilmiştir. Ayrıca, JNK1 ve JNK2'nin onkogeneiz anlamında karşıt rollere ve doku tipine özgü farklılıklara sahip oldukları da gösterilmiştir. Tüm bunlar bir araya geldiğinde JNK sinyal yolağı daha da karmaşık hale gelmektedir (Vivanco ve ark., 2007; Girnius ve ark., 2018). Bu nedenle hücre içi diğer sinyal yolları ile olan ilişkilerinin hücre tipi bağlamında ve spesifik moleküller düzeyinde araştırılması yeni ve etkin tedavi planlarının geliştirilebilmesi için önem arz etmektedir.

2.5.3. PKA:

Siklik adenozin monofosfat (cAMP), hücre sinyal iletiminde ilk keşfedilen ikincil haberci olup birçok fizyolojik ve patolojik süreci düzenlemektedir. cAMP genellikle PKA aracılığıyla çeşitli hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir. PKA, iki düzenleyici (R) ve iki katalitik (C) alt biriminden oluşan bir tetramerik serin / treonin kinazdır. İki cAMP molekülü iki R alt birimine bağlanır ve iki ayrı aktif C alt birimi ile cAMP-bağlı R alt birim dimeri birbirinden ayrılır. Aktive olmuş bu C alt birimler, serin treonin kinazlar olarak hedeflerinde yer alan nüklear reseptörleri, transkripsiyon faktörlerini, diğer kinazları ve fosfatazları, histonları, iyon kanallarını, G-proteini bağlı reseptörleri, fosfolipazları ve fosfodiesterazları fosforile ederler. cAMP-PKA sinyali, kanser hücresinin büyümesini, migrasyonunu, invazyonunu ve metabolizmasını düzenlemektedir (Zhang ve ark., 2020).

PKA ayrıca Raf ve FAK yanısıra GSK3 gibi birçok kinazı da fosforile edebilmektedir (Wang ve ark., 2019). In vivo şartlarda PKA- SMAD Spesifik E3 Ubikitin Protein Ligaz 1 (Smurf1)- Tip I γ fosfatidilinositol fosfat kinaz sinyal iletiminin akciğer kanserinin progresyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2017). cAMP-PKA-cAMP response element-binding protein (CREB) yolağı akciğer kanser hücrelerinde hipoksi yanıtını da düzenleyebilmektedir (Pullamsetti ve ark., 2013). PKA inhibitörü H-89 ile ve PKA katalitik subunit α knockdownu ile akciğer kanser hücrelerinde hipoksiye bağlı epitelyal-mezenkimal transformasyon, migrasyon ve invazyon da önlenebilmektedir (Shaikh ve ark., 2012). Ayrıca, akciğer kanserinin patogeneğinde önemli rol oynayan oksidatif strese hücre sağ kalımına PKA, ERK 1 / 2 ve CREB arasındaki etkileşimlerde katkı sağlamaktadır (Barlow ve ark., 2008). Asetilkolin reseptör sinyal iletimindeki rolü nedeniyle akciğer kanseri tedavisi için PKA hedeflenmesi önerilmiştir (Russo ve ark., 2006). PKA aktivitesi, bir iskele (scaffold) olarak da çeşitli proteinlerin etkileşimlerine imkan sağlaması bakımından, katalitik alt birimin hedeflenmesi ile durdurulabilmektedir (Caretta ve Mucignat-Caretta, 2011).

PKA'nın içinde yer aldığı sinyal yolaklarının akciğer kanser tedavisine katkı sağladığını bildiren yayınlar da literatürde yer almaktadır. PKA ile indüklenen protein fosfotaz 2A fosforilasyonu Ataxia Telangiectasia Mutated kinase ve Nüklear Faktör kappa B (NF-

κB)'nin inhibe edilerek radyoterapiye bağı apoptozda artış izlendiği, dolayısıyla cAMP-PKA-CREB yolağının radyoterapide antikanser rolü olduğunu gösteren çalışma da dikkat çekicidir (Cho ve ark., 2014). Tüm bu bulgular göz önüne alındığında tek bir molekülün hedeflenmesi yerine onkogeneizde çalışan yolların birlikte inhibe edilmesi daha etkin görülmektedir.

2.5.4. GSK-3β:

GSK-3, α ve β olmak üzere fonksiyonel olarak farklı iki izoforma sahip bir serin / treonin protein kinazdır. Glikojen metabolizmasında keşfedilmekle birlikte çok sayıda sinyal yolağında düzenleyici olarak görev almaktadır. GSK-3β serin ve treonin rezidülerini fosforile ederek ve 100'den fazla fonksiyonel ve yapısal proteinle etkileşime girerek hücredeki birçok temel biyolojik süreci düzenlemektedir. GSK-3β'nin enzimatik aktivitesi, serin (S) 9 (inaktif form) ve Y216 (aktif form) rezidülerinin diferansiyel fosforilasyonu ile ayarlanmaktadır. GSK3β normalde hücrelerde aktiftir, ancak aktivitesinin S9 fosforilasyonu ile negatif regülasyonu sayesinde normal hücrelerin yaşamsal aktivitelerini, hücre içi ve hücre dışı uyaran durumunda homeostazı sürdürmesini sağlamaktadır (Patel ve Woodgett, 2017).

GSK3β, WNT (Wingless ve Int-1) /β-katenin-, hedgehog (Hh)-, notch- ve c-myc aracılı majör pro-onkogenik yolların önemli bir üyesidir. Aynı zamanda epitelyal-mezenkimal transformasyonun negatif bir düzenleyicisidir. GSK3β'nin çeşitli onkogenik yollarda inaktive edildiği bilinmektedir (Nagini ve ark., 2019). Son 15 yılda literatüre katılan çalışmalarda GSK3β'nin anormal ekspresyonunun ve aktivitesinin çeşitli kanser türlerinin progresyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Regülasyonu bozulmuş GSK3β'nin farklı tümör supressör yolları engelleyerek hücrenin hayatta kalmasını, proliferasyonunu ve invazyon yeteneğini artırdığı, hücre ölümsüzlüğünü ve migrasyonu desteklediği gösterilmiş, bu şekilde pro-onkogenik aktivitesi olduğu sonucuna varılmıştır. GSK3β ayrıca kanser hücrelerini kemoterapiye, radyoterapiye ve bazı moleküler hedefli ajanlara da dirençli hale getirmektedir (Domoto ve ark., 2020). Onkogeneiz üzerine etkisi yanı sıra özellikle tedavi üzerine etkisinin gerek tek molekül gerekse de diğer hücre içi sinyallerin oluşmasına ve yayılmasına etkili moleküllerle birlikte araştırılması literatürde çalışmaya açık konular arasındadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

En yüksek EGFR ekspresyonu yapan akciğer kanseri hücre hatları arasında yer alan 3 farklı KHDAK hücre hattı- A549 (ECACC katalog no. 86012804) (yabanıl tip EGFR), H1299 (ECACC General Cell Collection: NCI-H1299; CRL-5803) (yabanıl tip EGFR), H1650 (ECACC General Cell Collection: NCI-H1650; CRL-5883) (mutant EGFR; del E746_A750) çalışmamızda kullanılmış olup Prof. Dr. Osman Nidai Özeş'in laboratuvarından temin edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: A549, H1299 ve H1650 hücre hatlarının özelliklerinin karşılaştırması.

Hücre hatları	A549	H1299	H1650
Hastalık	Karsinom	KHDAK	Adenokarsinom
Yaş ve cinsiyet	58y, erkek	43y, erkek	27y, erkek
EGFR	Yabanıl tip EGFR	Yabanıl tip EGFR	EGFR ekzon 19 mutasyonu (del E746_A750)
Besiyeri	DMEM+%10 FBS	RPMI+%10 FBS	RPMI+%10 FBS

Kriyovialler içindeki donmuş hücre hatları (1×10^6 hücre/ml) sıvı nitrojenden çıkarılarak hemen 37°C su banyosuna alınmıştır. Kapak kısmından tutularak ve hafifçe sallanarak içerisindeki hücre süspansiyonlarının yaklaşık %70'inin çözünmesi sağlanmıştır. Sonrasında %70 etanol ile dezenfekte edilen kriyovialler biyogüvenlik kabinine alınarak içlerindeki hücre süspansiyonları konik santrifüj tüplerinde yer alan, 37°C'ye ısıtılmış, 5ml besiyeri içerisine yavaş yavaş ilave edilmiştir.

A549 hücre hattı %10 Fetal Bovin Serum (FBS-Biochrom cat. No: S0115), %1 oranında Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin B (BI- 03-033-1B) eklenmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium–Biochrom FG0415) besiyeri içinde, H1650 ile

H1299 hücre hatları ise %10 FBS, %1 oranında Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin B (BI- 03-033-1B) eklenmiş RPMI 1640 (PAN-Biotech P04-16500) kullanılarak hazırlanan besiyerleri içinde işleme tabi tutulmuştur. Tüpler 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatantları uzaklaştırılmış ve hücre pelletleri elde edilmiştir. Hücreler 1 ml besiyeri eklenerek homojenize edildikten sonra, 9 ml besiyeri konulmuş petriler içine aktararak petri kapağı üzerine hücre hattı adı, açılma tarihi, dondurulduğu tarihteki pasaj sayısı yazılarak monolayer kültürler halinde (Şekil 3.1) %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatöre (Shel Lab CO₂ Incubator Model 2424/2) alınmışlardır.



Şekil 3.1: Hücre kültürünün 24. saatinde, inverted mikroskop altında hücrelerin konfluensi oranı %30 olarak belirlenmiştir.

3.2. Hücre Hatlarının Pasajlanması

Mikroskop altında petri kabındaki hücrelerin konfluensileri (kültür ortamının çoğalan hücrelerle doluluk oranı) düzenli olarak takip edilmiş ve hücre konfluensileri %80'e ulaştığında hücre hatları pasajlanmıştır. Pasajlama işlemleri şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

Besiyeleri uzaklaştırılarak petri yüzeyindeki hücreler 3ml 1x PBS (fosfat tamponlu salin) solüsyonu kullanılarak yıkanır. Yıkama solüsyonunun uzaklaştırılmasından sonra 37°C'ye ısıtılmış 2ml Tripsin/EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) (Gibco 25-200-056) solüsyonu hücre kültür kabına eklenir. Tripsinin yüzeye yayılması sağlanır ve CO₂'li inkübatöre kaldırılarak yaklaşık 2 dakika tüm hücrelerle etkileşmesi beklenir. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskop (OLYMPUS IX70) altında kontrol edilir ve hücrelerin %90'ı yüzeyden ayrılmışsa 37°C'ye ısıtılmış besiyeri solüsyonu, kullanılan Tripsin-EDTA solüsyonunun 2 katı hacminde olacak şekilde kültür kabına eklenir. Hafif pipetleme yapılarak hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarılır ve 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatanın uzaklaştırılması ile pellet elde edilir. Hücre pelleti 1ml besiyeri ile resüspanse edilir. Sonrasında örnek alınarak hücre sayımı yapılır. Hücre sayısı belirlendikten sonra uygun sayıda hücre (gerekliyse seyreltme yapılarak) $3-4 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde yeni hücre kültür petrisine aktarılır, uygun besiyeri eklenir (total 10ml hacime tamamlanır) ve 37°C, CO₂'li inkübatöre alınarak pasajlama işlemi tamamlanmış olur.

3.3. Hücre Sayımı

Hücre pelleti 1 ml besiyeri ile resüspanse edildikten sonra hücre süspansiyonundan 10µl alınmış, 90 µl tripan mavisi (Sigma-Aldrich T8154) ile karıştırılarak oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. Thoma lamı üzerinde bulunan çukurlara lamel kapatılarak hazırlanan boyalı hücre süspansiyonu lam-lamel arasına yerleştirilmiş ve inverted mikroskop altında hemositometre kullanılarak dört dış, bir merkez olmak üzere karelerdeki canlı (boyanmamış) hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Bulunan sayı sulandırma miktarı olan x50.000 sayısı ile çarpılmış ve sonuç olarak 1ml besiyeri içinde bulunan hücre sayısı elde edilmiştir.

3.4. Hücre Kültüründen Hücre Hatlarının Kuyucuklara Alınması

Hücre kültürlerinden besiyeri uzaklaştırılarak 3ml 1x PBS ile yıkanır. Yıkama solüsyonunun uzaklaştırılmasından sonra 37°C'ye ısıtılmış 2ml Tripsin/EDTA solüsyonu hücre kültür kabına eklenir. Tripsinin yüzeye yayılması sağlanır ve CO₂'li inkübatöre kaldırılarak yaklaşık 2 dakika tüm hücrelerle etkileşmesi beklenir. Hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları inverted mikroskop altında kontrol edilir ve hücrelerin %90'ı yüzeyden ayrılmışsa 37°C'ye ısıtılmış besiyeri solüsyonu, kullanılan Tripsin/EDTA solüsyonunun 2 katı hacminde olacak şekilde kültür kabına eklenir. Hafif pipetleme yapılarak hücre süspansiyonu konik santrifüj tüpüne aktarılır ve 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatanın uzaklaştırılması ile pellet elde edilir. Hücre pelleti 1 ml besiyeri ile resüspanse edilir. Sonrasında örnek alınarak hücre sayımı yapılır ve hücre süspansiyonları 0.5×10^6 hücre/ml olacak şekilde dilüe edilir.

Hücre sayısı belirlendikten sonra 6 kuyucuklu plaklardaki her bir kuyucuğa 1 ml hücre süspansiyonu transfer edilir. Serum kısıtlaması (starvasyon) yapmak için üzeri serum içermeyen besiyeri ile 2 ml'ye tamamlanır ve 18 saat serumsuz besiyeri ortamında kültüre edilir (konflüens yaklaşık %70). İnkübasyonu tamamlanan hücreler deney düzeneğine göre muamele edilir.

3.5. Hücre Hatlarının EGF ve Spesifik Kinaz İnhibitörleri ile Muameleleri

6 kuyucuklu plaklara alınan A549, H1299 ve H1650 hücre hatlarının her biri tedarikçi firmalarca (datasheet) önerildiği şekilde serumsuz besiyerlerinin uzaklaştırılmasından sonra final konsantrasyonu 10 ng/ml olan EGF (Sigma-Aldrich- E1257) ile muamele edilmiştir. Ardından 10. dakikada EGF uzaklaştırılmış, 1ml 1x PBS ile yıkama sonrası hücre lizatlarının hazırlığına geçilmiştir (Wang ve ark., 2011).

Bu deney sonrasında en yüksek EGFR ekspresyon seviyesine sahip hücre hattı belirlenerek bundan sonraki deneylere o hücre hattı ile devam edilmiştir.

3.6. Hücre Hatlarının EGF ile Muamele Edilme Süresinin Belirlenmesi

En yüksek EGFR ekspresyon seviyesine sahip hücre hattı belirlendikten sonra bu hücre hattında EGF muamelesi sonrası zaman değişkenine göre EGFR ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir.

6 kuyucuklu plaklarda inkübe edilmiş hücrelere 10 ng/ml EGF muamelesi yapılmış ve 0. dk, 5. dk, 15. dk, 30. dk, 45. dk ve 60. dk'da hücre lizatları elde edilerek EGFR ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. En yüksek ekspresyon seviyesinin elde edildiği süre belirlenerek bundan sonraki deneylerde belirlenen bu süre kadar EGF muamelesi yapılmıştır.

3.7. Hücre Hatlarının Muamele Edileceği Spesifik Kinaz İnhibitör Dozlarının Belirlenmesi

Bu çalışmada P38 inhibitörü (Santa Cruz, SB203580, sc-3533), JNK inhibitörü (Santa Cruz, SP600125, sc-200635), PKA inhibitörü (Santa Cruz, sc-201159) ve GSK-3 β inhibitörü (Santa Cruz, sc-202635) kullanılmıştır. Tedarikçi firma tarafından önerildiği şekilde (datasheet) stok halinde alınan inhibitörler DMSO (Dimetilsülfoksit, Sigma) ile dilüe edilmiştir. QuickCalcs (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/molarityform/>) programı kullanılarak, moleküler ağırlıkları ve mevcut stok miktarları üzerinden konsantrasyon 2 mM olacak şekilde inhibitörlere eklenecek dilüsyon solüsyonu miktarı hesaplanmıştır. Sonrasında IC50 (maksimum inhibitör konsantrasyonunun yarısı) değerlerine göre μ M cinsinden uygun miktardaki inhibitörün 1ml besiyeri içine eklenmesi için gerekli olan volümler hesaplanmıştır. Buna göre P38 inhibitörü 5 μ M, JNK inhibitörü 1 μ M, PKA inhibitörü 1 μ M ve GSK-3 β inhibitörü 5 μ M konsantrasyonda olacak şekilde deneylerde kullanılmışlardır.

3.8. Spesifik Kinaz İnhibitörleri ve EGF Muamelesine Göre Deney Gruplarının Oluşturulması

EGFR'nin aktivasyonu için gerekli olan kinaz domainindeki tirozin rezidülerinin fosforilasyonunda etkili olabilecek olası kinazların EGFR ekspresyonuna etkisini araştırmak için bu kinazların inhibisyonu yapılmıştır. Sonrasında EGF stimülasyonu varlığında ve yokluğunda EGFR ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Bunun için kontrol grubu, JNK inhibitörü uygulanan grup, GSK-3 β inhibitörü uygulanan grup, P38 inhibitörü uygulanan grup ve PKA inhibitörü uygulanan grup olmak üzere gruplar oluşturulmuştur, bu gruplarda kendi içlerinde EGF ile muamele edilen ve edilmeyen şeklinde alt gruplara ayrılmıştır. Böylece toplamda 10 çalışma grubu elde edilmiştir.

3.9. Spesifik Kinaz İnhibitörlerinin Uygulanması

6 kuyucuklu plaklarda 18 saatlik inkübasyon süresini tamamlayan hücreler, gruplara göre isimlendirilmişlerdir. Öncelikle besiyerleri uzaklaştırılmış ve gruplara ayrı ayrı spesifik kinaz inhibitörleri (P38 inhibitörü 2.5 µl, JNK inhibitörü 1 µl, PKA inhibitörü 2.5µl ve GSK-3β inhibitörü 2.5 µl) belirtilen dozlarda 1ml besiyerine eklenmiş olarak verilmiş, hücreler bu inhibitör içeren besiyerleri ile 1 saat muamele edilmiştir. İnhibitörle muamele sonrası kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılmış, 1ml 1x PBS ile yıkama yapılmıştır. Gruplardan EGF stimülasyonu yapılmayacak olanlarda lizatların eldesi basamağına geçilmiştir. EGF stimülasyonu yapılacak gruplar ise yıkama işlemi sonrası 10 ng/ml EGF ile muamele edilmişlerdir. EGF uygulamasının 5. dakikasında EGF içeren besiyeri uzaklaştırılmış, 1ml 1x PBS ile yıkama yapılmış ve sonrasında lizatların eldesi basamağına geçilmiştir.

3.10. Hücre Lizatı Eldesi

Hücre hatlarının besiyeri uzaklaştırılarak, 1ml 1x PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra 250 µl Triton-X Lizis Tamponu (pH 7.4) kullanılarak hücre kazıyıcısı (Greiner cell scraper 541 080) ile lizatlar hazırlanmıştır. Lizatlar 1,5 ml'lik ependorflara alınarak -80 °C'de saklanmıştır. Deney öncesi lizat içeren ependorf tüpler 1 dakika vortekslenerek çözdürülmüş ve 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatantları ayrılmış ve protein konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.11. Hücre Lizatlarının Protein Konsantrasyonunun Bradford Yöntemi ile Belirlenmesi

Bradford (BioRad 500-0006) reaktifi distile su ile 5 kat seyreltilerek ve 10 mg/ml stok Bovin Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich A5611) solüsyonundan 1 µg/µl olacak şekilde BSA hazırlanmıştır. Standart eğriyi elde etmek için BSA solüsyonundan üçlü tekrarlar şeklinde 96 kuyucuklu kültür kaplarına 0, 0.5, 1, 3, 5, 7 ve 9 µl olacak şekilde, hücre lizatlarından ise 1 µl yine üçlü tekrarlar halinde 96 kuyucuklu kültür kaplarına konulmuştur. Bradford reaktifi 100µl eklenerek 595 nm dalga boyunda Thermo MultiscanGo cihazı ile protein miktarı tayini yapılmıştır. Üçlü tekrarların ortalama değerleri alınarak oluşturulan standart eğrinin formülüne göre hücre hattı lizatlarındaki protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.12. Western Blot Yöntemi

3.12.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE yüklü molekülleri (proteinlerin) elektrik alan varlığında moleküler kütlelerine göre ayıran analitik bir yöntemdir. Proteinler amfoterik moleküller (hem pozitif hem de negatif yüklere sahip) olup tek yönlü hareket ettirebilmek için proteinlerin yüzey aktif madde olan SDS yardımıyla (1,4 gr SDS 1 gr proteine bağlanmakta) düzgün bir şekilde negatif yük alması sağlanır. SDS proteinleri denatüre ederek tüm proteinlerin benzer yapı almasını ve anyonik bir deterjan molekölüne bağlanma sonucunda da tüm proteinlerin homojen dağıtılmış negatif yüke sahip olmasını sağlar. Elektrik alan içinde proteinler anottan katota doğru moleküler kütlelerinin büyüklüğü ile ters orantılı hızda ilerlerler. Böylece proteinlerin ayrımı yük temelinde değil moleköl ağırlıklarına göre yapılmış olur. SDS-PAGE sistemlerinde kesintili jel sistemi (ayırıştırıcı ve yükleme jelleri) kullanılmaktadır.

Elektroföze için kullanılacak tüm cam malzemeler ve jelin konulacağı kaset deterjan ile yıkanıp durulandıktan sonra distile sudan geçirilmiştir. Tüm cam malzemeler %70'lik etanol ile silinmiş ve kalıntılardan temizlenmiştir. Jel kaseti, elektroföze sisteminin kullanım kitapçığında belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Elektroföze de kullanılacak solüsyonların formülleri bu bölümün sonunda ayrıntılı olarak verilmiştir.

İşaretlemek istediğimiz EGFR proteini yaklaşık 175 kDa olduğundan işaretleme ve rezolüsyon etkinliği açısından 150-200 kDa aralığındaki proteinlerin eldesi için %7'lik ayırıştırıcı jel kullanımı tercih edilmiştir.

Tablo 3.1: Ayırıştırıcı Jel Hazırlama Ölçüsü

Ayırıştırıcı Jel	%7
Distile su	15 ml
Ayırıştırıcı Tampon	7,5 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (29/0.8)	7,05 ml
10% SDS	300 µl
%10 APS (Amonyum Persülfat)	300 µl
TEMED (Tetrametiletildiamin)	30 µl

APS (Sigma A3678) ve polimerizasyonu başlatmak için TEMED'in (Sigma-Aldrich T9281) eklenmesinden sonra elde edilen karışım iki cam arasına kasetin 4/5'ini dolduracak şekilde doldurulmuş ve dökülen ayırıştırıcı jelin üst yüzeyinin düz olması ve oksijenle temasını kesmek için jelin yüzeyini örtecek şekilde %1 SDS eklenmiştir. Ardından yükleme jeli hazırlanmıştır.

Tablo 3.2: Yükleme Jeli Hazırlama Ölçüsü

Yükleme jeli	5 ml
Distile su	3 ml
Yükleme tamponu	1,25 ml
Akrilamid/Bisakrilamid (29/0.8)	625 µl
%10 SDS	50 µl
%10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

Ayrıştırıcı jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra üst yüzeydeki SDS uzaklaştırılarak enjektörle yükleme jel karışımı eklenmiştir. Proteinlerin yükleneceği kuyucukların oluşturulması için 15'lik tarak takılmış ve jelin donması için 1 saat beklenmiştir.

3.12.2. Yüklenecek Örneklerin Hazırlanması ve Jelde Yürütülmesi

Bradford yöntemiyle lizat içerisindeki total protein miktarı belirlenmiş ve arkasından her bir örnek için protein miktarı 50 µg olacak şekilde lizatlar alınmış ve üzerlerine lizat hacminin yarısı kadar β-merkaptoetanol (SigmaM3148) içeren SDS yükleme tamponu eklenmiştir. Bu işlem sonrası jele yüklenecek tüm örnekler 95 °C'de 5 dk Dry Block Heating Thermostat (Bio TDB- 32 100) cihazında (hotplate) inkübe edilmiştir. Sonrasında uygun pipet uçlarıyla hazırlanan bu örnekler poliakrilamid jele, jelin ilk sırasında protein marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) olacak şekilde yüklenmişlerdir. Jele yüklenen örnekler yükleme jelini geçene kadar 120 voltta, ayrıştırıcı jelde ise 150 voltta 1x Western yürütme tamponu ile yürütülmüştür (Cihaz: Amersham 80-6171-96).

3.12.3. Yürütülmüş Proteinlerin Polivinilidin Florid (PVDF) Membrana Transferi

Yürütülen örnekleri görüntülemek için proteinlerin jelden PVDF membrana transferi gereklidir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jelin polimerleşmesi ve daha kolay çıkabilmesi için camlar akar soğuk su altında yıkanmıştır. Transfer sırasında transfer cihaz aparatları (ekipmanları), transfer süngerleri, whatman kâğıdı (Sigma Z691011), PVDF membran (Biorad Cat. No: 1620177), Western transfer tamponu ve metanol (Sigma-Aldrich 34860) kullanılmıştır. Transfer aparatının negatif yüklü olacak siyah kısmına western transfer tamponu ile ıslatılmış transfer süngerlerinden biri yerleştirilmiştir. Uygun ölçüde kesilerek hazırlanmış ve transfer tamponu ile ıslatılmış 3 kat whatman kâğıdı yerleştirilmiştir. Cam plakalar arasında yer alan protein örneklerin yürüdüğü jel dikkatlice alınıp whatman kâğıdı üzerine konulmuştur. Poliakrilamid jelin üzerine saf metanol ile 3 dakika ıslatılmış PVDF membran hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilerek yerleştirilmiştir. Sonra sırasıyla transfer tamponu ile ıslatılmış 3 kat whatman kâğıdı ve en üste transfer tamponu ile ıslatılmış transfer süngeri ve pozitif yüklü olacak kırmızı plate konularak transfer aparatları kapatılmıştır. Transfer cihazı

transfer tamponu ile doldurulmuş, hazırlanmış transfer aparatları ve buz aküsü yerleştirilmiştir. Transfer cihazı buzdolabına alınıp, gece boyu 40V elektrik akımı ayarlanıp proteinlerin membrana transferi sağlanmıştır.

3.12.4. PVDF Membranın İşaretlenmesi

Proteinlerin PVDF membrana transferinin ardından, transfer aparatları çıkarılmış ve siyah plate tabanda kalacak şekilde katmanları açılmıştır. Membranlar proteinlerin fikse olması için saf metanol içinde 1 dakika bekletilmiştir. Kuruyan membranlar %1'lik BSA solüsyonu ile 2 saat boyunca çalkalayıcı (Stuart SSM1 Orbital Shaker) üzerinde bloklanmıştır.

Primer ve sekonder antikorlar membran üzerine aşağıda belirtilen şekilde uygulanmıştır; Anti-EGFR antikor (1/700 dilüsyonda- Santa Cruz, sc-373746) ile 1,5 saat oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Anti-EGFR antikor uzaklaştırıldıktan sonra, membranlar zemin boyanmasını engellemek için 1x PBS-T (Tween-20) (Merck 8.22184.1000) ile çalkalayıcı üzerinde 2 kez 20'şer dakika yıkanmıştır. Ardından %1'lik BSA içerisinde 1/5000 dilüsyonda hazırlanmış Anti-Mouse sekonder antikor (KPL, 474-1806) ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından membranlar 1x PBS-T ile çalkalayıcı üzerinde 2 kez 20'şer dakika yıkanmıştır.

GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) (Santa Cruz, sc-47724) (37 kDa) internal kontrol olarak tüm primer antikorların uygulandığı membranlarda karşılaştırmaların yapılabilmesi için uygulanmıştır. Sonraki aşamalar yukarıda anlatıldığı şekilde bu membran için de tekrarlanmıştır.

Yıkanan membranlar ECL (Elektrokemilüminesans) reaktifi (Biorad Clarity ECL Cat.1705061) ile 1 dakika muamele edildikten sonra ECL reaktifi uzaklaştırılmıştır. Ardından karanlık odada kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak membran üzerindeki spesifik sinyaller membranın üzerine radyolojik film (Kodak 8116428) konarak ve 1 dakika bekletilerek aktarılmıştır. Filme geçen sinyaller developer solüsyonu ile güçlendirilmiş, sabitleyici solüsyonunda sabitlenerek su içerisinde yıkanmış ve kurutulmuştur.

3.13. Grafikler ve İstatistiksel Analizler

Western Blot sonuçları Image J yazılımı (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) ile analiz edilmiş ve grafikler GraphPad Prism 8 yazılımı ile oluşturulmuştur. Diğer analizler için de aynı yazılım kullanılmıştır.

3.14. Deneyler için Gerekli Kimyasallar ve Hazırlanışları

5x PBS (pH 7.4): 800 ml distile su içerisinde 1,2 gr KH_2PO_4 , (Merck 104873) 1 gr KCl (Merck 160332), 40 gr NaCl (Merck 106404), 7,2 gr Na_2HPO_4 (Merck 106586) çözülmüştür. NaOH (Merck 106462) ve HCl (Sigma-Aldrich H1758) ile pH 7.4'e ayarlanarak hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

1x PBS: 800 ml distile su içine 200 ml 5x PBS konularak elde edilmiştir.

Triton-X Lizis Tamponu (pH 7.4): 100 mM Sodyum Florür (Sigma S7920), 50 mM HEPES (Sigma H3375), 150 mM NaCl, %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2 Triton-X100 (Merck 1.08603.1000), 1 mM Magnezyum Klorür (Sigma M8266), 1 mM EGTA (Amresco 0732), 1 mM Sodyum-o-vanadate (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche- 11836145001).

Stok BSA (10 mg/ml): 100 mg BSA 10 ml steril su içerisinde çözdürülüp 0,2 µm porlu filtreden geçirilerek -20°C'de saklanmıştır.

Ayrıştırıcı Tampon (1,5M TrisBase) (pH 8.8): 400 ml distile su içinde 90,85 gr Tris Base (Fisher, BP152-1) çözülüp HCl ile pH 8.8'e ayarlanmıştır. Hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Yükleme Tamponu (0,5M TrisBase) (pH 6.8): 400 ml distile su içinde 30,28 gr Tris Base çözülüp HCl ile pH 8.8'e ayarlanmıştır. Hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Akrilamid/Bisakrilamid (29/0.8): 1 litre distile su içinde 290 gr Akrilamid (Merck 8008300100), 8 gr Bisakrilamid (Merck 2610) çözülüp 0,2 µm'lik vakum filtreden geçirilmiş ve ışık geçirmeyen şişelerde saklanmıştır.

%10 SDS: 300 ml distile su içinde 50 gr SDS çözülüp hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

%10 APS: 1 ml distile su içinde 0,1 gr APS (Sigma A3678) çözülerek kullanım öncesi taze hazırlanmıştır.

1M Tris-HCl: 800 ml distile su içinde 121,1 g Tris Base çözülerek HCl ile pH istenen değere ayarlanıp, hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

SDS Yükleme Tamponu: 3 ml %10 SDS, 1 ml gliserol, 1.25 ml 1M Tris-HCl pH 6.7, 1,2 µg bromofenol mavisi (Merck 108122) ile hazırlanmıştır. 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek alikotlanmış ve -20°C'de saklanmıştır. Kullanım öncesi 1 ml'ye 50 µl β-merkaptoetanol ilave edilmiştir.

10x Western Yürütme Tamponu: 900 ml distile su içinde 15 gr Tris Base ile 94 gr Glisin çözülüp 50 ml %10 SDS eklendikten sonra hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

1x Western Yürütme Tamponu: 1350 ml distile su ile 150 ml 10x Western yürütme tamponu eklenerek karışım elde edilmiştir.

Western Transfer Tamponu: 2 litre distile su içinde 14,5 gr Tris Base, 7,5 gr Glisin çözülerek kullanım öncesinde 500 µl metanol eklenerek hazırlanmıştır.

1x PBS-T: 800 ml distile su içerisine 200 ml 5xPBS ve 1 ml Tween-20 eklenerek karışım elde edilmiştir.

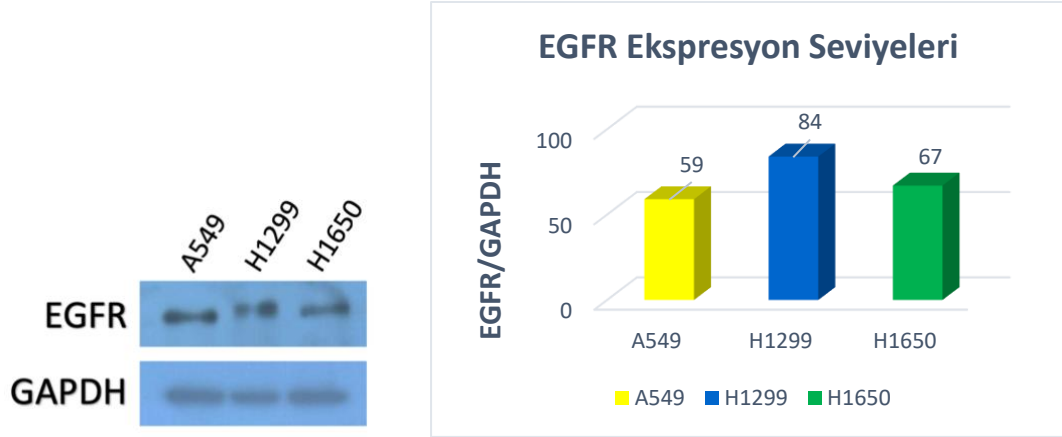
%1 BSA Bloklama Solüsyonu: 1 gr BSA, 100 ml PBS-T içerisinde çözülüp filtre kağıdından geçirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. A549, H1299 ve H1650 Hücre Hatlarında EGFR Ekspresyonu Analizi Sonuçları

En yüksek EGFR ekspresyonu yapan akciğer kanseri hücre hatları arasında yer alan A549 (ECACC katalog no. 86012804) (yabanıl tip EGFR), H1299 (NCI-H1299; CRL-5803) (yabanıl tip EGFR) hücre hatları ve H1650 (NCI-H1650; CRL-5883) (mutant EGFR; del E746_A750) hücre hattı eşit sayıda tümör hücresi içerecek şekilde pasajlanarak çoğaltılmıştır.

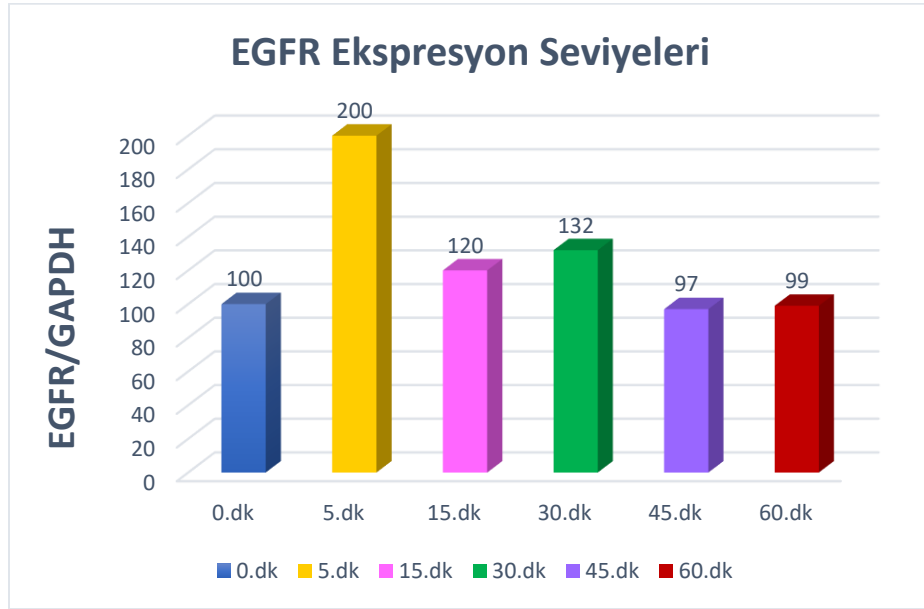
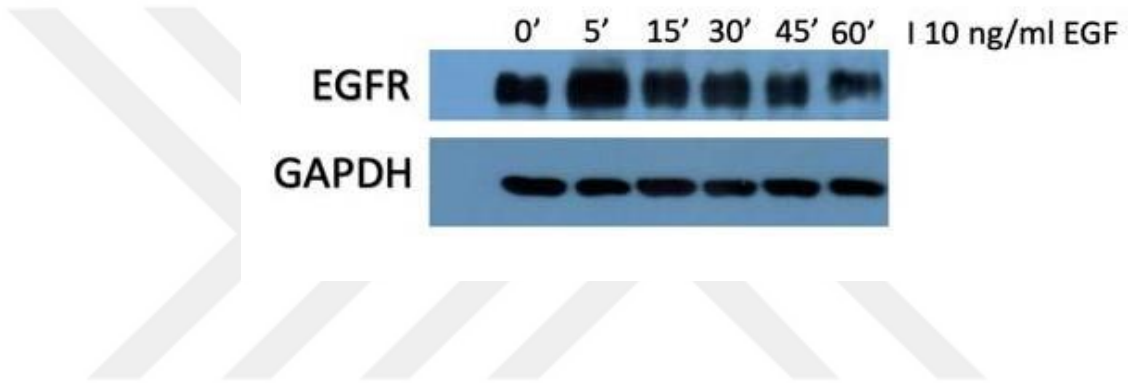
EGF muamelesi sonrası 10. dakikada hücre lizatları elde edilmiş ve Western blot yöntemi ile EGFR ekspresyonu açısından analiz edilmiştir. GAPDH'e oranlanarak EGFR protein miktarları karşılaştırıldığında en yüksek EGFR ekspresyonu H1299 hücre hattında izlenmiştir (Şekil 4.1). Bu bulgu nedeniyle bundan sonra yapılan tüm deneylerde H1299 hücre hattı kullanılmıştır.



Şekil 4.1. A549, H1299 ve H1650 akciğer kanseri hücre hatlarında Western blot yöntemi ile belirlenen EGFR ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.

4.2. H1299 Hücre Hattında EGF Muamelesi Sonrası En Yüksek EGFR Ekspresyonu Elde Edilen Süre

H1299 hücre hattında EGF muamelesi sonrası 0. dk, 5. dk, 15. dk, 30. dk, 45. dk ve 60. dk'da hücre lizatları elde edilmiş ve EGFR ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. En yüksek EGFR ekspresyon seviyesi 5. dakikada elde edilmiştir (Şekil 4.2). Bundan sonraki deneylerde EGF muamelesi yapılan H1299 hücre hatlarından lizat eldesi EGF muamelesi sonrası 5. dakikada yapılmıştır.

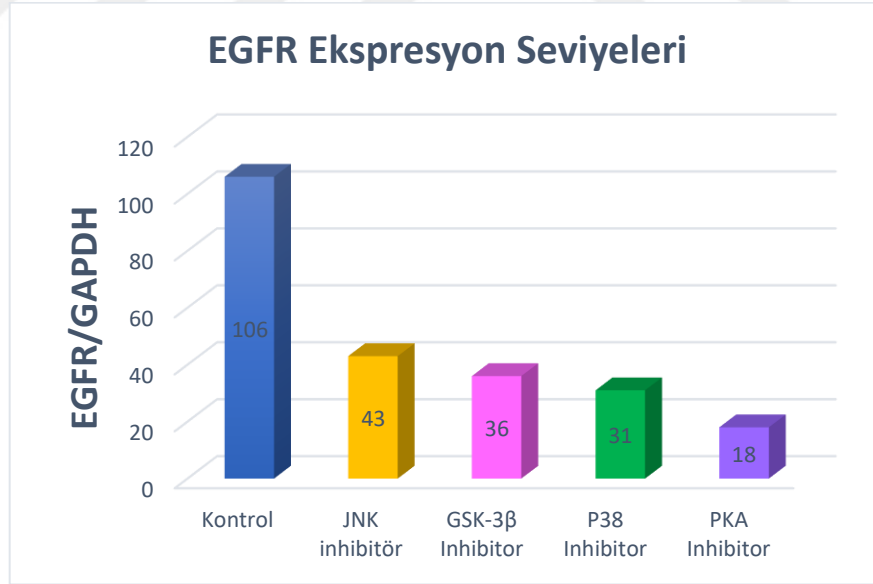


Şekil 4.2. H1299 hücre hattında EGF muamelesi sonrası 0. dk, 5. dk, 15. dk, 30. dk, 45. dk ve 60. dk'da elde edilen EGFR ekspresyon seviyelerini gösteren grafik.

4.3. H1299 Hücre Hattının Spesifik Kinaz İnhibitörleri ile Muamelesi Sonrası EGFR Ekspresyonu

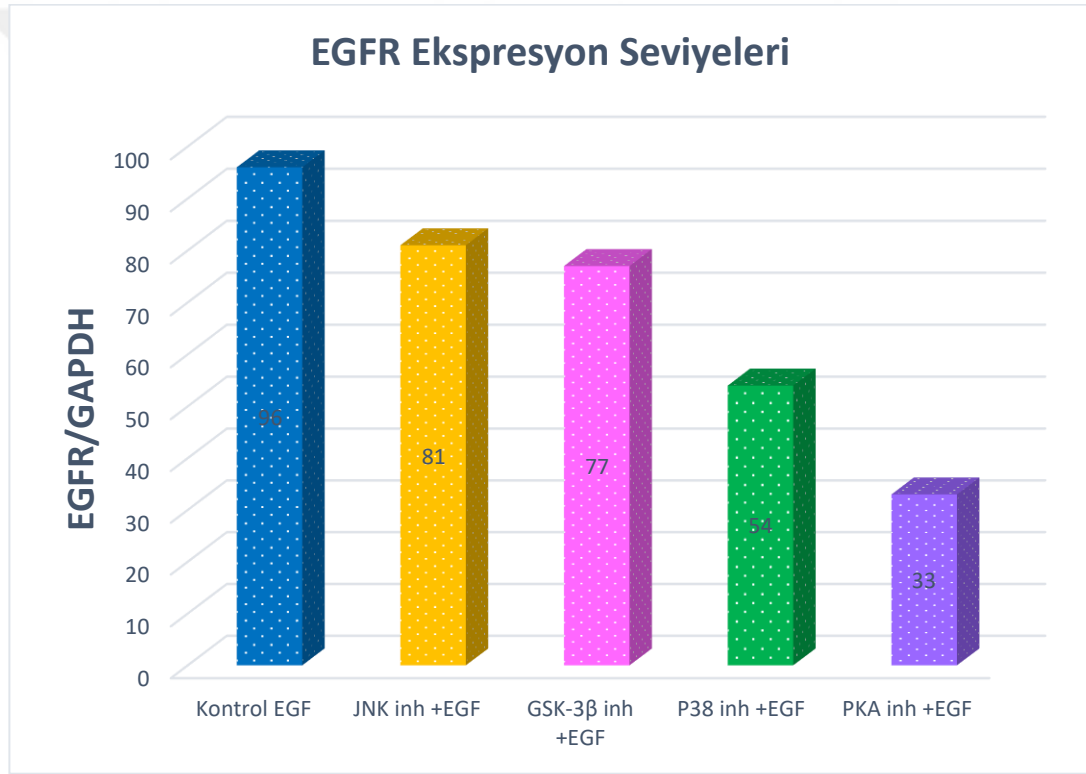
Çalışmamızda EGFR'nin ekspresyonunda etkili olabilecek spesifik kinazlardan p38, JNK, PKA ve GSK-3 β 'nin fonksiyonları dolaylı olarak, p38 inhibitörü, JNK inhibitörü, PKA inhibitörü ve GSK-3 β inhibitörü kullanılarak değerlendirilmiştir. H1299 hücre hattından aynı sayıda hücre içerecek şekilde çoğaltılan hücrelere inhibitör muamelesi sonrası elde edilen hücre lizatları EGFR ekspresyonu açısından değerlendirilmiş ve inhibitör grupları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Kontrol grubunda elde edilen EGFR ekspresyon seviyesi p38 inhibitörü, JNK inhibitörü, PKA inhibitörü ve GSK-3 β inhibitörü uygulanmış gruplarda elde edilen EGFR ekspresyon seviyelerinden fazladır ($p < 0.001$) (Şekil 4.3). En düşük ekspresyon seviyesi PKA inhibitörü muamelesi sonrası elde edilmiştir.



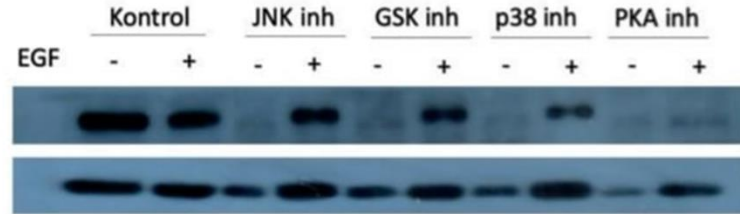
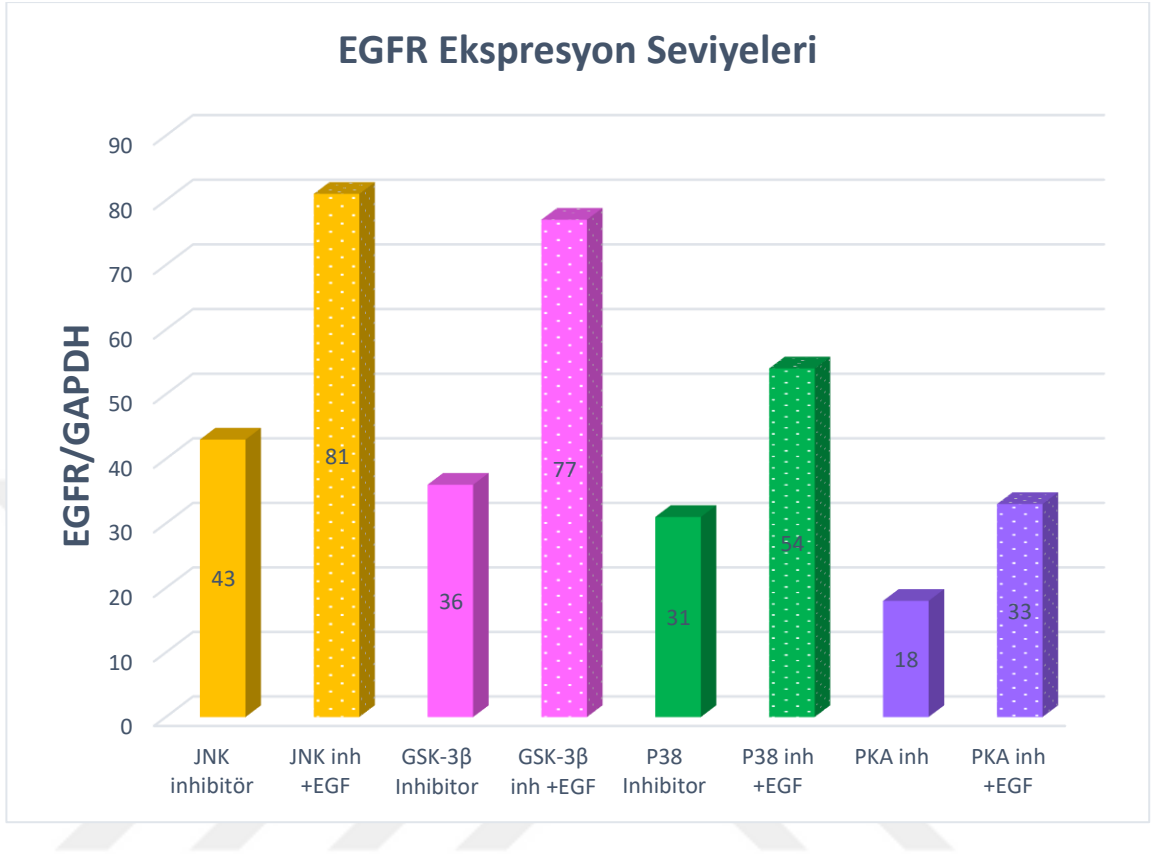
Şekil 4.3. H1299 hücre hattında, JNK inhibitörü, GSK-3 β inhibitörü p38 inhibitörü ve PKA inhibitörü ve muamelesi sonrası elde edilen ve kontrol grubunda izlenen EGFR ekspresyon seviyeleri.

Çalışma gruplarına p38 inhibitörü, JNK inhibitörü, PKA inhibitörü ve GSK-3 β inhibitörü uygulanmasını takiben EGFR'nin en önemli ligandı olan EGF ile grupların muamelesi yapılmış ve 5 dakika sonra EGFR ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; EGF muamelesi sonrası en düşük EGFR ekspresyon seviyesi yine PKA inhibitörü uygulanmış grupta elde edilirken, JNK inhibitörü, GSK-3 β inhibitörü ve p38 inhibitörü uygulanan gruplarda EGFR ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma izlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. H1299 hücre hattında JNK inhibitörü, GSK-3 β inhibitörü, p38 inhibitörü, PKA inhibitörü uygulamasını takiben EGF muamelesi sonrası elde edilen EGFR ekspresyon seviyelerinin GAPDH ile kıyaslanmasını gösteren grafik.

p38 inhibitörü, JNK inhibitörü, PKA inhibitörü ve GSK-3 β inhibitörü uygulanan gruplarda, EGF stimülasyonu yapılan aynı inhibisyonun uygulandığı gruplara kıyasla EGFR ekspresyonunun daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. H1299 hücre hattında p38 inhibitörü, JNK inhibitörü, PKA inhibitörü ve GSK-3 β inhibitörü uygulanan gruplarla, EGF stimülasyonu yapılan aynı inhibisyonun uygulandığı grupların karşılaştırıldığı, EGFR ekspresyon seviyelerinin GAPDH ile kıyaslanmasını gösteren grafik ve Western blot sonuçları.

5. TARTIŞMA

EGFR, proliferasyon, hayatta kalma, hücre göçü ve hücre farklılaşması gibi çok çeşitli süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. EGF gibi bir büyüme faktörünün reseptöre bağlanması, hücrenin ortamdaki değişikliklere yanıt vermesini sağlayan çok sayıda sinyal yolağını etkinleştirir. EGFR'nin en iyi tanımlanmış bu fonksiyonları, "kanonikal" EGFR sinyal yolağı olarak bilinen, liganda ve kinaza bağlı aktivasyon ile ortaya çıkan etkileridir (Lemmon ve Schlessinger, 2010). Otofaji ve metabolizmanın düzenlenmesi gibi EGFR'nin beklenmedik fonksiyonları hem kinaza bağımlı hem de kinazdan bağımsız "nonkanonikal" fonksiyonlar olup, inflamatuvar sitokinler, ultraviyole ve DNA hasarı oluşturan ajanlar gibi çok çeşitli hücrel ve çevresel stresler tarafından indüklenmektedir. Bu stres yolaklarının birçoğu kanser hücrelerine hayatta kalma avantajı sağlamakta ve tedaviye direnç gelişiminde aktive edilmektedir (Tan ve ark., 2016). Hücrelerin bu uyaranlara maruz kalması durumunda tirozin kinaz aktivitesinden bağımsız, EGFR'nin klatrin aracılı endositozu indüklenmektedir. Son zamanlarda otofajinin başlamasına ve tümör nekrozis faktör- α ile indüklenen apoptozun önlenmesine de EGFR'nin nonkanonikal fonksiyonlarının katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Nishimura ve ark., 2009; Tan ve ark., 2015; Tan ve ark., 2016). EGFR hedefli tedavide kullanılan moleküllerin yarattığı hücrel stres koşullarında indüklenen nonkanonikal fonksiyonlarının anlaşılması ve genel bağlamda EGFR biyolojisinin daha detaylı çalışılması yeni tümör tedavilerinin geliştirilmesi bakımından önemlidir. Tüm bu bilgiler ışığında, EGFR ve stres yolaklarının eşzamanlı olarak hedeflenmesinin kanser tedavisine farklı bir yön verebileceği fikri ortaya çıkmıştır. Özellikle EGFR'nin nonkanonikal fonksiyonları ve stres yolakları içinde rol alan bazı spesifik kinazlar EGFR ekspresyon seviyesi üzerine etkileri açısından çalışmamızda araştırılmıştır.

Ligand aracılı olarak EGFR'nin aktivasyonu sonucunda intrasellüler domaininde yer alan tirozin rezidülerinin fosforilasyonu çeşitli moleküllerin reseptöre yerleşebilmeleri için bağlanma bölgeleri oluşturmaktadır. Bu bağlanma bölgeleri sinyal ağının oluşmasından, aynı zamanda reseptörden kaynaklanan sinyalin sona ermesi için reseptörün endositozu ve degradasyonundan da sorumludur. Kinaz domaininde yer alan

tirozinlerin otofosforilasyonu sonucu reseptöre doğru çekilen spesifik adaptörler aracılığıyla aktivasyon kazanan protein kinazlar arasında ERK (Frey ve ark., 2004) ve diğer MAP kinazlardan JNK (Davis, 2000) ve p38 de yer alır (Zarubin ve Han, 2005). Reseptör aktivitesinin sonlanması için aktive EGFR'nin serin/ treonin rezidüleri yine bu MAPK'lar tarafından hedeflenmektedir.

Reseptör aktivitesinin susturulmasındaki EGFR'nin internalizasyon ve degradasyon sürecinde EGFR'nin ubikitinasyonu da önemlidir. EGFR'nin ubikitinasyon yolları Huang ve ark. tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmada EGFR'nin monoubikitinasyonu ve poliubikitinasyonu araştırılmış, monoubikitinasyonun internalizasyonu, poliubikitinasyonun ise degradasyonu etkilediği sonucuna varılmıştır (Huang ve ark., 2006). EGFR'nin ubikitinasyonu bir ubiquitin ligaz olan Cbl (Casitas B-lineage Lenfoma) tarafından düzenlenmektedir. Cbl'nin aktivasyonu ise EGFR aktivasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Yani EGFR sinyalinin başlaması aynı zamanda negatif geribesleme ile kendi kendini susturma yolunu da tetiklemektedir. EGFR'nin aktivasyonu ile Cbl plazma membranındaki aktif reseptöre çekilir (Mosesson ve ark., 2003). EGF ile stimüle edilen EGFR'nin Cbl'yi aktive ettiği, Cbl'nin EGFR'yi ubikitinasyona uğrattığı ve bu ubikitinasyon için p38'in de gerekli olduğu Frey ve ark.'nın çalışmasında gösterilmiştir. Bu çalışmada p38 aktivitesi susturulmuş ve bunun sonucunda EGFR aracılı Cbl aktivasyonunun olmadığı, dolayısıyla EGFR ubikitinasyonunun gerçekleşmediği gösterilmiştir (Frey ve ark., 2006).

Cbl'nin EGFR ubikitinasyonu yanısıra internalizasyonuna da etkisi vardır. Soubeyran ve ark.'nın çalışmasında EGFR endositozu için reseptör ubikitinasyonunun yeterli olmadığı bulunmuş ve Cbl'nin endositik mekanizmalar ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Cbl'nin CIN85 / endofilin kompleksi ile etkileşime girerek EGFR'yi klatrin kaplı çukurlara bağladığı, dolayısıyla Cbl'nin EGFR internalizasyonu üzerine etkisi bildirilmiştir (Soubeyran ve ark., 2002). Bu veriler doğrultusunda, p38 aktivasyonunun Cbl aktivasyonu üzerine olan etkisi göz önüne alındığında p38'in inhibisyonu durumunda EGFR'nin hem ubikitinasyonunun hem de internalizasyonunun olumsuz yönde etkilenmesi beklenebilir. Ancak Frey ve ark.'nın çalışmasında p38

inhibisyonu yapılarak EGFR'nin internalizasyonu üzerine etkisi de değerlendirilmiş ve p38 aktivitesinin ligandla bağlı EGFR internalizasyonunu etkilemediği gösterilmiştir (Frey ve ark., 2006).

EGFR'nin internalizasyonuna p38 etkisini araştıran bir diğer çalışma Vergarajauregui ve ark.'na aittir. Bu çalışmada önce p38 aktivitesini artıran anizomisin muamelesi ile p38 aktivitesi artırılmış ve EGFR internalizasyonu değerlendirilmiştir. Anizomisin ile EGFR internalizasyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu artışın reseptörün tirozin kinaz aktivitesinden ve ubiquitinasyondan bağımsız olduğu bulunmuştur. Sonra hem p38 α hem de p38 β için seçici bir inhibitör olan SB203580 kullanılmış ve anizomisin ile indüklenen EGFR internalizasyonunun SB203580 muamelesi ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Sonuç olarak p38 α ve p38 β izoformlarının EGFR internalizasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları belirtilmiştir. Aynı çalışmada, EGFR'nin UV ile indüklenen internalizasyonunda p38'in rol oynadığı da gösterilmiş ve EGFR endositozunun p38 tarafından düzenlenmesinin fizyolojik koşullar altında da gerçekleşebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Vergarajauregui ve ark., 2006).

Bu çalışmalara göre EGFR'nin internalizasyonu üzerine p38'in etkisi açısından kesin bir sonuca varmak mümkün değildir. Bizim çalışmamızda p38'in EGFR ekspresyonu üzerine etkisi değerlendirilmiş ve p38 aktivitesinin inhibitör aracılı susturulması ile hem EGF ile stimüle hem de EGF stimülasyonu yapılmayan grupta EGFR protein düzeyinde düşüş saptanmıştır. Mevcut çalışma dizaynımız EGFR'nin internalizasyonunu değerlendirmemekle birlikte p38'in EGFR internalizasyonu dolayısıyla sonrasında gerçekleşen EGFR degradasyonunu etkilemesi bakımından bu veriler çalışma sonucumuzla ilişkilendirilmiştir. P38 inhibisyonunun net etkisi bizim çalışmamızda EGFR ekspresyonunun azalması şeklindedir. Bu durum destrüksiyonun artmasından dolayısıyla bu mekanizmanın en üstünde yer alan EGFR internalizasyonu ile ilişkili olabilir. EGFR internalizasyonun tam olarak aydınlatılması bizim bulgumuzu destekleyebilir. Bu çelişkili konunun daha kapsamlı başka çalışmalarla araştırılması gereklidir.

EGFR'nin degradasyonu üzerine etkili moleküllerin tespiti ve bunların p38 ile ilişkisinin belirlenmesi çalışmamızın verilerini açıklayabilir. Bu bağlamda EGFR'nin degradasyona uğrayacağı endozomlar üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları önem arz etmektedir. Endozomlara ulaşan liganda bağlı EGFR'nin halen işlevsel olduğu ve MEK, ERK gibi bazı kinazların EGFR sinyalinin devamlılığı için çeşitli intrasellüler kompartmanlara özellikle endozomlara yöneldikleri bilinmektedir. Haugh ve Meyer'in çalışmasında endozomlardaki EGFR'nin fosfolipaz C dışında diğer EGFR hedeflerini güçlü bir şekilde aktive edebildiği gösterilmiştir (Haugh ve Meyer, 2002). Dolayısıyla degradasyon üzerine p38'in etkisi yanı sıra p38 etkisi sonucunda diğer EGFR hedeflerinin net sonucu da EGFR ekspresyonunu değiştirebilecektir. Frey ve ark.'nın çalışmasında EGFR degradasyonuna p38'in etkisi çalışılmıştır. İnhibitör ile p38'in susturulması durumunda internalizasyona uğrayan EGFR moleküllerinin asidik lizozomlara geçemeyip hücre içi geri dönüşüm keseciklerinde biriktiği, degradasyona uğramadığı bildirilmiştir (Frey ve ark., 2006). Bu durumda EGFR ekspresyonunun yani hücre içi protein seviyesinin artması beklenir. Ancak halen aktif olan EGFR'nin endozomlara trafiği boyunca ve endozomlar içinde birikmesi sonucunda diğer EGFR hedeflerini aktive ettiği göz önüne alınırsa net etkinin bizim çalışmamızda bulduğumuz gibi EGFR ekspresyon seviyesinde azalışa neden olması muhtemeldir. Ancak çalışmamızın kısıtlılığı nedeniyle bu çıkarımı yapmak ya da dışlamak mümkün değildir. EGFR sinyal yolağı tarafından kontrol edilen diğer kinazların ve EGFR'nin p38 dışı negatif geribesleme mekanizmalarına bağlı olarak destrüksiyonunun artması olasılığının değerlendirilebileceği, daha ayrıntılı yolak haritalarının ve bu yolaklarda yer alan moleküllerin karşılıklı etkileşimlerinin çalışılacağı araştırmalara ihtiyaç vardır.

P38'in EGFR üzerine etkisinin olabileceği bir diğer nokta EGFR'nin fosforilasyonu ve bunun EGFR trafiği üzerine olan etkisidir. EGFR'nin intrasellüler domaininde 30'dan fazla serin/ treonin fosforilasyon bölgesi olduğu fosfoproteomik analizlerle tanımlanmıştır (Hornbeck ve ark., 2012). Jukstamembran domaininde yer alan T-669'un ERK (Sato ve ark., 2013) ve p38α tarafından fosforile edildiği, böylece EGFR'nin tirozin kinaz aktivitesinin negatif geribeslemesinde etkili oldukları gösterilmiştir (Chen ve ark., 2000). EGFR üzerinde p38'e bağımlı fosforilasyona uğrayan başka rezidüer de

tanımlanmıştır. EGFR'nin S-1046 ve S-1047 rezidülerinin p38 aktivasyonu yoluyla fosforile oldukları ve bunun sonucunda EGFR downregülasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir (Adachi ve ark., 2009). Yine EGFR'nin S-1015 rezidüsünün p38 ile fosforile edildiği ve S-1015'in yabanıl tip EGFR'nin nonkanonik endositozu için gerekli olduğu da bildirilmiştir (Tanaka ve ark., 2018). Sonuç olarak genel kanı p38 aktivitesinin EGFR sinyalinin durdurulması için EGFR'yi degradasyona yönlendirmesi şeklinde etkili olduğu yönündedir. Ancak Sun ve ark.'nın çalışmasında *in vitro* olarak, S-1046 ve S-1047 rezidülerinin fosforilasyonu sonucunda Cbl'nin EGFR'ye bağlanma afinitesinin azaldığı, dolayısıyla bu fosforilasyonların EGFR ubiquitinasyonu üzerine negatif etkisinin olabileceği gösterilmiştir (Sun ve ark., 2010). Halen EGFR trafiğine yönelik bunun gibi aydınlatılamamış noktalar bulunmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda p38 inhibisyonu ile EGFR ekspresyon seviyesinde gözlemlediğimiz azalma, farklı dizaynda yapılacak ve ayrıca p38'in EGFR fosforilasyonu üzerine etkilerinin de gösterileceği yeni çalışmalara olan ihtiyacı göstermektedir.

Liganda bağlanmış EGFR'de meydana gelen dimerizasyon sonucunda tirozin fosforilasyonuna bağlı endositoz yani kanonik endositoz başlamaktadır. Aktif EGFR aynı zamanda p38'i de aktive ederek monomerik EGFR'nin serin / treonin fosforilasyonu ile ve klatrin bağımlı yolakla endositozunu başlatmakta, yani nonkanonik yolak sonucunda monomerik EGFR trafiği düzenlenmektedir. Bu nedenle EGFR'nin aktivasyonu ile kanonik ve nonkanonik endositoz yolları iç içe girmiş paralel olaylar şeklinde EGFR trafiğini düzenlemektedir. Liganda bağlı olan reseptörler degradasyona yönlendirken ligandla bağlı olmayan reseptörler hücre içi geri dönüşüme girmektedir (hücre membranından endozomlara- endozomlardan hücre membranına hareket). Çalışmamızda EGF ile stimüle ettiğimiz p38 inhibitörü uygulanan grupta EGF stimülasyonu olmadan p38 inhibisyonu yapılan gruba kıyasla daha yüksek EGFR protein oranı saptanmıştır. Bu durum p38 aktivasyonu ile giden liganda bağlı EGFR degradasyonunun p38 inhibisyonu nedeniyle azalmasına bağlanabilir. Ancak mevcut bulgularımızla kesin olarak bu sonuca varmak mümkün değildir. EGFR'nin endositozu üzerine etkili molekül ve mekanizmaları açıklayacak daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

EGF ile stimüle edilen inhibitör gruplarında EGF stimölasyonu yapılmayan inhibitör gruplarına kıyasla daha yüksek EGFR protein oranı saptanmasının bir nedeni de Clayton ve ark.'nın çalışması ile açıklanabilir. Serum kısıtlaması yapılan hücrelerde, EGFR önceden oluşmuş (preformed), kolesterole bağımlı, aktin bağımsız nanokümelerde (nanoclusters) bulunmaktadır. EGF ile stimölasyonun ardından, EGFR nanokümelerinin sayısı ve boyutu zamana bağılı bir şekilde artar. Clayton ve ark.'nın çalışmasında görüntü korelasyon spektroskopisi ölçümleri ile ligand yokluğunda küme başına ortalama 2.2 EGFR olduğunu gösterilirken, ligand uyarımı sonrası küme başına 3.7 EGFR olduğu tespit edilmiştir (Clayton ve ark., 2005). Bu durum bizim çalışmamızda EGF stimölasyonu sonrası elde edilen daha yüksek EGFR ekspresyon seviyesini açıklar niteliktedir. Ayrıca çalışmamızda kullandığımız hücre hattında EGF stimölasyonu sonrası en yüksek EGFR ekspresyon seviyesini 5.dakikada tespit etmiştik. Henriksen ve ark.'nın çalışmasında EGF stimölasyonu sonrası EGFR seviyelerinde zaman içinde farklılık izlendiği gösterilmiştir. EGF muamesesi sonrası 5. dakikadan sonra EGFR'nin klatriin bağımlı internalizasyonunun ve geridönüşüm sürecinin başladığı ve reseptör seviyesinde zaman içinde azalma meydana geldiği bildirilmiş olup bu veriler çalışmamızın sonuçları ile benzerdir (Henriksen ve ark., 2013).

MAPK ailesi içinde ERK yolağı dışında yer alan protein kinazlar ve EGFR etkileşimine bakıldığında literatürde az sayıda çalışma yer almaktadır. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz p38 ve JNK ile EGFR etkileşimi tümör dışı bir dokuda, duktus arteriozusun oksijenle indüklenen kontraksiyonu üzerinde Hong ve ark. tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada EGFR inhibitörü kullanılmış ve EGFR inhibisyonu sonrası p38 ve JNK'nin oksijenle indüklenen fosforilasyonlarının tamamen inhibe olduğu gösterilmiştir. Buna karşın O₂ kaynaklı EGFR transaktivasyonu sonucunda p38 / JNK aracılı sitozolik kalsiyum artışı tespit edilmiş ve bu kalsiyum artışının arter kontraksiyonuna katkı sağladığı bulunmuştur (Hong ve ark., 2014).

EGFR ve JNK'nin etkileşimlerinin değerlendirildiği araştırmalar literatürde tarandığında, yakın zamanda yayınlanan ve serviks kanser hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiş bir çalışma dikkat çekicidir. Morgan ve ark.'nın çalışmasında EGFR ve JNK arasında karşılıklı etkileşim olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada serviks

kanser hücrelerinde JNK / c-Jun'un EGFR sinyali üzerine düzenleyici rolü araştırılmış olup JNK ile upregüle edilen faktörler arasında hem EGFR'nin hem de EGFR ligandları olan EGF ve HB-EGF'nin olduğu gösterilmiştir. JNK sinyalinin engellendiği durumda EGF, HBEGF ve EGFR'nin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. EGFR kaynaklı sinyaller ise JNK'yı aktive etmekte ve EGFR yolağının etkisini güçlendirmektedir. Bu sinyal döngüsünün varlığının gösterilebildiği tümör tipleri için iki yönlü pozitif geribesleme ile çalışan EGFR-JNK sinyal döngüsü potansiyel bir hedef oluşturmaktadır (Morgan ve ark., 2020).

JNK'nın KHDAK hücrelerinde tümörün başlamasında rol oynadığı gösterilmiştir (Okada ve ark., 2013). JNK / c-JUN aksının KHDAK hücrelerinde invazyon ve metastaz yeteneğini artırdığı da bildirilmiştir (Ochieng ve ark., 2020). Bu nedenle JNK akciğer kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kabul edilebilir.

Bizim çalışmamızda KHDAK hücre hattında JNK inhibitör muamelesi sonrası EGFR ekspresyonu değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında JNK inhibitörü uygulanan hem EGF ile muamele edilen hem de edilmeyen hücre hatlarında EGFR ekspresyonunun daha düşük olduğu saptanmıştır. Daha önce JNK-EGFR etkileşimi üzerine yapılan çalışmaların sonuçları ve JNK'nın EGFR ligandları üzerine olan etkisi değerlendirildiğinde, çalışmamızda elde ettiğimiz JNK inhibisyonu sonrası gerek EGF ile muamele edilen gerekse de sadece JNK inhibisyonu yapılan grupta izlediğimiz düşük EGFR ekspresyon seviyesi literatürle uyumludur. JNK sinyalinin engellendiği durumda EGF ekspresyonunun da azalması nedeniyle EGF stimülasyonu yapılan grupta yapılmayana kıyasla daha yüksek EGFR ekspresyon seviyesinin saptanması yine literatürdeki bulguları desteklemektedir (Morgan ve ark., 2020).

EGFR ekspresyonuna etkili olabilecek diğer bir spesifik kinaz cAMP'nin hücresel etkilerinin çoğuna aracılık eden PKA'dır. PKA'nın mitojenik sinyallerin transdüksiyonunda rol oynadığı ve PKA ile aktive EGFR arasında karşılıklı etkileşim olduğu gösterilmiştir (Tortora ve Ciardiello, 2002).

Bir dimerle birbirine bağlanmış iki düzenleyici (R) subüniteden ve her bir R-subünitesine bağlı bir katalitik (C) subüniteden oluşan PKA'nın, EGFR konumu ve seviyesi üzerine etkisi Oksvold ve ark.'nın çalışmasında araştırılmıştır. Bu çalışmada PKA C-subünitesinde 'null' olan mutasyona uğramış fareler kullanılmıştır. EGFR seviyesinin ve lokalizasyonunun, PKA C-subünitesinin seviyesi ve aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. PKA C-subünitesinde susturulduğunda EGFR protein ekspresyon seviyesinde düşüş saptanmıştır. Düşük EGFR seviyelerinin azalmış mRNA ekspresyonuna bağlı olmadığı ve EGFR'deki azalmadan posttranskripsiyonel seviyedeki EGFR modülasyonunun sorumlu olduğu gösterilmiştir (Oksvold ve ark., 2008).

Salazar ve ark. çalışmasında ise PKA bazal aktivitesinin EGFR fonksiyonunu iki seviyede kontrol ettiği gösterilmiştir. Bu kontrollerden ilki, hücre yüzeyinde inaktif EGFR'nin kalma süresini etkileyen dolayısıyla uyarıların reseptöre erişebilirliğini modüle eden, "endositik kaçınma-evasion" olarak isimlendirilen süreç üzerinden meydana gelmektedir. Çalışmada PKA aktivitesi inhibitör kullanılarak durdurulmuş ve bu inhibisyon sonucunda ligandla bağlı olmayan inaktif EGFR'nin erken endositik kompartmanlara selektif dağılımı gerçekleşmiştir. Yani PKA'nın aktif çalıştığı şartlarda inaktif EGFR ligandla bağlanana kadar korunmakta ve endozomlara yönlendirilmemektedir. Ayrıca PKA inhibisyonu oluşturulduğunda ligand ile indüklenen EGFR'nin endositozunda artış, dolayısıyla EGFR protein seviyesinde azalma meydana gelmektedir. Diğer kontrol noktası ise ligand ile aktive EGFR'nin hücre içi sinyal oluşturma süresini belirleyen downregülasyon yolağına etkisidir. PKA inhibisyonu durumunda aktif EGFR'nin dejeneratif kompartmanlara dağılımı yavaşlamakta ve hücre içi aktivitesi artmaktadır (Salazar ve Gonzalez, 2002).

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde PKA aktivasyonunun spesifik inhibitör kullanılarak engellenmesi sonucunda hem EGF ile muamele edilen hem de EGF uyarısı yapılmamış hücre hatlarında EGFR ekspresyonunda belirgin azalma saptanmıştır. Bu durum hücre membranında uyarılmamış EGFR moleküllerinin internalizasyonunun ve degradasyonunun artması ile açıklanabilir. Ayrıca PKA inhibisyonu oluşturulduğunda ligand ile indüklenen EGFR'nin endozomlara dağılımındaki yavaşlama bizim

çalışmamızda elde ettiğimiz EGF stimülasyonu yapılan PKA inhibitör grubunda EGF muamelesi yapılmayan PKA inhibisyon grubuna göre elde edilen daha yüksek EGFR ekspresyon seviyesini açıklayabilir.

PKA aktivitesinin EGFR seviyelerinin korunmasına katkıda bulunması (Oksvold ve ark., 2008) ve EGFR'nin PKA aktivitesini regüle etmesi (Fishman ve ark., 1997) bu yollar arasındaki çapraz etkileşimi göstermektedir. Tümör tedavisinde her iki yolağın birlikte hedeflenmesi, bu yollar arasındaki pozitif geribeslemenin durdurulması açısından tedaviye katkı sağlayabilir.

Genellikle kanserle ilişkilendirilen en önemli yollardan biri EGFR / RAS / PI3K / PTEN / AKT / GSK3 / mTORC1 yolağı olup bu yolak EGFR ve GSK3 β bağlamında çalışmamız kapsamında değerlendirilmiştir. GSK3 β bir serin / treonin protein kinaz olup, GSK-3'ün fonksiyonel olarak farklı işlevlere sahip iki izoformundan biridir. GSK-3 çeşitli hücre içi biyokimyasal yolların kavşağında bulunmaktadır. Hücre fonksiyonları açısından farklı rollere sahip olabilmesinin nedeni muhtemelen 100'den fazla substratının olmasından kaynaklanmaktadır (Duda ve ark., 2020).

GSK-3 β 'nın kinaz aktivasyonu için Y216 fosforilasyonu gerekiyken, S9 fosforilasyonu ile kinaz aktivitesi inhibe edilmektedir (Patel ve Woodgett, 2017). Aktif EGFR pek çok aracı molekülün aktivasyonu yoluyla GSK3 β 'nın S9 fosforilasyonuna neden olmakta ve GSK3 β proteazomal degradasyona uğramaktadır. Yine EGFR aracılığıyla aktive olan MAPK, ERK1 / 2 gibi diğer kinazlar da GSK-3 β 'yı S9 fosforilasyonu üzerinden inaktive edebilmektedir. GSK-3 β 'nın Pyk2 gibi kinazlar aracılığıyla Y216'dan fosforilasyonu ise aktivitesini beş kat artırmaktadır (Sayas ve ark., 2006). Bu tirozin rezidüsü üzerine EGFR'nin etkinliğini gösteren bir bilgi bulunmamaktadır. GSK-3 β 'ya bağlı net etkinin ne olacağına aynı tümör tipinde bile karar vermek zordur. Çünkü aynı tümör tipinde yapılmış çalışmalarda GSK-3 β 'nın bazen tümör destekleyici, bazen de tümör baskılayıcı role sahip olabildiği gösterilmiştir (Domoto ve ark., 2020; Duda ve ark., 2020). EGFR'nin GSK-3 β üzerine bu yoğunlukta etkisi varken yolağın tersi olarak GSK-3 β 'nın EGFR'ye etkisine baktığımızda literatürde yalnızca bir çalışma bulunabilmektedir.

Camlar ve ark. çalışmasında glioblastoma multiforme GSK-3'ün apoptotik ve moleküler etkileri araştırılmıştır. Glioblastoma multiforme hücre hatlarında GSK-3 inhibitörü uygulaması ile hücresel proliferasyonun inhibe olduğu, EGFR ve NF- κ B ekspresyonunun azaldığı bulunmuş ve bu modülasyona bağlı olarak apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (Camlar ve ark., 2019). Bizim çalışmamızda da KHDAK hücre hattında GSK3 β 'nın EGFR ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmış ve GSK3 β inhibitörü ile muamele edilmiş hücre hatlarında EGFR ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla azalma saptanmıştır. Bu bulgumuz Camlar ve ark.'nın çalışma verileriyle uyumludur. Ancak sadece ekspresyon seviyelerinin değerlendirildiği bu iki çalışma GSK3 β ile EGFR arasındaki ilişkiyi belirlemek için yeterli görülmemektedir.

Wang ve ark.'nın çalışmasında PKA'nın GSK3 β üzerine etkinliği gösterilmiştir. İnhibe edilmiş PKA aktivitesinin GSK3 aktivitesini artırarak β -katenin degradasyonuna yol açtığı, böylece β -katenin degradasyonu üzerinden üçlü negatif meme kanserinde tümör büyümesini ve metastazı baskıladığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2019). Bu nedenle sinyal yollarının birbiri üzerine olan etkilerini daha kompleks ağ içinde değerlendirmek ve çoklu değişkenlerle çalışmak gereklidir.

Spesifik kinaz inhibitörlerinin kullanıldığı durumlarda gerek çalışmalar gerekse tedavi aşamasında dikkat edilmesi gereken önemli bir konu da hedef dışı (off-target) inhibisyonudur. Hali hazırda bilinen 518 adet protein kinazın olması, bunların kendi içlerinde sekans benzerliklerinin bulunması, hatta bazı kinazların farklı etkili izoformlarının mevcut olması nedeniyle protein kinaz inhibitörlerinin hedef dışı inhibisyon etkileri mutlaka göz önüne alınmalıdır (Cicenas ve ark., 2017). Hedef dışı olasılıklar hakkında daha kapsamlı araştırmalara ve kinaz inhibitörlerinin diğer proteinlere karşı etkilerinin test edilmesine de ihtiyaç vardır. Bizim çalışmamızda kullandığımız kinaz inhibitörleri spesifik olarak tanımlanmış olmakla birlikte EGFR'nin ekspresyonu üzerine etkili farklı yollarda yer alan başka bir proteini etkilemiş olması hala muhtemel görünmektedir. Gelişmekte olan bilgisayar destekli, 3 boyutlu yapısal temelli yaklaşımlar, proteomiks veya benzeri ileri teknikler; yakın gelecekte yapılacak ileri çalışmalarda, daha özgül sonuçlar elde edilmesine yardımcı olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tümörlerin meydana gelme ve gelişim sürecinde rol alan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çalışmalar etkin tedavi ve klinik yaklaşımın belirlenmesi adına yoğun olarak devam etmektedir. Kanser tedavisinde tirozin kinaz inhibitörleri gibi spesifik moleküllerin diğer tedavilerle kombine edilmesi (kemoterapi, Radyoterapi, diğer Kinaz inhibitörleri) ile daha yüz güldürücü sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle özellikle hedeflenen molekülün downstream yolunda yer alan diğer moleküllerin inhibitörleriyle kombinasyonu başarılı klinik sonuçlar alınabilmesini sağlayabilir.

Pek çok kanser tipinde gerek aşırı ekspresyonu gerekse de pek çok farklı mutasyon ile artmış aktivitesi gösterilen EGFR özellikle araştırılmaya devam edilen ve geliştirilmeye açık konular arasındadır. Buradan hareketle en sık izlenen ve en ölümcül kanser tipi olan akciğer tümörü hücre hatlarında EGFR ekspresyonu ve EGFR ekspresyonu üzerine etkili olabilecek diğer hücre içi önemli kinazların etkisi dolaylı olarak, spesifik kinaz inhibitörleri kullanılarak araştırılmış ve P38, JNK, PKA ve GSK-3 β 'nın; EGFR ekspresyonu üzerinde etkili oldukları gösterilmiştir. Bu kinazların hepsi ayrı ayrı inhibe edildiğinde EGFR ekspresyon seviyelerinde azalma saptanmıştır. Dolayısıyla bu sonuçlar EGFR ekspresyonu üzerine P38, JNK, PKA ve GSK-3 β 'nın sinerjistik etkileri olabileceğini de düşündürmektedir. Ancak sadece ekspresyon seviyesine bakarak bu sonuca ulaşılmamalıdır.

Hücre içinde EGFR ekspresyon seviyeleri birkaç aşamada düzenlenmektedir. Bu düzenlenme süreci içerisinde EGFR geninin transkripsiyon seviyesi, mRNA işlenmesi, translasyon ve posttranslasyon aşamaları yanı sıra inaktif reseptörün ortadan kaldırılmasında veya oluşmuş sinyalin sonlandırılmasında görev alan EGFR hücre içi trafiği ve metabolizması bulunmaktadır. EGFR seviyesinin nasıl düzenlendiğini incelemek için tüm aşamaların ayrıca çalışılması ve bu kinazlar ile ilişkilerinin ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gereklidir. Bizim çalışmamızdaki bütçe sınırlılığı nedeniyle daha fazla deney gerçekleştirilememiş ve diğer süreçlerin araştırılacağı daha yüksek bütçeli ve kapsamlı çalışmalar hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

Adachi S, Natsume H, Yamauchi J, Matsushima-Nishiwaki R, Joe AK, Moriwaki H, Kozawa O. p38 MAP kinase controls EGF receptor downregulation via phosphorylation at Ser1046/1047. *Cancer Lett.* 2009;277: 108-113.

Agustoni F, Suda K, Yu H, Ren S, Rivard CJ, Ellison K, Caldwell C, Jr., Rozeboom L, Brovsky K, Hirsch FR. EGFR-directed monoclonal antibodies in combination with chemotherapy for treatment of non-small-cell lung cancer: an updated review of clinical trials and new perspectives in biomarkers analysis. *Cancer Treat Rev.* 2019;72: 15-27.

Barlow CA, Kitiphongspattana K, Siddiqui N, Roe MW, Mossman BT, Lounsbury KM. Protein kinase A-mediated CREB phosphorylation is an oxidant-induced survival pathway in alveolar type II cells. *Apoptosis.* 2008;13: 681-692.

Bhatia P, Sharma V, Alam O, Manaihiya A, Alam P, Kahksha, Alam MT, Imran M. Novel quinazoline-based EGFR kinase inhibitors: A review focussing on SAR and molecular docking studies (2015-2019). *Eur J Med Chem.* 2020;204: 112640.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 2003;12: 541-552.

Butti R, Das S, Gunasekaran VP, Yadav AS, Kumar D, Kundu GC. Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. *Mol Cancer.* 2018;17: 34.

Camlar M, Acikgoz E, Demir K, Uysal A, Ozer F, Selcuki M, Aktug H. Effects of Glycogen Synthase Kinase Inhibitor on Glioblastoma Multiforme Cell Line via Apoptosis and Cell Signaling Pathways. *Turk Neurosurg.* 2019;29: 513-521.

Caretta A, Mucignat-Caretta C. Protein kinase a in cancer. *Cancers (Basel).* 2011;3: 913-926.

Casaleto JB, McClatchey AI. Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012;12: 387-400.

Chattopadhyay A, Vecchi M, Ji Q, Mernaugh R, Carpenter G. The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor. *J Biol Chem.* 1999;274: 26091-26097.

Chen F. JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer Res.* 2012;72: 379-386.

Chen G, Hitomi M, Han J, Stacey DW. The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem.* 2000;275: 38973-38980.

Chen J, Chen JK, Nagai K, Plieth D, Tan M, Lee TC, Threadgill DW, Neilson EG, Harris RC. EGFR signaling promotes TGFbeta-dependent renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23: 215-224.

Cho EA, Kim EJ, Kwak SJ, Juhnn YS. cAMP signaling inhibits radiation-induced ATM phosphorylation leading to the augmentation of apoptosis in human lung cancer cells. *Mol Cancer.* 2014;13: 36.

Chung C. Tyrosine kinase inhibitors for epidermal growth factor receptor gene mutation-positive non-small cell lung cancers: an update for recent advances in therapeutics. *J Oncol Pharm Pract.* 2016;22: 461-476.

Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med.* 2008;358: 1160-1174.

Cicenas J, Zalyte E, Rimkus A, Dapkus D, Noreika R, Urbonavicius S. JNK, p38, ERK, and SGK1 Inhibitors in Cancer. *Cancers (Basel).* 2017;10

Clark AJ, Ishii S, Richert N, Merlino GT, Pastan I. Epidermal growth factor regulates the expression of its own receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82: 8374-8378.

Collin de L'hortet A, Gilgenkrantz H, Guidotti JE. EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration. *Int J Hepatol.* 2012;2012: 476910.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 2000;103: 239-252.

Domoto T, Uehara M, Bolidong D, Minamoto T. Glycogen Synthase Kinase 3beta in Cancer Biology and Treatment. *Cells.* 2020;9

Duda P, Akula SM, Abrams SL, Steelman LS, Martelli AM, Cocco L, Ratti S, Candido S, Libra M, Montalto G, Cervello M, Gizak A, Rakus D, McCubrey JA. Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer. *Cells.* 2020;9

Evangelopoulos ME, Weis J, Kruttgen A. Signalling pathways leading to neuroblastoma differentiation after serum withdrawal: HDL blocks neuroblastoma differentiation by inhibition of EGFR. *Oncogene.* 2005;24: 3309-3318.

Fishman D, Galitzki L, Priel E, Segal S. Epidermal growth factor regulates protein kinase A activity in murine fibrosarcoma cells: differences between metastatic and nonmetastatic tumor cell variants. *Cancer Res.* 1997;57: 5410-5415.

Frey MR, Dise RS, Edelblum KL, Polk DB. p38 kinase regulates epidermal growth factor receptor downregulation and cellular migration. *EMBO J.* 2006;25: 5683-5692.

Frey MR, Golovin A, Polk DB. Epidermal growth factor-stimulated intestinal epithelial cell migration requires Src family kinase-dependent p38 MAPK signaling. *J Biol Chem.* 2004;279: 44513-44521.

Girnius N, Edwards YJ, Garlick DS, Davis RJ. The cJUN NH₂-terminal kinase (JNK) signaling pathway promotes genome stability and prevents tumor initiation. *Elife*. 2018;7

Gkouveris I, Nikitakis NG. Role of JNK signaling in oral cancer: A mini review. *Tumour Biol*. 2017;39: 1010428317711659.

Gururaj A, Bogler O, Latha K (2011). Nuclear Signaling of EGFR and EGFRvIII in Glioblastoma.

Hadzisejdic I, Mustac E, Jonjic N, Petkovic M, Grahovac B. Nuclear EGFR in ductal invasive breast cancer: correlation with cyclin-D1 and prognosis. *Mod Pathol*. 2010;23: 392-403.

Hanna N, Johnson D, Temin S, Masters G. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update Summary. *J Oncol Pract*. 2017;13: 832-837.

Haugh JM, Meyer T. Active EGF receptors have limited access to PtdIns(4,5)P(2) in endosomes: implications for phospholipase C and PI 3-kinase signaling. *J Cell Sci*. 2002;115: 303-310.

Hong Z, Cabrera JA, Mahapatra S, Kutty S, Weir EK, Archer SL. Activation of the EGFR/p38/JNK pathway by mitochondrial-derived hydrogen peroxide contributes to oxygen-induced contraction of ductus arteriosus. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92: 995-1007.

Hornbeck PV, Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, Sullivan M. PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res*. 2012;40: D261-270.

Hsieh MY, Yang S, Raymond-Stinz MA, Edwards JS, Wilson BS. Spatio-temporal modeling of signaling protein recruitment to EGFR. *BMC Syst Biol*. 2010;4: 57.

Hsu PC, Yang CT, Jablons DM, You L. The Crosstalk between Src and Hippo/YAP Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Cancers (Basel)*. 2020;12

Hsu WH, Yang JC, Mok TS, Loong HH. Overview of current systemic management of EGFR-mutant NSCLC. *Ann Oncol*. 2018;29: i3-i9.

Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, Sorkin A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell*. 2006;21: 737-748.

Hubbard SR. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol*. 1999;71: 343-358.

Huse M, Kuriyan J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell*. 2002;109: 275-282.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5: 341-354.

Jang H-J, Yang YR, Cocco L, Ryu SH, Suh P-G (2018). Phosphoinositide-Specific Phospholipase C (PI-PLC). *Encyclopedia of Signaling Molecules*. S. Choi. Cham, Springer International Publishing: 3973-3988.

Ji QS, Winnier GE, Niswender KD, Horstman D, Wisdom R, Magnuson MA, Carpenter G. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94: 2999-3003.

Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, Lew M, Pantelas J, Ramalingam SS, Reck M, Saqi A, Simoff M, Singh N, Sundaram B. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36: 911-919.

Kondo I, Shimizu N. Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13 leads to q22 region of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet*. 1983;35: 9-14.

Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26: 1742-1751.

Kumar A, Singh UK, Kini SG, Garg V, Agrawal S, Tomar PK, Pathak P, Chaudhary A, Gupta P, Malik A. JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases. *Future Med Chem*. 2015;7: 2065-2086.

Lammerts van Bueren JJ, Bleeker WK, Brannstrom A, von Euler A, Jansson M, Peipp M, Schneider-Merck T, Valerius T, van de Winkel JG, Parren PW. The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105: 6109-6114.

Lee HH, Wang YN, Hung MC. Non-canonical signaling mode of the epidermal growth factor receptor family. *Am J Cancer Res*. 2015;5: 2944-2958.

Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Kim YJ, Kim JH, Kim SW, Ryu HS, Park IA, Im SA, Gong G, Jung KH, Kim HJ, Park SY. Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer*. 2015;112: 103-111.

Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141: 1117-1134.

Li H, Xiao N, Wang Y, Wang R, Chen Y, Pan W, Liu D, Li S, Sun J, Zhang K, Sun Y, Ge X. Smurf1 regulates lung cancer cell growth and migration through interaction with and ubiquitination of PIPK γ . *Oncogene*. 2017;36: 5668-5680.

Liao BC, Lee JH, Lin CC, Chen YF, Chang CH, Ho CC, Shih JY, Yu CJ, Yang JC. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors for Non-Small-Cell Lung Cancer Patients with Leptomeningeal Carcinomatosis. *J Thorac Oncol*. 2015;10: 1754-1761.

Macdonald-Obermann JL, Pike LJ. Allosteric regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor ligand binding by tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem*. 2018;293: 13401-13414.

Macdonald-Obermann JL, Pike LJ. Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation. *J Biol Chem*. 2014;289: 26178-26188.

Martin P, Kelly CM, Carney D. Epidermal growth factor receptor-targeted agents for lung cancer. *Cancer Control*. 2006;13: 129-140.

Martinez-Limon A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21

Mattoon DR, Lamothe B, Lax I, Schlessinger J. The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol*. 2004;2: 24.

Morgan EL, Scarth JA, Patterson MR, Wasson CW, Hemingway GC, Barba-Moreno D, Macdonald A. E6-mediated activation of JNK drives EGFR signalling to promote proliferation and viral oncoprotein expression in cervical cancer. *Cell Death Differ*. 2020

Mosesson Y, Shtiegman K, Katz M, Zwang Y, Vereb G, Szollosi J, Yarden Y. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem*. 2003;278: 21323-21326.

Nagini S, Sophia J, Mishra R. Glycogen synthase kinases: Moonlighting proteins with theranostic potential in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2019;56: 25-36.

Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37 Suppl 4: S9-15.

Nie W, Tang L, Zhang H, Shao J, Wang Y, Chen L, Li D, Guan X. Structural analysis of the EGFR TK domain and potential implications for EGFR targeted therapy. *Int J Oncol*. 2012;40: 1763-1769.

Nishimura M, Shin MS, Singhirunnusorn P, Suzuki S, Kawanishi M, Koizumi K, Saiki I, Sakurai H. TAK1-mediated serine/threonine phosphorylation of epidermal growth factor receptor via p38/extracellular signal-regulated kinase: NF- κ B-independent survival pathways in tumor necrosis factor alpha signaling. *Mol Cell Biol.* 2009;29: 5529-5539.

Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. Does Ras Activate Raf and PI3K Allosterically? *Front Oncol.* 2019;9: 1231.

Ochieng JK, Kundu ST, Bajaj R, Leticia Rodriguez B, Fradette JJ, Gibbons DL. MBIP (MAP3K12 binding inhibitory protein) drives NSCLC metastasis by JNK-dependent activation of MMPs. *Oncogene.* 2020;39: 6719-6732.

Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol.* 2005;1: 2005 0010.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell.* 2002;110: 775-787.

Okada M, Shibuya K, Sato A, Seino S, Watanabe E, Suzuki S, Seino M, Kitanaka C. Specific role of JNK in the maintenance of the tumor-initiating capacity of A549 human non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2013;30: 1957-1964.

Oksvold MP, Funderud A, Kvissel AK, Skarpen E, Henanger H, Huitfeldt HS, Skalhogg BS, Orstavik S. Epidermal growth factor receptor levels are reduced in mice with targeted disruption of the protein kinase A catalytic subunit. *BMC Cell Biol.* 2008;9: 16.

Otsuka T, Mori M, Yano Y, Uchida J, Nishino K, Kaji R, Hata A, Hattori Y, Urata Y, Kaneda T, Tachihara M, Imamura F, Katakami N, Negoro S, Morita S, Yokota S. Effectiveness of Tyrosine Kinase Inhibitors in Japanese Patients with Non-small Cell Lung Cancer Harboring Minor Epidermal Growth Factor Receptor Mutations: Results from a Multicenter Retrospective Study (HANSHIN Oncology Group 0212). *Anticancer Res.* 2015;35: 3885-3891.

Park HS, Jang MH, Kim EJ, Kim HJ, Lee HJ, Kim YJ, Kim JH, Kang E, Kim SW, Kim IA, Park SY. High EGFR gene copy number predicts poor outcome in triple-negative breast cancer. *Mod Pathol.* 2014;27: 1212-1222.

Patel P, Woodgett JR. Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways? *Curr Top Dev Biol.* 2017;123: 277-302.

Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell.* 2004;116: 191-203.

Pullamsetti SS, Banat GA, Schmall A, Szibor M, Pomagruk D, Hanze J, Kolosionek E, Wilhelm J, Braun T, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Savai R.

Phosphodiesterase-4 promotes proliferation and angiogenesis of lung cancer by crosstalk with HIF. *Oncogene*. 2013;32: 1121-1134.

Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*. 2014;79: 34-74.

Russo P, Catassi A, Cesario A, Servent D. Development of novel therapeutic strategies for lung cancer: targeting the cholinergic system. *Curr Med Chem*. 2006;13: 3493-3512.
Salazar G, Gonzalez A. Novel mechanism for regulation of epidermal growth factor receptor endocytosis revealed by protein kinase A inhibition. *Mol Biol Cell*. 2002;13: 1677-1693.

Sato K, Shin MS, Sakimura A, Zhou Y, Tanaka T, Kawanishi M, Kawasaki Y, Yokoyama S, Koizumi K, Saiki I, Sakurai H. Inverse correlation between Thr-669 and constitutive tyrosine phosphorylation in the asymmetric epidermal growth factor receptor dimer conformation. *Cancer Sci*. 2013;104: 1315-1322.

Sayas CL, Ariaens A, Ponsioen B, Moolenaar WH. GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction. *Mol Biol Cell*. 2006;17: 1834-1844.

Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2006;12: 5268-5272.

Schlessinger J. Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6

Shaikh D, Zhou Q, Chen T, Ibe JC, Raj JU, Zhou G. cAMP-dependent protein kinase is essential for hypoxia-mediated epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion in lung cancer cells. *Cell Signal*. 2012;24: 2396-2406.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7: 169-181.

Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*. 2018;12: 3-20.

Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Res*. 2016;5

Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*. 2002;416: 183-187.

Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem*. 2002;277: 46265-46272.

Sun Q, Jackson RA, Ng C, Guy GR, Sivaraman J. Additional serine/threonine phosphorylation reduces binding affinity but preserves interface topography of substrate proteins to the c-Cbl TKB domain. *PLoS One*. 2010;5: e12819.

Tamirat MZ, Koivu M, Elenius K, Johnson MS. Structural characterization of EGFR exon 19 deletion mutation using molecular dynamics simulation. *PLoS One*. 2019;14: e0222814.

Tan X, Lambert PF, Rapraeger AC, Anderson RA. Stress-Induced EGFR Trafficking: Mechanisms, Functions, and Therapeutic Implications. *Trends Cell Biol*. 2016;26: 352-366.

Tan X, Thapa N, Sun Y, Anderson RA. A kinase-independent role for EGF receptor in autophagy initiation. *Cell*. 2015;160: 145-160.

Tanaka T, Ozawa T, Oga E, Muraguchi A, Sakurai H. Cisplatin-induced non-canonical endocytosis of EGFR via p38 phosphorylation of the C-terminal region containing Ser-1015 in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Lett*. 2018;15: 9251-9256.

Tomas A, Futter CE, Eden ER. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol*. 2014;24: 26-34.

Tortora G, Ciardiello F. Protein kinase A as target for novel integrated strategies of cancer therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;968: 139-147.

Vergarajauregui S, San Miguel A, Puertollano R. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase promotes epidermal growth factor receptor internalization. *Traffic*. 2006;7: 686-698.

Vivanco I, Palaskas N, Tran C, Finn SP, Getz G, Kennedy NJ, Jiao J, Rose J, Xie W, Loda M, Golub T, Mellinghoff IK, Davis RJ, Wu H, Sawyers CL. Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*. 2007;11: 555-569.

Walton GM, Chen WS, Rosenfeld MG, Gill GN. Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and enhanced in vivo tyrosine phosphorylation of cell substrates. *J Biol Chem*. 1990;265: 1750-1754.

Wang HC, Yeh HH, Huang WL, Lin CC, Su WP, Chen HH, Lai WW, Su WC. Activation of the signal transducer and activator of transcription 3 pathway up-regulates estrogen receptor-beta expression in lung adenocarcinoma cells. *Mol Endocrinol*. 2011;25: 1145-1158.

Wang Z, Li Y, Xiao Y, Lin HP, Yang P, Humphries B, Gao T, Yang C. Integrin alpha9 depletion promotes beta-catenin degradation to suppress triple-negative breast cancer tumor growth and metastasis. *Int J Cancer*. 2019;145: 2767-2780.

Warnault P, Yasri A, Coisy-Quivy M, Cheve G, Bories C, Fauvel B, Benhida R. Recent advances in drug design of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Curr Med Chem*. 2013;20: 2043-2067.

Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2017;9

Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19: 142-149.

Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, Lemmon MA, Riese DJ, 2nd. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther*. 2009;122: 1-8.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2: 127-137.

Zanetti-Domingues LC, Bonner SE, Martin-Fernandez ML, Huber V. Mechanisms of Action of EGFR Tyrosine Kinase Receptor Incorporated in Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020;9

Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005;15: 11-18.

Zhang H, Kong Q, Wang J, Jiang Y, Hua H. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9: 32.

Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*. 2006;125: 1137-1149.

Zhu H, Acquaviva J, Ramachandran P, Boskovitz A, Woolfenden S, Pfannl R, Bronson RT, Chen JW, Weissleder R, Housman DE, Charest A. Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106: 2712-2716.

Zou X, Blank M. Targeting p38 MAP kinase signaling in cancer through post-translational modifications. *Cancer Lett*. 2017;384: 19-26.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İrem Hicran
Soyadı	Özbudak
Uyruğu	TC

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Gazi Lisesi	1994
Lisans/ Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	1994-2000
Doktora/Uzmanlık	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	2001-2005

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Dr.Arş.Gör.	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	2001-2005
Uzman	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	2005-2010
Fellow	Department of Pulmonary and Mediastinal Pathology, Armed Forces Institute of Pathology; Washington D.C., USA.	2006-2007
Yrd.Doç.	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	2010-2013
Doçent	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	2013-2018
Profesör	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	2018-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	83.75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Pulmoner Hipertansif Sıçanların Pulmoner Arterinde Fosfodiesteraz Enzim İnhibitörleri Sildenafil, Tadalafil ve	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje No: 2006.04.0103.006)	2006-2008

Vardenafil'in Etkileri		
Karbondiyoksit Pnömotorik Oluşturulan Ratlarda Renal Hormonal Aktivitenin ve Apoptozisin Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje No: 2007.01.0103.017)	2007-2009
Intratrakeal Lipopolisakkarit Uygulanan Ratlarda İmmünglobulin Tedavisinin Akciğerde Gelişen İnflamasyon Üzerine Etkileri	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje No: 2007.04.0103.014)	2007-2009
Yassı Hücreli Larinks Karsinomunda Trail Ligand Ve Reseptör Profilinin Tümör Evreleriyle İlişkilerinin Belirlenmesi	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje No: 2008.03.0121.001)	2008-2010
Endometrium Karsinomunda Ölümcül TRAIL Ligand ve Reseptör Ekspresyon Profilinin Tümör Evreleri ile İlişkilerinin Belirlenmesi	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje No: 2008.03.0122.003)	2008-2010
Akciğer kanseri hastalarında tedavinin yönlendirilmesi için tümör dokularında epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonuna neden olan mutasyonların tanımlanması ve sinyal iletim ağının belirlenmesi	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje No: 2009.01.0103.012)	2009-2011
PTEN ve Tbx3 Proteinlerinin Baş-boyun Kanserleri Oluşumundaki Rolleri ve Kullandıkları Moleküler Mekanizmalar	TÜBİTAK	2009-2011
Germinal Merkez Çıkışlı Olan ve Germinal Merkez Çıkışlı Olmayan Diffüz Büyük B Hücreli Lenfomalarda C-MYC translokasyonu sıklığının araştırılması	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje No: 2010.01.0103.001)	2010-2012
Caprin1 Protein Ekspresyonu ile Caprin1 Gen Lokusunun Kopya	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi (Proje No: 2011.01.0103.002)	2011-2013

Sayılarının Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserlerinde Değerlendirilmesi		
Akciğer adenokarsinomlarında ROS1 gen yeniden düzenlenmesinin Floresan InSitu Hibridizasyon (FISH) ve immunohistokimyasal yöntemle araştırılması	Akdeniz Üniversitesi Uzmanlık Projesi, (Proje No: TTU-2016-1546)	2016-2018
Rat Modelinde Düşük Enerji Yoğunluklu Lazer ve Ozon Uygulamalarının İntraoral Yumuşak Doku İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi, (Proje No: TSA-2018-2848)	2018-2020
miR-8078 ve miR-3179'un Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri invazyon ve metastazını düzenleyici rollerinin in vitro ve in vivo olarak saptanması	TÜBİTAK	2018-
Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Hastalarında Delta-Like Protein 3'ün Prognoz, Klinik Parametreler ve Tedavi Yanıtı ile İlişkisi	Akdeniz Üniversitesi Uzmanlık Projesi, (Proje No: TTU-2018-3783)	2018-2020
Odontojenik Keratokist ve Dentijeröz Kist Olgularındaki P16 ve CAPRIN-1 Ekspresyonlarının Karşılaştırılması	Akdeniz Üniversitesi Uzmanlık Projesi, (Proje No: TDH-2019-4239)	2019-2020
Odontojenik Keratokist ve Dentijeröz Kist Olgularındaki Human Papilloma Virüs Prevalanslarının Karşılaştırılması	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi, (Proje No: TSA-2019-4303)	2019-2020
Bilimsel Araştırmalarda Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalının Yeri ve Önemi	Akdeniz Üniversitesi Alt yapı Projesi, (Proje No: TAY-2019-4634)	2019-2020
Sjögren Sendromlu olgularda tükürük bezi biopsi örneklerinde SSARo,	Akdeniz Üniversitesi Araştırma Projesi, (Proje No: TAY-2019-4634)	2019-

SSBLa, Alfa fodrin, Enolaz, BAFF, MMP9 ekspresyonları ve klinik parametrelerle ilişkileri, (Proje No: TAY-2019-4634),		
---	--	--

Burslar-Ödüller:

1.En İyi Olgu Posteri Ödülü

A. Akman, D.Sakallı, E. Çoban, İ.H. Özbudak, M.A. Çiftçioğlu, E. Alpsoy, E. Yılmaz. Ailesel Akdeniz Ateşi ile ilişkili Tekrarlayan Büllöz Lezyonlar: Olgu Sunumu. 21. Ulusal Dermatoloji Kongresi, 5-10 Eylül 2006, Antalya.

2.En İyi Poster Yarışması İkincilik Ödülü

İ.H. Özbudak, G. Özbilim, Ö. Özbudak, T. Sandıklı Kovan. Sarkoidozisli Olgularda Transbronşial İğne Aspirasyon Sitolojisi Bulguları. 4. Ulusal Sitopatoloji Kongresi. 26-29 Mart 2006, Ankara.

3.Türk Toraks Derneği 13. Yıllık Kongresi Poster Bildiri Dalında İkincilik Ödülü

Özbudak Ö, Özbilim G, Özbudak İH, Türkay C, Şahin N, Özdem S, Türkay M. Pulmoner vasküler sistem üzerine kolestrolde zengin diyetin, rekürren enfeksiyonların ve olası tedavi seçeneklerinin etkisi: Deneysel çalışma. Türk Toraks Derneği 13. Yıllık Kongresi. 5-9 Mayıs 2010, İstanbul.

4. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Bilimler Bölümü 2010-2012 yılları arasında SCI, SCI-E kapsamındaki dergilerde en fazla yayın yapan üçüncü Öğretim Üyesi

5. Prof.Dr. Altan Günalp Araştırması İkincilik Ödülü

Özeş NO, Görgişen G, Yılmaz Ö, Çetin Z, Pehlivanoğlu S, Özbudak İH, Erdoğan A. 'Identification of two novel mutations of insülin receptor substrate 1 (irs1) in nonsmall cell lung cancer tumors: implications for aberrant insülin signaling in development of cancer'. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27 – 30 Ekim 2015, Fethiye-Ölüdeniz.

Yayınlar ve Bildiriler:

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

A1. Bozcuk H, Gumus A, Ozbilim G, Sarper A, Kucukosmanoglu I, **Ozbudak İH**, Artac M, Ozdogan M, Samur M, Kaya A, Savas B. Cluster analysis of p-glycoprotein, c-

erb-B2 and P53 in relation to tumor histology strongly indicates prognosis in patients with operable non-small cell lung cancer. *Med Sci Monit.* 2005 Jun;11(6):HY11-20.

A2. Frazier AA, Franks TJ, Mohammed TL, **Ozbudak IH**, Galvin JR. From the Archives of the AFIP: pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis. *Radiographics.* 2007 May-Jun;27(3):867-882.

A3. Tavora F, Shilo K, **Ozbudak IH**, Przybocki JM, Wang G, Travis WD, Franks TJ. Absence of human herpesvirus-8 in pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor: immunohistochemical and molecular analysis of 20 cases. *Mod Pathol.* 2007 Sep;20(9):995-999.

A4. Ozbudak IH, Shilo K, Hale S, Aguilera NS, Galvin JR, Franks TJ. Alveolar airspace and pulmonary artery involvement by extramedullary hematopoiesis: a unique manifestation of myelofibrosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2008 Jan;132(1):99-103.

A5. Sezer I, Kocabas H, Melikoglu MA, Budak BS, **Ozbudak IH**, Butun B. Spontaneous pneumothorax in Wegener's granulomatosis: a case report. *Mod Rheumatol.* 2008 Feb;18(1):76-80.

A6. Ozbudak IH, Karaveli S, Simsek T, Erdogan G, Pestereli E. Neoangiogenesis and expression of hypoxia-inducible factor 1alpha, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 in endometrioid type endometrium adenocarcinomas. *Gynecol Oncol.* 2008 Mar;108(3):603-608.

A7. Kocabas H, Sezer I, Melikoglu MA, Gurbuz U, Illeez O, **Ozbudak IH**, Butun B. Hyperostosis frontalis interna in a patient with giant cell arteritis. *Mod Rheumatol.* 2008 Apr;18(2):181-183.

A8. Ozbudak IH, Dertsiz L, Bassorgun CI, Ozbilim G. Giant cystic chondroid hamartoma of the lung. *J Pediatr Surg.* 2008 Oct;43(10):1909-1911.

A9. Ozbudak O, **Ozbudak IH**, Wang KP. Association Between Acute Myeloblastic Leukaemia and Sarcoidosis. *West Indian Medical Journal.* 2009 Mar; 58 (2): 185-187.

A10. Mete A, Erbasan O, Kemaloglu C, **Ozbudak IH**, Turkay C. Pulmonary Artery Obstruction due to Papillary Fibroelastoma on the Pulmonary Valve: A Rare Cardiac Tumor. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Mar; 57(2):116-118.

A11. Akman A, Cakcak DS, Coban E, **Ozbudak IH**, Ciftcioglu MA, Alpsoy E, Yilmaz E. Recurrent bullous lesions associated with familial Mediterranean fever: a case report. *Clin Exp Dermatol.* 2009 Mar;34(2):216-218.

A12. Ozbudak IH, Shilo K, Tavora F, Rassaei N, Chu WS, Fukuoka J, Jen J, Travis WD, Franks TJ. Glucose transporter-1 in pulmonary neuroendocrine carcinomas: expression and survival analysis. *Mod Pathol.* 2009 May; 22(5): 633-638.

A13. Ozbudak IH, Ozbilim G, Kucukosmanoglu I, Dertsiz L, Demircan A. Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Neovascularization in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2009 Oct 10; 17(5): 390-395.

A14. Shilo K, Mani H, Deshpande C, **Ozbudak IH**, Travis WD, Galvin JR, Franks TJ. Diffuse thymic fibrosis: histologic pattern of injury or distinct entity? *Am J Surg Pathol*. 2010 Feb; 34(2):211-215.

A15. Hartel PH, Shilo K, Klassen-Fischer M, Neafie RC, **Ozbudak IH**, Galvin JR, Franks TJ. Granulomatous reaction to pneumocystis jirovecii: clinicopathologic review of 20 cases. *Am J Surg Pathol*. 2010 May; 34(5):730-734.

A16. Yazisiz V, **Ozbudak IH**, Nizam I, Erbasan F, Avci AB, Ozbudak O, Terzioglu E. A case of primary Sjögren's syndrome with pulmonary-limited Wegener's granulomatosis. *Rheumatol Int*. 2010 Jul; 30(9):1235-1238.

A17. Yazisiz V, Arslan G, **Ozbudak IH**, Turker S, Erbasan F, Avci AB, Ozbudak O, Terzioglu E. Lung involvement in patients with primary Sjögren's syndrome: what are the predictors? *Rheumatol Int*. 2010 Aug; 30(10):1317-1324.

A18. Ozbudak O, **Ozbudak IH**, Turkay C, Sahin N, Ozdem S, Turkay M, Ozbilim G. Effect of a cholesterol rich diet, recurrent infection and possible treatment modalities on the pulmonary vascular system: an experimental study. *West Indian Med J*. 2011 Mar; 60(2):132-136.

A19. Ozbudak IH, Guney K, Mutlu D, Gelen T, Ozbilim G. Bilateral tonsillar and esophageal Kaposi sarcoma in an HIV-negative patient. *Ear Nose Throat J*. 2011 Jul; 90(7):E23-26.

A20. Karasu-Minareci E, **Ozbudak IH**, Ozbilim G, Sadan G. Acute effects of vardenafil on pulmonary artery responsiveness in pulmonary hypertension. *Scientific World Journal*. 2012:718279.

A21. Burgucu D, Guney K, Sahinturk D, **Ozbudak IH**, Ozel D, Ozbilim G, Yavuzer U. Tbx3 represses PTEN and is over-expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2012 Oct 19;12(1):481.

A22. Zeybek A, Sahan L, Celik OI, **Ozbudak IH**, Kalemci S. Birt Hogg Dubè Syndrome: A Case Report. *J Pulm Respir Med*, 2013 S14. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-105X.S14-008>.

A23. Zeybek A, Toru S, **Ozbudak IH**, Sarper A, Oz N, Bozcuk H, Ozbilim G, Demircan A. Clinical and pathologic prognostic factors that are influential in the survival and prognosis of lung adenocarcinomas and invasive predominant subtypes. *Int Surg*. 2013 Jul-Sep; 98(3): 191-9.

A24. Gorgisen G, Ozes D, Pehlivanoglu S, Erdogan A, Dertsiz L, Ozbilim G, **Ozbudak**

IH, Savas B, Ozes ON. Differential expression and activation of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR1), ERK, AKT, STAT3, and TWIST1 in nonsmall cell lung cancer (NSCLC). *Exp Lung Res*. 2013 Nov; 39(9):387-98.

A25. Zeybek A, Sarper A, Kalemci S, Oz N, Erdogan A, **Ozbudak IH**, Dertsiz L, Demircan A. Benign lung tumors and their association with malignant tumors. *Acta Medica Mediterranea*. 2013; 29: 77-82.

A26. Oygucu SE, **Ozbudak IH**, Akcan AB, Coskun M, Ozel D, Ozbilim G, Oygur N. Effects of high-dose intravenous immunoglobulin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Int Immunopharmacol*. 2014 Jul;21(1):51-5. doi: 10.1016/j.intimp.2014.04.002.

A27. Toru HS, Sanhal CY, Yilmaz GT, **Ozbudak IH**, Mendilcioglu I, Ozbilim G. Rare Congenital pulmonary malformation with diagnostic challenging: Congenital Pulmonary Lymphangiectasia, report of four autopsy cases and review of literature. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014 Aug 21:1-10.

A28. Ocak GA, **Özbudak İH**, Toru H, Derin AT. Second Case Report of Myxofibrosarcoma of Larynx. *Otolaryngology*. 2015; vol.5, pp.186-188.

A29. Toru HS, Nur BG, Sanhal CY, Mihci E, Mendilcioglu İ, Yilmaz E, Yilmaz GT, **Ozbudak IH**, Karaali K, Alper OM, Karaveli FŞ. Perinatal Diagnostic Approach to Fetal Skeletal Dysplasias: Six Years Experience of a Tertiary Center. *Fetal Pediatr Pathol*. 2015; 34(5):287-306. doi: 10.3109/15513815.2015.1068414.

A30. Turhan O, Bostanci A, **Ozbudak IH**, Turhan M. Chronic Invasive Nongranulomatous Fungal Rhinosinusitis in Immunocompetent Individuals. *Case Rep Otolaryngol*. 2016; 2016:6854121.

A31. Yaprak N, Toru HS, **Ozbudak IH**, Guney K. Alveolar Soft Part Sarcoma Presenting with Nasal Obstruction. *J Otol Rhinol*. 2016; 5:1. doi:10.4172/23248785.1000265.

A32. Yaprak N, Toru HS, **Ozbudak IH**, Derin AT. Primary extraskkeletal Ewing's sarcoma of the maxillary sinus. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2016 Apr 27. doi:10.1016/j.bjorl.2016.03.014.

A33. Yaprak N, Bölükbaş M, **Özbudak İH**, Derin AT. Mucoepidermoid Carcinoma of Hard Palate in a Pediatric Case. *British Journal of Medicine and Medical Research*. 2016; vol.15, pp.1-4.

A34. Erin N, İpekçi T, Akkaya B, **Özbudak İH**, Baykara M. Neuropeptide Levels as well as Neprilysin Activity Decrease in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Microenviron*. 2016 Dec;9(2-3):141-147. doi: 10.1007/s12307-016-0189-y.

- A35.**Erin N, İpekçi T, Akkaya B, **Özbudak İH**, Baykara M. Changes in expressions of ADAM9, 10, and 17 as well as α -secretase activity in renal cell carcinoma. Urol Oncol. 2017 Jan;35(1):36.e15-36.e22. doi: 10.1016/j.urolonc.2016.08.010.
- A36.** Altay MA, Sindel A, Özalp Ö, Kocabalkan B, Özbudak İH, Erdem R, Salim O, Baur DA. Langerhans Cell Histiocytosis: A Diagnostic Challenge in the Oral Cavity. Case Rep Pathol. 2017;2017:1691403. doi: 10.1155/2017/1691403.
- A37.** Turhan M, Yaprak N, Sircan-Kucuksayan A, **Ozbudak IH**, Bostanci A, Derin A, Canpolat M. Intraoperative assessment of laryngeal malignancy using elastic light single-scattering spectroscopy: A pilot study. Laryngoscope. 2017 Mar;127(3):611-615. doi: 10.1002/lary.26224.
- A38.** Şimşek-Kaya G, **Özbudak İH**, Kader D. Coexisting sublingual dermoid cyst and heterotopic gastrointestinal cyst: Case report. J Clin Exp Dent. 2018;10(2):e196-9.
- A39.** Kaya GŞ, Özalp Ö, **Özbudak İH**. Synchronous occurrence of multiple distinct jaw lesions in Simpson-Golabi-Behmel Syndrome: A case report. J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2019 Nov;120(5):483-488. doi: 10.1016/j.jormas.2018.12.001. Epub 2018 Dec 12.
- A40.** Yalçın K, Tüysüz G, Genç M, **Özbudak İH**, Derin AT, Karaali K, Küpesiz A, Güler E. Pediatric Tonsillar Synovial Sarcoma- Very Rare Localization: A Case Report and Review of the Literature. Turk Patoloji Derg. 2020;36(1):82-86.
- A41.** Gorgisen G, Hapil FZ, Yilmaz O, Cetin Z, Pehlivanoglu S, **Ozbudak IH**, Erdogan A, Ozes ON. Identification of novel mutations of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) in tumor samples of non-small cell lung cancer (NSCLC): Implications for aberrant insulin signaling in development of cancer. Genet Mol Biol. 2019 Feb 25;42(1):15-25. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2017-0307. PMID: 30807634; PMCID: PMC6428125.
- A42.** Bostanci A, **Ozbudak IH**, Turhan M. Hyalinizing Clear Cell Carcinoma of the Maxilla. J Maxillofac Oral Surg. 2019 Sep;18(3):391-394. doi:10.1007/s12663-018-1163-7.
- A43.** Sircan-Kucuksayan A, Yaprak N, Derin AT, **Ozbudak İH**, Turhan M, Canpolat M. Noninvasive assessment of oral lesions using elastic light single-scattering spectroscopy: a pilot study. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2020 May;277(5):1467-1472. doi: 10.1007/s00405-020-05824-z.
- A44.** Bozca BC, **Ozbudak IH**, Alpsoy E. A case of Heck's disease with primary intestinal lymphangiectasia treated with imiquimod. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2020 Nov-Dec;86(6):724-725. doi: 10.4103/ijdv1.IJDVL_898_19.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

B1. Gulmez (Ozbudak) IH, Ozbilim G, Ozbudak O, Ozel E, Sarper A. Two cases of combined primary lung cancer consisting with small cell and non-small cell carcinoma. 17th Asia Pacific Congress on Diseases of the Chest, August 29-September 1, 2003, Istanbul, Turkey. Chest. 2003; (Supl.): 189.

B2. Kutuk G, Dosemeci L, Cingi M, Gelen T, **Gulmez (Ozbudak) IH,** Atalay S, Nizamoglu E, Ramazanoglu A. The histopathological effects on organs of desmopressin administration to rats in different doses. 25th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, March 21-25, 2005, Brussels, Belgium. Critical Care. March 2005; 9(Suppl. 1): 146.

B3. Rassaei N, Tavora F, **Ozbudak IH,** Chu W-S, Jaynes E, Sobin L, Travis WD, Jen J, Shilo K, Franks TJ. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression in pulmonary neuroendocrine carcinomas: Clone-based variability. 96th United States and Canadian Academy of Pathology, March 24-30, 2007, San Diego, USA. Modern Pathology. March 2007; 20 (Supl. 2): 329.

B4. Bassorgun CI, Unal B, **Ozbudak IH,** Akkaya B, Ciftcioglu MA. P27 and high molecular weight cytokeratin expression in prostatic atrophy and postatrophic hyperplasia. 21st European Congress of Pathology. September 8-13, 2007, Istanbul, Turkey. Virchows Archiv. August 2007; 451(2): 415.

B5. Ozbudak IH, Shilo K, Galvin JR, Franks TJ. Pulmonary angiomyolipoma: Clinicopathological analysis of 2 new cases and 10 previously reported cases. 21st European Congress of Pathology. September 8-13, 2007, Istanbul, Turkey. Virchows Archiv. August 2007; 451(2): 423.

B6. Ozbudak IH, Shilo K, Galvin JR, Franks TJ. Extramedullary hematopoiesis in pulmonary spindle cell tumors: Rare and unusual association. 21st European Congress of Pathology. September 8-13, 2007, Istanbul, Turkey. Virchows Archiv. August 2007; 451(2): 423.

B7. Bassorgun CI, Ozbilim G, **Ozbudak IH,** Sarper A, Erdogan A. Expression of the c-kit and ki-67 proliferation index in patients with lung cancer. 21st European Congress of Pathology. September 8-13, 2007, Istanbul, Turkey. Virchows Archiv. August 2007; 451(2): 427.

B8. Ozbilim G, Uguz A, **Ozbudak IH,** Celmeli F, Er H. Ciliary dysmorphology: Ultrastructural findings in 12 patients. 21st European Congress of Pathology. September 8-13, 2007, Istanbul, Turkey. Virchows Archiv. August 2007; 451(2): 427.

B9. Burke A, Tavora F, **Ozbudak I,** Franks TJ, Miettinen M. Pediatric cardiac sarcomas, a series of 16 new cases with literature review. 21st European Congress of

Pathology. September 8-13, 2007, Istanbul, Turkey. Virchows Archiv. August 2007; 451(2): 489-490.

B10. Gurer E, **Ozbudak IH**, Karanis ME. Ganglioglioma in a pediatric case: a unique and rare tumor. 22nd European Congress of Pathology. 4-9 September 2009, Florence-Italy. Virchows Archiv. August 2009; 455 (Suppl.1): 165.

B11. Ozbudak IH, Turhan M, Erdogan G, Guney K, Ozbilim G. Glucose transporter-1 expression in squamous cell carcinoma of larynx. 22nd European Congress of Pathology. 4-9 September 2009, Florence-Italy. Virchows Archiv. August 2009; 455 (Suppl.1): 318-319.

B12. Ozbilim G, **Ozbudak IH**, Ozbey C, Erdogan G, Erdogan A, Ozbudak O. Pulmonary sclerosing hemangioma with lymph node metastasis and multiple lung involvement. 22nd European Congress of Pathology. 4-9 September 2009, Florence-Italy. Virchows Archiv. August 2009; 455 (Suppl.1): 350.

B13. Ozbudak IH, Ozbudak O, Oz N, Karanis ME, Okudan H, Ozbilim G. Pulmonary sclerosing hemangioma with tuberculosis lymphadenitis. 22nd European Congress of Pathology. 4-9 September 2009, Florence-Italy. Virchows Archiv. August 2009; 455 (Suppl.1): 350.

B14. Ozbudak O, **Ozbudak IH**, Turkay C, Sahin N, Ozdem S, Turkay M, Ozbilim G. Effect of cholesterol rich diet, recurrent infection and possible treatment modalities on pulmonary vascular system: an experimental study. 22nd European Congress of Pathology. 4-9 September 2009, Florence-Italy. Virchows Archiv. August 2009; 455 (Suppl.1): 355.

B15. Ozbudak IH, Gurer E, Gokhan G, Akkaya B. Neurofibroma with multifocal schwannoma-like nodules: a unique entity. 22nd European Congress of Pathology. 4-9 September 2009, Florence-Italy. Virchows Archiv. August 2009; 455 (Suppl.1): 369.

B16. Aydin C, Bisgin A, Sanlioglu AD, Pestereli E, Erdogan G, **Ozbudak IH**, Simsek T, Sanlioglu S. Distinctive expression profiles of trail and trail receptors in patients with endometrial carcinoma. 18th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy. October 22-25, 2010, Milan, Italy. Human Gene Therapy. October 2010; 21(10): 1462.

B17. Aydin C, Bisgin A, Sanlioglu AD, Pestereli E, Erdogan G, **Ozbudak IH**, Simsek T, Sanlioglu S. Endometrial hyperplasia features distinctive trail and trail receptor expression profiles. 18th Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy. October 22-25, 2010, Milan, Italy. Human Gene Therapy. October 2010; 21(10): 1462-1463.

B18. Ozbudak IH, Toru S, Turhan M, Ozbilim G. A unique location for malignant melanoma: case report. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S115-116.

B19. Toru S, **Ozbudak IH**, Karaali K, Mendilcioglu I, Gelen T. Achondroplasia type of osteochondrodysplasia: case report. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S128-129.

B20. **Ozbudak IH**, Hazar V, Arslan G, Melikoglu M, Ozbilim G. Pleuropulmonary blastoma type II: case report. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S142.

B21. **Ozbudak IH**, Ozbilim G, Ozbudak O, Arslan G. Multiple pulmonary meningioma: possibly metastases from intracranial meningioma. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S142.

B22. **Ozbudak IH**, Ocak GA, Arslan G, Erdogan A, Ozbilim G. The occurrence of rheumatoid nodules and chondroid hamartoma in same patient: case report. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S142-143.

B23. Toru S, **Ozbudak IH**, Ozbudak O, Sarper A, Ozbilim G. Endobronchial metastasis of renal cell carcinoma: case report. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S149.

B24. Ocak GA, Gurer IE, **Ozbudak IH**, Unal B, Aydın AT. Malignant glomus tumor of thigh: a rare tumor of soft tissue. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S197-198.

B25. Ocak GA, Gurer IE, **Ozbudak IH**, Ucar A, Toru S, Arici C. Amyloid goiter in a patient with familial Mediterranean fever. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S217.

B26. Ipekci T, **Ozbudak IH**, Erin N, Akkaya B, Baykara M. Activity as well as level of neprilysin (CD10) is decreased in renal cell carcinoma. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S262.

B27. Akkaya B, Erin N, Ipekci T, **Ozbudak IH**, Baykara M. Differential changes in ADAM proteins in renal cell carcinoma. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S275.

B28. Bassorgun CI, **Ozbudak IH**, Karanis MIE, Kankavi O, Ciftcioglu MA, Baykara M. Researching the correlation between surfactant protein-A and surfactant protein-D expression in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S276.

B29. Toru S, **Ozbudak IH**, Erbasan O, Ozbilim G. Atrial myxoma with fibrosiderotic (GAMNA-GANDY) nodule: case report. 23rd European Congress of Pathology. 27 August- 1 September, 2011, Helsinki, Finland. Virchows Archiv. August 2011; 459 (Suppl.1): S301.

B30. **Ozbudak IH**, Toru S, Ocak GA, Ucar A, Ozbilim G. Pleural Effusion in Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma: Case Report. 36th European Congress of Cytology. September 22-25, 2011, Istanbul, Turkey. Cytopathology. October 2011; 22 (Suppl.1): 88.

B31. Ucar A, Ocak GA, **Ozbudak IH**, Toru S, Gurer IE. Diagnostic pitfalls of medullary thyroid carcinoma in fine needle aspiration biopsy specimens: A case report. 36th European Congress of Cytology. September 22-25, 2011, Istanbul, Turkey. Cytopathology. October 2011; 22 (Suppl.1): 114.

B32. Karauzum SB, Cetin Z, Akkaya B, Timuragaoglu A, **Ozbudak IH**, Bagcı H. Caprin 1 is frequently overexpressed in human lymphomas. The 12th International Congress of Human Genetics and the American Society of Human Genetics 61st Annual Meeting. October 11-15, 2011, Montreal, Canada. p247.

B33. Berker S, Cetin Z, **Ozbudak IH**, Ozdogan M, Ozbilim G. Evaluation of Caprin 1 protein expression in Lung Carcinomas. Human genome meeting. Genetics and genomics in personalised medicine. March 11-14, 2012 .Sydney,Australia.

B34.**Ozbudak IH**, Ocak GA, Akyuz M, Karaali K, Gurer IE. Epithelioid glioblastoma:case report. 10th European Congress of Neuropathology. June 6-9, 2012, Edinburgh, Scotland. Clinical Neuropathology. July/August 2012: 269.

B35. Erin N, Ipekci T, Akkaya B, **Ozbudak IH**, Baykara M. Neprilysin activity and levels as well as alpha-secretase activity and ADAM10 levels are decreased in renal cell carcinoma. Journal of Endourology. September 2012. Supp. 1, A434-A434.

B36. Cetin Z, , **Ozbudak IH**, Karauzum S, Ozdogan M, Ozbilim G. Caprin1 overexpression in non-small cell lung carcinomas. Pulmonary Pathology Society Biennial Meeting, June 2013, Grenoble, France.

B37. **Ozbudak IH**, Ozcan M, Ozbilim G. Identification of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutations and Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) gene rearrangement in lung adenocarcinomas. Pulmonary Pathology Society Biennial Meeting, June 2013, Grenoble, France.

- B38.** Toru HS, Tasova Yilmaz G, **Ozbudak IH**, Nur B, Sanhal CY, Karaali K, Alper O, Mendilcioglu I, Mihci E, Karaveli S. Prenatal diagnostic approach to fetal skeletal dysplasia. 25th European Congress of Pathology, 31 August- 4 September, 2013, Lisbon, Portugal. Virchows Archiv. August 2013; 463 (2): 184.
- B39.** Toru HS, Tasova Yilmaz G, **Ozbudak IH**, Mendilcioglu I, Aslan A, Ozbilim G. Four cases with congenital pulmonary airway malformation. 25th European Congress of Pathology, 31 August- 4 September, 2013, Lisbon, Portugal. Virchows Archiv. August 2013; 463 (2): 188.
- B40.** **Ozbudak IH**, Toru HS, Tuncer ON, Erbasan O, Ozbilim G. Thoracic aortic aneurysm with cystic medial degeneration: a rare complication of psoriatic arthritis. 25th European Congress of Pathology, 31 August- 4 September, 2013, Lisbon, Portugal. Virchows Archiv. August 2013; 463 (2): 200.
- B41.** **Ozbudak IH**, Gokhan Ocak GA, Akdeniz S, Demircan A, Ozbilim G, Coskun HS. Pleural myxofibrosarcoma: Case report. 25th European Congress of Pathology, 31 August- 4 September, 2013, Lisbon, Portugal. Virchows Archiv. August 2013; 463 (2): 244.
- B42.** Toru HS, **Ozbudak IH**, Ozcaglar HU, Ozbilim G. Arteriovenous malformation of tongue: Case report. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, 25-30 May 2014, Istanbul, Turkey.
- B43.** **Ozbudak IH**, Toru HS, Yaprak N, Guney K, Ozbilim G. Heterotopic oral gastrointestinal cyst: Case report. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, 25-30 May 2014, Istanbul, Turkey.
- B44.** **Ozbudak IH**, Toru HS, Tozoglu S, Ozbilim G. Peripheral giant cell granulomas: Case report. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, 25-30 May 2014, Istanbul, Turkey.
- B45.** Toru HS, **Ozbudak IH**, Ozcan M, Yaprak N, Ozbilim G. Immunohistochemical p16 expression and its association with HPV DNA positivity in benign and malignant oral lesions. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, 25-30 May 2014, Istanbul, Turkey.
- B46.** Toru HS, Yaprak N, Derin AT, Cevikol C, **Ozbudak IH**. Melanotic neuroectodermal tumor of infancy: Case report. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, 25-30 May 2014, Istanbul, Turkey.
- B47.** Sircan Küçüksayan A, Yaprak N, Turhan M, **Ozbudak IH**, Özbilim G, Canpolat M. Assessment Of Elastic Light Single-Scattering Spectroscopy As A Diagnostic Tool For Larynx Malignancy. IFCC-WORLDBL, İSTANBUL, TÜRKİYE, 22-26 Haziran 2014, pp.467-467.

B48. Ozbudak IH, Toptas AB, Yaprak N, Turhan M, Toru HS. Sinonasal malignant schwannoma: A case report. 26th European Congress of Pathology, 30 August- 3 September, 2014, London, United Kingdom. Virchows Archiv. August 2014; 465 (Suppl.1): S82.

B49. Ozbudak IH, Yaprak N, Derin AT, Ozbilim G, Gunhan O. Extramammary Paget's Disease of the tongue. 26th European Congress of Pathology, 30 August- 3 September, 2014, London, United Kingdom. Virchows Archiv. August 2014; 465 (Suppl.1): S84.

B50. Toru HS, Yaprak N, Ozcan M, Cetin Z, Guney K, **Ozbudak IH.** Caprin1 and p16 expression in laryngeal squamous cell carcinoma (SCC). 26th European Congress of Pathology, 30 August- 3 September, 2014, London, United Kingdom. Virchows Archiv. August 2014; 465 (Suppl.1): S86.

B51. Toru HS, Sanhal CY, Tasova Yilmaz G, **Ozbudak IH,** Mendilcioglu I, Ozbilim G. Rare congenital pulmonary malformation with diagnostic challenging: Congenital pulmonary lymphangiectasia, report of four autopsy cases. 26th European Congress of Pathology, 30 August- 3 September, 2014, London, United Kingdom. Virchows Archiv. August 2014; 465 (Suppl.1): S200.

B52. Ozbudak IH, Karakurt Eryilmaz M, Toru HS, Dertsiz L, Aydin F, Ozbilim G, Ozbudak O. Ectopic thymoma of pleura mimicking mesothelioma: Case report. 26th European Congress of Pathology, 30 August- 3 September, 2014, London, United Kingdom. Virchows Archiv. August 2014; 465 (Suppl.1): S371.

B53. Ozbudak IH, Toru HS, Ozbudak O, Coskun HS. Epithelioid hemangioendothelioma presenting with endobronchial lesion: Case report. 26th European Congress of Pathology, 30 August- 3 September, 2014, London, United Kingdom. Virchows Archiv. August 2014; 465 (Suppl.1): S373.

B54. Aytekin Z, Hatipoglu M, Toraman A, Tozoglu S, **Ozbudak IH,** Toru H. Peripheral Odontogenic Fibroma: A Case Report, Europerio 8 , 3-6 June 2015, London, United Kingdom. pp.86-86

B55. Yaprak N, Guzel P, Toru H, **Ozbudak IH,** Derin AT. Primary Extraskelatal Ewing's Sarcoma Of The Maxillary Sinus. 3rd Congress of European ORL-HNS, 7-11 June, 2015, Prague, Czech Republic.

B56. Yaprak N, Toru H, Bolukbas M, **Ozbudak IH,** Derin AT. Unique presentation of mucoepidermoid carcinoma in hard palate of oral cavity. 3rd Congress of European ORL-HNS, 7-11 June, 2015, Prague, Czech Republic.

B57. Yaprak N, Toru H, **Ozbudak IH,** Güney K. Alveolar soft part sarcoma presenting with nasal obstruction. 3rd Congress of European ORL-HNS, 7-11 June, 2015, Prague, Czech Republic. pp.42-42

B58. Bostanci A, **Ozbudak IH**, Toru S, Turhan M. Primer laryngeal amyloidosis. 3rd Congress of European ORL-HNS, 7-11 June, 2015, Prague, Czech Republic. pp.162.

B59. Bostanci A, **Ozbudak IH**, Toru S, Turhan M. Salivary gland tumor with oncocytic differentiation. 3rd Congress of European ORL-HNS, 7-11 June, 2015, Prague, Czech Republic. pp.175.

B60. Ozbudak IH, Toru HS, Karaguzel G. Congenital pulmonary airway malformation Type 4: Case report. 27th European Congress of Pathology, 5-9 September, 2015, Belgrade, Serbia. Virchows Archiv. September 2015; 467 (Suppl.1): S28.

B61. Ozbilim G, **Ozbudak IH**, Yaprak N. Oncocytic papillary cystadenoma of nasopharynx: Case report. 27th European Congress of Pathology, 5-9 September, 2015, Belgrade, Serbia. Virchows Archiv. September 2015; 467 (Suppl.1): S85.

B62. Toru HS, Yaprak N, Ocak GA, Derin AT, **Ozbudak IH**. Unique presentation and histopathologic subtype of intramuscular hemangioma: Case report. 27th European Congress of Pathology, 5-9 September, 2015, Belgrade, Serbia. Virchows Archiv. September 2015; 467 (Suppl.1): S88.

B63. Ozbudak IH, Yaprak N, Toru HS, Guney K. Plexiform neurofibroma of the larynx in a child: Case report. 27th European Congress of Pathology, 5-9 September, 2015, Belgrade, Serbia. Virchows Archiv. September 2015; 467 (Suppl.1): S89.

B64. Turhan Ö, Bostanci Toptaş A, **Ozbudak IH**, Turhan M. Invasive Sinonasal Aspergillosis in Immunocompetent Individuals. 12. Uluslararası Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, ANKARA, TÜRKİYE, 7-9 Nisan 2016, pp.439-439.

B65. Altay MA, Tozoglu S, **Ozbudak IH**, Ozalp O. The Effect of Decompression in the Histologic Diagnosis of Cystic Jaw Lesions: A Preliminary Report. ACBID 2016 10th International Congress, 11-15 May 2016, Antalya, Turkey. pp.35-35

B66. Kaya G, Tozoglu S, Tezerisener A, **Ozbudak IH**. Odontogenic fibroma located within a traumatic bone cyst. ACBID 2016 10th International Congress, 11-15 May 2016, Antalya, Turkey. pp.260-260.

B67. Akkaya B, **Ozbudak IH**, Bostanci A. An unusual case of Burkitt's lymphoma presenting as a gingival enlargement. 18 th meeting of the European Association for Haematopathology (EAHP 2016), September 3–8, Basel, Switzerland. pp.83-83.

B68. Ozbudak IH, Ozbudak O, Erdogan A. Diffuse pulmonary meningotheliomatosis: A rare entity. 28th European Congress of Pathology, 25-29 September, 2016, Cologne, Germany. Virchows Archiv. September 2016; 469 (Suppl.1): S137.

B69. Ozbudak IH, Derin AT, Karaali K, Ozcan M, Ozbilim G. Lymphoepithelial carcinoma (LEC) of the sublingual salivary gland: Case report. 29th European Congress

of Pathology, 2-6 September, 2017, RAI Amsterdam, The Netherlands. Virchows Archiv. September 2017; 471 (Suppl.1): S153.

B70. Ozbudak İH, Yaprak N, Derin AT. Mucoepidermoid carcinoma of the external auditory canal: Case report. 29th European Congress of Pathology, 2-6 September, 2017, RAI Amsterdam, The Netherlands. Virchows Archiv. September 2017; 471 (Suppl.1): S334.

B71. Akkaya B, Ozbudak İH, Akkaya H, Yaprak N, Salim O. Nasal extranodal natural killer/ T-cell lymphoma: Six case reports. 29th European Congress of Pathology, 2-6 September, 2017, RAI Amsterdam, The Netherlands. Virchows Archiv. September 2017; 471 (Suppl.1): S146.

B72. Akkaya B, Yilmaz DB, Ozbudak İH, Sarper A. Lipofibroadenoma of the thymus: a case report. 30th European Congress of Pathology, 8-12 September, 2018, Bilbao, Spain. Virchows Archiv. September 2018; 473 (Suppl.1): S272-S272.

C. Yazılan ulusal/uluslararası kitap/ bölüm ve çevirileri :

C1. Karabağlı P, Ertan Y, Özbudak İH. "14.BÖLÜM SOLUNUM SİSTEMİ": BRS PATOLOJİ, İSTANBUL TIP KİTAPEVLERİ, 2016

C2. Önal B, Özbudak İH, Paksoy N, Ürer HN, Aydoğdu Z, İlhan Çelik Ö ve ark., "OLGU ÖRNEKLERİ", SİTOPATOLOJİ, QUINTESSENCE YAYINCILIK, 2016

C3. Bakır K, Memiş L, Fırat P, Cansız Ersöz C, Gürel D, Veral A ve ark., "Akciğer Transplantasyon Patolojisi": Akciğer Biyopsilerinin Yorumu Biyopsi Yorumları Serisi, Dizbay Sak Serpil , Edit., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2015

C4. Özbudak İH. "3.BÖLÜM: Endobronşiyal ultrason ve transbronşiyal iğne aspirasyonu": SİTOPATOLOJİDE TEKNİKLER, Binnur Önal, Edit., Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2019.

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

D1. Dertsiz L, Özbilim G, Kükreler İ, **Özbudak İH**. Evaluation of cyclin-dependent kinase inhibitör p27 and Bcl-2 protein in non-small cell lung cancer. Türk Kanser Dergisi (Turkish Journal of Cancer). 2005 Oct-Dec;35(4):166-170.

D2. Özbilim G, **Özbudak İH**, Küçükosmanoğlu İ, Dertsiz L, Küpesiz GY, Türkay M. Evaluation of Transforming Growth Factor-β1, Fibronectin and Collagen Type IV in non-small cell lung carcinoma. Türk Toraks Dergisi (Turkish Respiratory Journal). 2006 Apr; 7(1):15-18.

- D3. Özbudak İH**, Gökhan GA, Özbilim G, Özbudak Ö, Özel E, Sarper A. Three cases of combined small cell lung carcinoma with review of the literature. *Türk Patoloji Dergisi* (Turkish Journal of Pathology). 2008; 24(3): 174-178.
- D4.** Erman Akar M, Kayacan N, Şatır F, **Özbudak İH**. Reed's Syndrome: Case Report. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik Dergisi* (Türkiye Klinikleri Journal of Gynecology and Obstetrics) 2009;19(6):361-364.
- D5.** Mete A, Memetoğlu ME, Erbasan O, **Özbudak İH**, Gölbaşı İ, Türkay C, Bayezid Ö. Siklosporin ve takrolimus (FK506) uygulamasının, sıçanlarda yeni oluşan ateroskleroz ve lipid profiline etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*. 2010;18(1):39-44.
- D6. Özbudak İH**, Özbilim G, Özbudak Ö, Kovan TS. Diagnostic value of transbronchial needle aspiration cytology in sarcoidosis. *Türk Patoloji Dergisi* (Turkish Journal of Pathology). 2011May; 27(2):149-153.
- D7. Özbudak İH**, Akkaya B, Karpuzoğlu G. Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Low and High Grade B-cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *Türk Patoloji Dergisi* (Turkish Journal of Pathology). 2011; 27(3):204-209.
- D8. Özbudak İH**, Başsorgun İC, Özbilim G, Lüleci G, Sarper A, Erdoğan A, Taylan F, Altıok E. Pulmonary Alveolar Microlithiasis with Homozygous c.316G>C (P.G106R) mutation: Case report. *Türk Patoloji Dergisi* (Turkish Journal of Pathology). 2012;28(3):282-285.
- D9.** Başsorgun İC, **Özbudak İH**, Erdoğan G, Elpek GÖ, Erdoğan O, Gelen T. Familial adenomatous polyposis associated with gastrointestinal stromal tumour: report of a case. *Türk Gastroenteroloji Dergisi* (Turkish Journal of Gastroenterology) 2012;23(3):262-266.
- D10. Özbudak İH**, Akkaya H, Akkaya B, Erdoğan G, Peştereli HE, Karaveli FŞ. Phyllodes Tumor of the Vulva: Report of Two Cases. *Türk Patoloji Dergisi* (Turkish Journal of Pathology). 2013 ; 29(1):74-77.
- D11. Özbudak İH**, Özbudak Ö, Arslan G, Erdoğan A, Özbilim G. Metachronous Malignant Mesothelioma and Pulmonary Adenocarcinoma. *Türk Patoloji Dergisi* (Turkish Journal of Pathology). 2013 ; 29(1):84-87.
- D12.** Yaprak N, Turhan M, **Özbudak İH**. Oncocytic Schneiderian Papilloma. *Akdeniz Tıp Dergisi*. 2015; 2: 113-116.
- D13.** Başsorgun Cİ, Ünal B, **Özbudak İH**, Uzun C, Yücel S, Çiftcioğlu MA. Paratestiküler Pleomorfik Liposarkom: Olgu Sunumu. *Pamukkale Tıp Dergisi*. 2015; 8(3):231-233.

D14. Ünal B, Başsorgun Cİ, **Özbudak İH**, Çiftcioğlu MA. Çocukluk Çağında İnmemiş Testis Dokusundan Gelişen Primer Histiyositik Sarkom. Akdeniz Tıp Dergisi. 2015; 2: 105-108.

D15. Şahin İ, Yıldız E, **Özbudak İH**. Preeruptive Intracoronal Resorption of Dentin in a Permanent Molar: Case Report. Türkiye Klinikleri J Dental Sci Cases. 2015;1(4):237-41.

D16. Uluçoban Dede H, Özbudak Ö, **Özbudak İH**. Endobronşiyal Soliter Papillom: Olgu Sunumu. Akdeniz Tıp Dergisi. 2017; 1: 57-58.

D17. Başsorgun Cİ, Ünal B, Erdoğan G, **Özbudak İH**, Çiftcioğlu MA, Baykara M. Embriyonal Prostatik Rabdomyosarkom: Olgu Sunumu. Akdeniz Tıp Dergisi. 2017; 3: 203-205.

D18. Dirol H, Özbudak Ö, **Özbudak İH**. A Rare Primary Lung Tumor: Pulmonary Epithelioid Hemangioendothelioma and a Literature Review. TURK ONKOLOJİ DERGİSİ-TURKISH JOURNAL OF ONCOLOGY. 2020;35: 340-344.

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

E1. Gülmez (Özbudak) İH, Gürer Eİ, Peştereli E, Ünal A. Melas Olgusu: Elektronmikroskopik Bir Çalışma. 16. Ulusal Patoloji Sempozyumu- Kemik ve Yumuşak Doku Tümörleri. 15-19 Ekim 2002, Denizli.

E2. Çetin S, Sezer C, Akkaya B, Köksal T, **Gülmez (Özbudak) İH**, Çiftcioğlu MA. Yineleyen Enfeksiyonlarla Seyreden Skrotal Kutanöz Leiomyoma. 16. Ulusal Patoloji Kongresi. 29-31 Mayıs 2003, Konya.

E3. Küçükosmanoğlu İ, Özbilim G, Bozcuk H, **Özbudak İH**, Sarper A. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomlarında p53, C-erb-B2 ve PGP Ekspresyonunun Değerlendirilmesi. 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu 1-6 Ekim 2004, Gaziantep.

E4. Özbudak İH, Erdoğan G, Peştereli HE, Şimşek T, Zorlu G, Karaveli Ş. Endometrium Seröz Adenokarsinomu: Klinikopatolojik Özellikler. 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu 1-6 Ekim 2004, Gaziantep.

E5. Yıldırım Küpesiz G, Çiftcioğlu MA, Akkaya B, Özel E, **Özbudak İH**, Köksal T. Sekiz Kadran Prostat İğne Biopsilerindeki Tümör Yüzdesi ile Radikal Prostatektomi Materyalleri Arasındaki Prognostik Belirteçlerin Karşılaştırılması. 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu 1-6 Ekim 2004, Gaziantep.

E6. Sezer C, Çetin S, **Özbudak İH**, Arıcı C, Karpuzoğlu G. Tiroid Papiller Karsinomunda Kistik Dejenerasyonlarla Karşılaşılabilen Nadir Bir Varyant: Papiller Karsinomun Kistik Varyantı; Olgu Sunumu. 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu 1-6 Ekim 2004, Gaziantep.

E7. Sezer C, Çetin S, **Özbudak İH**, Arıcı C, Karpuzoğlu G. Hashimoto Tiroiditine Eşlik Eden Tiroid Papiller Karsinomunun Oksifilik Hücreli (Onkositik) Varyantı; Olgu Sunumu. 17. Ulusal Patoloji Sempozyumu 1-6 Ekim 2004, Gaziantep.

E8. **Özbudak İH**, Akkaya H, Akkaya B, Erdoğan G, Peştereli HE, Karaveli Ş. Ektopik Meme Dokusundan Gelişen Benign Filloides Tümör, 2 Olgu Sunumu. 8. Ulusal Meme Hastalıkları Kongresi, 21-24 Eylül 2005, İstanbul.

E9. Başsorgun Cİ, **Özbudak İH**, Erdoğan G, Özbilim G, Karaveli Ş. Küçük Hücreli Akciğer Karsinomunun Meme Metastazı: Olgu Sunumu. 8. Ulusal Meme Hastalıkları Kongresi, 21-24 Eylül 2005, İstanbul.

E10. Özbilim G, **Özbudak İH**, Özbudak Ö, Yorulmaz G. Kronik Bronşitli Olguların Balgamlarında Mast Hücreleri ile Sitomorfolojik Bulguların Değerlendirilmesi. 1. Ulusal Sitopatoloji Kongresi. 2-5 Mart 2006, Antalya.

E11. **Özbudak İH**, Özbilim G, Gürer Eİ, Akkaya B, Gökhan GA, Karagüzel G. Çocuk Olguda Plevral Effüzyondan Sinaptofizin Pozitif Küçük Yuvarlak Hücreli Tumor Tanısı : Olgu Sunusu. 1. Ulusal Sitopatoloji Kongresi. 2-5 Mart 2006, Antalya.

E12. **Özbudak İH**, Akkaya B, Karpuzoğlu G. Düşük ve Yüksek Gradlı Non-Hodgkin Lenfomalarda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Ekspresyonu. 18. Ulusal Patoloji Sempozyumu- Onkolojik Patoloji. 7-11 Mayıs 2006, Çeşme-İzmir.

E13. **Özbudak İH**, Akkaya B, Karpuzoğlu G. Ekstranodal Natural Killer T Hücreli Lenfoma, Nazal Tip: Olgu Sunusu. 18. Ulusal Patoloji Sempozyumu- Onkolojik Patoloji. 7-11 Mayıs 2006, Çeşme-İzmir.

E14. Akman A, Sakallı D, Çoban E, **Özbudak İH**, Çiftçioğlu MA, Alpsoy E, Yılmaz E. Ailesel Akdeniz Ateşi ile İlişkili Tekrarlayan Büllöz Lezyonlar: Olgu Sunumu. 21. Ulusal Dermatoloji Kongresi, 5-10 Eylül 2006, Antalya.

E15. Akkaya B, **Özbudak İH**, Timurağaoğlu A, Karpuzoğlu G. Lenfomalarda i-Nitrik Oksit Sentaz ve Siklooksijenaz-2' nin Rolü. 17. Ulusal Kanser Kongresi 19-23 Nisan 2007, Antalya.

E16. Başsorgun Cİ, **Özbudak İH**, Sürer E, Çiftçioğlu MA. Radikal Prostatektomi Materyallerinde Dokundurma İmprint Materyalleri ile Gleason Paternlerinin Değerlendirilmesi. 17. Ulusal Kanser Kongresi, 19-23 Nisan 2007, Antalya.

E17. Başsorgun Cİ, Akman A, **Özbudak İH**, Sürer E, Alpsoy E, Çiftçioğlu MA. Malign Melanom Olgularında C-Kit (CD117) Ekspresyonu, Mast Hücre Yoğunluğu ve Ki-67 Proliferasyon İndeksi ile Clark Seviyesi ve Breslow Kalınlığı Arasındaki İlişkinin Araştırılması. 18. Prof.Dr. A.Lütfü Tat Sempozyumu, 6-10 Kasım 2007, Ankara.

E18. Sürer E, Başsorgun Cİ, **Özbudak İH**, Çiftçioğlu MA. Malignant Mesothelioma of Testis; Case Report and Review of the Literature. 17. Ulusal Patoloji Kongresi, 8-13 Eylül 2007, İstanbul.

E19. **Özbudak İH**, Başsorgun Cİ, Özbilim G, Sarper A, Erdogan A. Pulmonary Alveolar Microlithiasis: A Case Report and Review of the Literature. 17. Ulusal Patoloji Kongresi, 8-13 Eylül 2007, İstanbul.

E20. Özbudak O, **Özbudak İH**, Wang KP. Sarcoidosis In A Patient With Acute Myeloblastic Leukemia: The Association Is Causal Or Coincidental? 17. Ulusal Patoloji Kongresi, 8-13 Eylül 2007, İstanbul.

E21. Okudan H, Özbudak Ö, **Özbudak İH**, Özbilim G, Özdemir T. Kot Kumlamacılığı Yapan 6 Silikozisli Olgu. Toraks Derneği 11. Yıllık Kongresi, 23-27 Nisan 2008, Antalya.

E22. **Özbudak İH**, Dertsiz L, Başsorgun Cİ, Özbilim G. Akciğerin Dev Kistik Kondroid Hamartomu:Olgu Sunumu. Toraks Derneği 11. Yıllık Kongresi, 23-27 Nisan 2008, Antalya.

E23. Eren Karanis Mİ, **Özbudak İH**, Küpesiz G, Özbilim G, Özbudak Ö. Primer Akciğer Müsinöz Adenokarsinom Olgusu. 4. Ulusal Sitopatoloji Kongresi. 26-29 Mart 2009, Ankara.

E24. **Özbudak İH**, Özbilim G, Özbudak Ö, Sandıklı Kovan T. Sarkoidozisli Olgularda Transbronşial İğne Aspirasyon Sitolojisi Bulguları. 4. Ulusal Sitopatoloji Kongresi. 26-29 Mart 2009, Ankara.

E25. **Özbudak İH**, Özbilim G, Özbudak Ö, Özdoğan M. Endobronşial Tiroid Foliküler Karsinom Metastazı Aspirasyon Sitolojisi: Olgu Sunumu. 4. Ulusal Sitopatoloji Kongresi. 26-29 Mart 2009, Ankara.

E26. Özbudak Ö, Sandıklı T, **Özbudak İH**, Özdemir T, Özbilim G. Fiberoptik bronkoskopi veFloroskopi. Toraks Derneği 12. Yıllık Kongresi, 8-12 Nisan 2009, Antalya.

E27. Özbudak Ö, Sandıklı T, **Özbudak İH**, Özbilim G, Ögüş C. Endobronşial Lezyona Bakılmaksızın Malignite Ön Tanılı Hastalarda Transbronşial İğne Aspirasyonunun Tanısal Değeri. Toraks Derneği 12. Yıllık Kongresi, 8-12 Nisan 2009, Antalya.

E28. Özbudak Ö, Sandıklı T, **Özbudak İH**, Özbilim G, Özdemir T. Transbronşial Akciğer Parankim Biyopsisi ve Tanı. Toraks Derneği 12. Yıllık Kongresi, 8-12 Nisan 2009, Antalya.

E29. Özbudak Ö, Sandıklı T, **Özbudak İH**, Özbilim G. Endobronşial Lezyonu Olmayan Vakalarda Lenf Nodu. Toraks Derneği 12. Yıllık Kongresi, 8-12 Nisan 2009, Antalya.

E30. Özbudak İH, Er H, Demirtop A, Demir N, Özbilim G. Silier Diskinezi Solunum Yolu Epitel Hücrelerinin Silyalarında İzlenen Ultrastrüktürel Anomaliler. Uluslararası Katılımlı 19. Ulusal Elektronmikroskopi Kongresi, 22-25 Haziran 2009, Trabzon.

E31. Özbilim G, Eren Karanis Mİ, Sarper A, **Özbudak İH**. Pulmoner Hidatik Kist ve Aspergillus Enfeksiyonu Birlikteliği: Olgu Sunumu. 19. Ulusal Patoloji Kongresi, 7-11 Ekim 2009, Girne-Kıbrıs.

E32. Özbudak İH, Dertsiz L, Özbilim G. Taşlı Yüzük Hücreli Akciğer Adenokarsinomu. 19. Ulusal Patoloji Kongresi, 7-11 Ekim 2009, Girne-Kıbrıs.

E33. Başsorgun Cİ, Erdoğan G, **Özbudak İH**, Uzun C, Zorlu G, Çiftçioğlu MA. Psammomatöz karsinom, over: Olgu sunumu. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, 29 Eylül-3 Ekim 2010, Eskişehir.

E34. Başsorgun Cİ, **Özbudak İH**, Uzun C, Arıoğlu E, Elpek GÖ, Çiftçioğlu MA. Çekumda kavernöz hemanjiom: Olgu sunumu. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, 29 Eylül-3 Ekim 2010, Eskişehir.

E35. Karanis İE, Başsorgun Cİ, **Özbudak İH**, Sarper A, Özbilim G. İnflamatuvar miyofibroblastik tumor, akciğer: Olgu sunumu. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, 29 Eylül-3 Ekim 2010, Eskişehir.

E36. Başsorgun Cİ, **Özbudak İH**, Uçar A, Yücel S, Çiftçioğlu MA. Paratestiküler pleomorfik liposarkom: Olgu sunumu. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, 29 Eylül-3 Ekim 2010, Eskişehir.

E37. Başsorgun Cİ, Erdoğan G, **Özbudak İH**, Uzun C, Çiftçioğlu MA, Baykara M. Embriyonal prostatic rabdomyosarkom: Olgu sunumu. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, 29 Eylül-3 Ekim 2010, Eskişehir.

E38. Özbudak İH, Turhan M, Erdoğan G, Özcan M, Güney K, Özbilim G. Yassı epitel hücreli larinks karsinomlarında HIF-1alfa ekspresyonunun değerlendirilmesi. 19. Ulusal Kanseri Kongresi, 20-24 Nisan 2011, Antalya.

E39. Özbudak İH, Ocak GA, Karadağ H, Sarper A, Özbilim G. Sol hemitoraks yerleşimli , keratin ekspresyonu gösteren schwannom. 19. Ulusal Kanseri Kongresi, 20-24 Nisan 2011, Antalya.

E40. Özbudak İH, Özbudak Ö, Ocak GA, Toru S, Özbilim G. Hurtle hücreli karsinom sağ paratrakeal lenf nodu metastazı: Transbronşial iğne aspirasyon sitolojisi. 19. Ulusal Kanseri Kongresi, 20-24 Nisan 2011, Antalya.

E41.Özbudak İH, Uçar A, Akkaya B, Turhan M, Özbilim G. Lenf nodule metastazıyla tanı alan nazal-paranasal yerleşimli alveolar rabdomyosarkom. 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2011, İzmir.

E42.Başsorgun İC, **Özbudak İH**, Özkan Ö, Çiftçioğlu MA. Mantleoma: Olgu sunumu 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2011, İzmir.

E43.**Özbudak İH**, Toru S, Tuncer ON, Erbasan O, Özbilim G. Primer kardiak sinovyal sarkom. 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2011, İzmir.

E44.Toru S, **Özbudak İH**, Karaali K, Mendilcioğlu İ, Özbilim G. Olgu Sunumu: Thanatophoric Displazi. 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2011, İzmir.

E45.Toru S, **Özbudak İH**, Karaali K, Mendilcioğlu İ, Karaveli Ş. Osteokondroplazi: Altı Olgu Sunumu. 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2011, İzmir.

E46.**Özbudak İH**, Göksu SS, Başsorgun İC, Gürer Eİ, Özbilim G. Endobronşial Anjiosarkom: Olgu Sunumu. 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2011, İzmir.

E47.**Özbudak İH**, Karadağ H, Toru S, Sarper A, Özbilim G. Plevral epitelioid hemangioendotelyoma. 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2011, İzmir.

E48.Başsorgun İC, Tuncer SS, **Özbudak İH**,Çiftçioğlu MA. Testis dokusunda primer histiyositik sarkom: Olgu sunumu 21. Ulusal Patoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2011, İzmir.

E49.Tatlı AM, Coşkun HŞ, **Özbudak İH**, Başsorgun Cİ, Erkılıç M, Uysal M, Sezgin Göksu S, Arslan D, Gündüz Ş, Bozcuk H, Savaş B. Metastatik mikrokistik adneksial karsinom: Olgu sunumu. 4. Tıbbi Onkoloji Kongresi, 21-25 Mart 2012, Antalya.

E50. Ocak Gökhan GA, **Özbudak İH**, Toru HS, Derin AT. İkinci larinks mikzofibrosarkom olgusu. 22. Ulusal Patoloji Kongresi, 7-11 Kasım 2012, Antalya.

E51. Uzun ÖC, Toru HS, **Özbudak İH**, Turhan M, Özbilim G. Dilde Schwannom; Bir olgu sunumu. 22. Ulusal Patoloji Kongresi, 7-11 Kasım 2012, Antalya.

E52. **Özbudak İH**, Ocak Gökhan GA, Toru HS, Gürer İE, Özbilim G. Çocuk olguda plevral effüzyondan Rabdomyosarkom Tanısı: Olgu Sunusu. 5. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, 29-31 Mart 2013, Antalya.

E53. Toru HS, Ocak Gökhan GA, Tayfun F, **Özbudak İH**, Özbilim G. Akut prekürsör T hücreli lösemili olguda malign plevral efüzyon. 5. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, 29-31 Mart 2013, Antalya.

E54. Toru HS, Ocak Gökhan GA, İlhan Eker N, **Özbudak İH**, Özbilim G. Plevral ve perikardial efüzyonla prezente olan akut lenfoblastik lösemili olgusu. 5. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, 29-31 Mart 2013, Antalya.

E55. Uçar Ü, Gilgil E, Toru HS, **Özbudak İH**. Simetrik oligoartritle prezente olan Löfgren Sendromu olgusu. 10. Türk Romatoloji Sempozyumu, 11-14 Nisan 2013, Dalaman.

E56. Yaprak N, Asık M, Turhan M, Toru HS, **Özbudak İH.** Onkositik Schneiderian Papilloma. 35. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, 2-6 Kasım 2013, Antalya.

E57. Özbilim G, **Özbudak İH,** Ögüş C, Asal G, Özbudak Ö. Niemann-Pick Tip B hastalığı olan hastada akciğer tutulumu:Olgu sunumu. 23. Ulusal Patoloji Kongresi, 6-10 Kasım 2013, İzmir.

E58. **Özbudak İH,** Ayık E, Toru HS, Ögüş C, Çilli A, Özbilim G. Mediastinal lenfadenopatisi olan hastalarda transbronşiyal iğne aspirasyonunun tanısal değeri. 23. Ulusal Patoloji Kongresi, 6-10 Kasım 2013, İzmir.

E59. Toru HS, Ertuğrul SS, Sanhal CY, **Özbudak İH,** Mendilcioğlu İ, Özbilim G. Fetal otopsi olgularında konjenital akciğer patolojileri. Toraks Derneği 17. Yıllık Kongresi, 2-6 Nisan 2014, Antalya.

E60. Ünal B, **Özbudak İH,** Toru HS, Özbudak Ö. Sarkoidoz tanısında gözardı edilen önemli bir ipucu: Hamazaki-Wesenberg cisimcikleri.Toraks Derneği 17. Yıllık Kongresi, 2-6 Nisan 2014, Antalya.

E61. **Özbudak İH,** Toru HS, Özdemir T, Özbudak Ö, Özbilim G. Akciğerin transbronşiyal iğne aspirasyonu ve bronkoskopik biyopsi ile tanı konulan düşük dereceli mukoepidermoid karsinomu. Toraks Derneği 17. Yıllık Kongresi, 2-6 Nisan 2014, Antalya.

E62. **Özbudak İH,** Toru HS, Ocak GA, Çilli A, Özbudak Ö, Boz A. Bronşiyal Schwannom ve Akciğer Adenokarsinomu Birlikteliği: Olgu Sunumu. 24. Ulusal Patoloji Kongresi, 19-23 Kasım 2014, Trabzon.

E63. **Özbudak İH,** Toru HS, Ayık E, Erdoğan A. Difüz Küçük Pulmoner Meningotelyal Benzeri Nodüller. 25. Ulusal Patoloji Kongresi ve 6. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Bursa, Türkiye, 14-17 Ekim 2015.

E64. **Özbudak İH,** Toru HS, Bostancı Toptaş A, Ünay G, Çobankent Aytekin E, Turhan M. Adenoidektomi materyallerinde insidental bulgu: Respiratuar epitelyal adenomatoid hamartom. 25. Ulusal Patoloji Kongresi ve 6. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Bursa, Türkiye, 14-17 Ekim 2015.

E65. Toru H , Yaprak N, Ünay G, Güney K, **Özbudak İH.** Servikal lenfadenopatiyi taklit eden heterotopik tükrük bezi olgusu. 25. Ulusal Patoloji Kongresi ve 6. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Bursa, Türkiye, 14-17 Ekim 2015.

E66. **Özbudak İH,** Toru HS, Ünay G, Erdoğan A, Özbilim G. Pleuropulmoner Sinovyal Sarkom. 25. Ulusal Patoloji Kongresi ve 6. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Bursa, Türkiye, 14-17 Ekim 2015.

E67. Özbudak İH, Başarıcı İ, Erdoğan A, Arslan G, Toru HS, Özbilim G. Pulmoner Kapiller Hemanjiomatozis. 25. Ulusal Patoloji Kongresi ve 6. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Bursa, Türkiye, 14-17 Ekim 2015.

E68. Özbudak İH, Toru HS, Ünay G, Ocak GA. Kardiak Rabdomyosarkoma. 25. Ulusal Patoloji Kongresi ve 6. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Bursa, Türkiye, 14-17 Ekim 2015.

E69. Arabul S, Başaran A, **Özbudak İH**, Karagüzel G. Stridorun nadir bir nedeni: Aktinomiçes kolonizasyonu bulunan trakeal mukus tıkaçı. 34. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi, 7. Ulusal Pediatrik Üroloji Kongresi, 20. Ulusal Çocuk Cerrahisi Hemşireliği Kongresi, 26-30 Ekim 2016, Girne, KKTC.

E70. Şirin Özdemir B, Genç M, Çeçen Y, **Özbudak İH**. Nazal kavitede alveoler yumusak doku sarkomu: Olgu sunumu. XII. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, Antalya, Türkiye, 20-24 Nisan 2016, ss.142-143.

E71. Özbudak İH, Yaprak N, Ünal B, Toru HS, Güney K. Larinkste skuamöz hücreli karsinoma ve laringeal melanozis birlikteliği. 26. Ulusal Patoloji ve 7. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 2-6 Kasım 2016, ss.369-369

E72. Ünal B, Ayık E, **Özbudak İH**, Başsorgun Cİ. Kondrodermatitis nodularis helicis. 26. Ulusal Patoloji ve 7. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 2-6 Kasım 2016, ss.170-170

E73. Özcan M, **Özbudak İH**, Akkaya B, Özbilim G. Parafine gömülü doku örneklerinde tüberküloz basili varlığını göstermede polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin önemi. 26. Ulusal Patoloji ve 7. Ulusal Sitopatoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 2-6 Kasım 2016

E74. Yılmaz DB, Özbudak Ö, Dertsiz L **Özbudak İH**. Pulmoner alveoler proteinozis: Olgu sunumu. 27. Ulusal Patoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 15-18 Kasım 2017, ps149.

E75. Yıldırım E, **Özbudak İH**, Özbudak Ö, Arslan AG. Mikst skuamöz hücreli glandüler papillom: Olgu sunumu. 27. Ulusal Patoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 15-18 Kasım 2017, ps139.

E76. Ayık E, Özcan M, Salim Kıvrak D, Türkay M, Çoşkun HŞ, **Özbudak İH**. Akciğer adenokarsinomlarında ROS1 gen yeniden düzenlenmesinin FISH ve immunohistokimyasal yöntemle araştırılması. 27. Ulusal Patoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 15-18 Kasım 2017, ps131.