

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**HSP90 İNHİBİTÖRÜ PU-H71'İN VE RADYOTERAPİ İLE
KOMBİNE UYGULAMASININ METASTATİK MEME
KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şule KALE

DOKTORA TEZİ

2016-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**HSP90 İNHİBİTÖRÜ PU-H71'İN VE RADYOTERAPİ İLE
KOMBİNE UYGULAMASININ METASTATİK MEME
KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Şule KALE

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nuray ERİN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014.03.0122.005 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2016-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 21/07/2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuray ERİN
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Sadi S. ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Aylin F. KORCUM ŞAHİN
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA
Dumlupınar Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Banu ÖZTÜRK
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2016 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Öğrenci

Şule KALE

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Nuray ERİN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca yol gösteren, verimli bir doktora eğitimi tamamlamamı sağlayan, danışman hocam Prof. Dr. Nuray ERİN'e,

Doktora eğitimimde her zaman bilgi ve birikimlerinden yararlanmamı sağlayan ve bilimsel araştırmaya teşvik eden Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sadi S. ÖZDEM'e ve bölüm hocalarıma,

Tez çalışmam süresince müdürlüğünü yürüttüğü Sağlık Bilimleri Araştırma Uygulama Merkezi'nin imkanlarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ'e,

Çalışmalarımda her zaman bana yardımcı olan Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'dan Prof. Dr. Aylin F.KORCUM ŞAHİN, Yrd. Doç. Dr. Yiğit ÇEÇEN ve Ertuğrul DÜNDAR'a,

Doktora eğitimim boyunca manevi desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Süray PEHLİVANOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Gökhan GÖRGİŞEN'e,

Doktora tez çalışmamda deneylerin gerçekleştirilmesinde yardım eden, ilgi ve ablalığını / kardeşliğini eksik etmeyen Özlem DUYMUŞ, Müslime TANRISEVEN ve Arş. Gör. Esra NİZAM'a,

Çalışmam süresince destekleri ve yardımları için Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine ve sekreterliğine,

Doktora eğitimim boyunca ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında verdikleri sevgi, güven, destek, emek ve anlayışları için sevgili babam Mustafa ÖZKABAK, sevgili annem Semiha ÖZKABAK, abim Ahmet ÖZKABAK ve kardeşim Tuba YILDIZ'a,

Karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmem konusunda beni her zaman güçlendiren, sevgisi ve desteğiyle her ihtiyacım olduğunda yanımda olan sevgili eşim Burak KALE'ye, bana annelik duygusunu yaşatan ve yaşından büyük sabır gösteren kızım Asya KALE'ye ve tez yazma sürecinde benimle birlikte olan, henüz kucağıma alamadığım bebeğime teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: HSP90 (Isı Şok Proteini 90) birçok hücrel proteinin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Stresli durumlarda ekspresyonu artan HSP90 hücrel proteinleri degradasyondan korur. HSP90'nın ekspresyon profili normal ve malign hücrelerde farklılık göstermektedir. Kanserlerde HSP90 ekspresyonunun artışı kötü prognoz ve tedaviye dirençle ilişkilendirilmektedir. HSP90 inhibitörleri radyoterapiye duyarlaştırıcı etkileri ile birlikte kanser tedavisinde umut vadetmektedir. HSP90 inhibitörü PU-H71'in tek başına ve radyoterapi (RT) ile kombine kullanımının metastatik meme kanserindeki etkileri bilinmemektedir.

Yöntem: Fare metastatik meme kanseri (4T1) hücre hattı ve onun beyine (4TBM), karaciğere (4TLM) ve kalbe (4THM) metastaz yapan alt tipleri ile metastatik olmayan meme kanseri (67NR) hücrelerinde PU-H71'in proliferasyona olan etkisi WST-1 ile değerlendirildi. PU-H71'in kanser hücrelerinin RT'ye duyarlılığına etkisi koloni oluşturma deneyi ile belirlendi. Hücre hatları ve ex vivo kültürler ile miks lökosit kültürlerinde HSP90 inhibitörü ve RT sonrasında HSP90'nın hedef proteinlerindeki değişimler ile anjiogenik ve inflamatuvar mediatörlerin düzeylerine etkisi belirlendi. 4TBM hücreleri enjekte edilen Balb-c cinsi farelerde PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının tümör büyümesine ve akciğer metastazlarına etkisi araştırıldı.

Bulgular: HSP90 inhibitörü PU-H71 ve 17-AAG metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hücrelerinde büyümeyi güçlü bir şekilde inhibe etti ve RT'nin terapötik etkilerini arttırdı. PU-H71 ve RT kombine tedavisi ex vivo kültürlerde IL-6 düzeylerini, in vitro koşullarda ise SDF-1, MIP-2 ve VEGF düzeylerini arttırdı. PU-H71 tek başına ERK1/2, p38 ve Akt aktivasyonunu inhibe etti ve HSP90'nın hedef proteinleri N-kadherin ve HER2 ekspresyonunu azalttı. PU-H71 ve RT kombine tedavisi tümör büyümesi ve akciğer metastazlarını azalttı. Ayrıca PU-H71 ve RT miks lökosit kültürlerinde IL-17, TNF- α , IL-10 ve IFN- γ düzeylerini arttırdı.

Sonuç: Bu sonuçlar PU-H71 ve RT kombine kullanımının ortotopik metastatik meme kanseri modelinde tümör büyümesi ve akciğer metastazlarını azaltabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: PU-H71, radyoterapi, HSP90, meme kanseri, metastaz

ABSTRACT

Objective: Heat shock protein 90 (HSP90) which is induced by cell stress, stabilizes many cellular proteins and protects them from degradation. HSP90 has distinct expression profiles in normal and malignant cells. Increased expression of HSP90 in carcinomas is closely associated with a poor prognosis and resistance to therapy. HSP90 inhibitors are promising drugs for cancer treatment which are considered as new radiosensitizing agents. The effects of PU-H71, on metastatic breast carcinoma alone and in combination with radiotherapy (RT) are not known.

Method: Effect of PU-H71 in mouse metastatic breast carcinoma cells (4T1) and its brain (4TBM), liver (4TLM), heart (4THM) metastatic subsets as well as non-metastatic 67NR cells were determined using WST-1 cell proliferation assay. Changes in radiation sensitivity were determined by clonogenic assays. Changes in client proteins as well as levels of angiogenic and inflammatory mediators following treatments with HSP90 inhibitor and RT were determined in cell lines, ex-vivo cultures and mixed leukocyte cultures. Effect of PU-H71 and RT were investigated on tumor growth and lung metastasis of 4TBM cells injected orthotopic in balb-c mice.

Results: HSP90 inhibitors, 17-AAG and PU-H71 potently inhibited growth of metastatic and non-metastatic breast carcinoma cells and increased therapeutic effects of RT. IL-6 levels increased under ex vivo conditions following PU-H71 and radiation co-treatment. On the other hand co-treatment increased the levels of SDF-1, MIP-2 and VEGF only under in vitro conditions. PU-H71 alone inhibited ERK1/2, p38, Akt activation and reduced HSP90's client proteins, N-cadherin and HER2. PU-H71 and RT in combination reduced tumor growth and lung metastasis. PU-H71 and RT increased levels of IL-17, TNF- α , IL-10 and IFN- γ in mixed leukocyte cultures.

Conclusion: These results demonstrate for the first time that PU-H71 and RT in combination may reduce tumor growth and lung metastasis especially in orthotopic highly metastatic breast carcinoma model.

Key words: PU-H71, radiation therapy, HSP90, breast cancer, metastasis

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELELER ve KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Isı Şok Proteinleri	3
2.1.1. HSP90	3
2.1.2. HSP70	6
2.2. HSP90 inhibitörleri	7
2.2.1. 17-AAG	9
2.2.2. PU-H71	10
2.3. Radyoterapi	11
2.4. Meme kanseri	13
2.4.1. Metastaz	14
2.4.2. Meme kanseri ve PU-H71	14
2.5. Hücre içi sinyal yolları	15
2.5.1. ERK1/2	15
2.5.2. p38	16
2.5.3. Akt /PKB yolağı	17
2.6. Anjiogenik faktörler	17
2.6.1. MIP-2	17
2.6.2. VEGF	19
2.6.3. SDF-1	19
2.7. HSP90'nın kanser gelişimde rol oynayan hedef proteinleri	20
2.7.1. HIF-1	20
2.7.2. HER2	20
2.7.3. N-kadherin	21

2.8.	Kanser Gelişiminde Sitokinlerin Rolü	21
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1.	Hücre kültürü	23
3.1.1.	Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve İdamesi	23
3.1.2.	Hücrelerin Sayımı	23
3.2.	HSP90 inhibitörlerinin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	24
3.3.	Radyoterapi	24
3.4.	Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Canlılık Testi (WST-1 Testi)	24
3.4.1.	Hücre sayısını belirlemek için standart hazırlanması	25
3.5.	Koloni Oluşturma Deneyi	25
3.6.	Western Blot Yöntemi	26
3.6.1.	Hücre Lizatı Hazırlanması	26
3.6.2.	Örneklerdeki Protein Miktarının Belirlenmesi	27
3.6.3.	Western Blot Protokolü	28
3.7.	Ex vivo kültür çalışması	32
3.8.	İn vivo çalışmalar	33
3.8.1.	Tedavilerin uygulanması	34
3.8.2.	Miks lökosit kültürü	34
3.9.	ELISA Yöntemi	35
3.9.1.	Fare MIP-2 ELISA	35
3.9.2.	Fare CXCL12/SDF1 ELISA	37
3.9.3.	Fare VEGF ELISA	39
3.9.4.	Fare TNF-α ELISA	41
3.9.5.	Fare IL-6 ELISA	43
3.9.6.	Fare IL-10 ELISA	44
3.9.7.	Fare IL-17 ELISA	46
3.9.8.	Fare IFN-γ ELISA	48
3.9.9.	İnsan / Fare Total HIF-1α ELISA	50
3.10.	Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler, Kimyasallar, Kitler Ve Cihazlar	51

4. BULGULAR	55
4.1. HSP90 İnhibitörlerinin Kanser Hücre Hatlarında Proliferasyona Etkisi	55
4.1.1. 4T1, 4THM, 4TLM, 4TBM ve 67NR Hücre Hatlarında 17-AAG'nin Doza Bağlı Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi	55
4.1.2. 4T1, 4THM, 4TLM, 4TBM ve 67NR Hücre Hatlarında PU-H71'in Doza Bağlı Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi	56
4.1.3. 4T1, 4THM, 4TLM, 4TBM ve 67NR Hücre Hatlarında PU-H71 ve 17-AAG'nin IC50 Değerlerinin Hesaplanması	56
4.2. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71 ve RT Kombine Tedavisinin Hücre Proliferasyonuna Etkisi	57
4.2.1. 4TLM Hücre Hattında PU-H71'in RT ile Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi	57
4.2.2. 4THM Hücre Hattında PU-H71'in RT ile Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi	58
4.2.3. 4TBM Hücre Hattında PU-H71'in RT ile Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi	59
4.3. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71 ve RT Kombine Tedavisinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi	60
4.3.1. 4TLM Hücre Hattında PU-H71'in RT ile Kombine Uygulamasının Hücrelerde Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi	60
4.3.2. 4TBM Hücre Hattında PU-H71'in RT ile Kombine Uygulamasının Hücrelerde Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi	61
4.3.3. 4THM Hücre Hattında PU-H71'in RT ile Kombine Uygulamasının Hücrelerde Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi	62
4.4. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71'in RT Duyarlılığına Etkisi	63
4.4.1. 4TLM Hücre Hattında PU-H71'in RT Duyarlılığına Etkisi	63

4.4.2.	4TBM Hücre Hattında PU-H71'in RT Duyarlılığına Etkisi	64
4.4.3.	4THM Hücre Hattında PU-H71'in RT Duyarlılığına Etkisi	65
4.5.	PU-H71'in Metastatik Meme Kanseri Hücrelerinde HSP90 ve HSP70 Ekspresyonlarına Etkisi	66
4.6.	Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71'in Hücre İçi Sinyal Yolağı Proteinlerinin Aktivasyonuna Etkisi	67
4.6.1.	4THM Hücre Hattında PU-H71'in Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Rol Oynayan Proteinlerinin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi	67
4.6.2.	4TLM Hücre Hattında PU-H71'in Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Rol Oynayan Proteinlerinin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi	68
4.7.	Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71'in HSP90 Hedef Proteinlerine Etkisinin İncelenmesi	68
4.7.1.	4THM Hücre Hattında PU-H71'in HSP90 Hedef Proteinlerine Etkisinin İncelenmesi	69
4.7.2.	4TLM Hücre Hattında PU-H71'in HSP90 Hedef Proteinlerine Etkisinin İncelenmesi	69
4.8.	Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71 ve RT Kombine Uygulamasının HSP90 ve HSP70 Ekspresyonlarına Etkisi	70
4.9.	Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71 ve RT Kombine Uygulamasının Hücre İçi Sinyal Yolağı Proteinlerinin Aktivasyonuna Etkisinin İncelenmesi	71
4.9.1.	4TBM Hücre Hattında PU-H71 ve RT'nin Kombine Uygulamasının Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Rol Oynayan Proteinlerin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi	71
4.9.2.	4THM Hücre Hattında PU-H71 ve RT'nin Kombine Uygulamasının Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Rol Oynayan Proteinlerin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi	72
4.9.3.	4TLM Hücre Hattında PU-H71 ve RT'nin Kombine Uygulamasının Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Rol Oynayan Proteinlerin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi	72

4.10.	Fare Metastatik Meme Kanseri Hücrelerinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Kullanımının Anjiogenik Faktörlerin Salınımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi	73
4.10.1.	4TLM Hücrelerinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Kullanımının Anjiogenik Faktörlerin Salınımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi	73
4.10.2.	4TBM Hücrelerinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Kullanımının Anjiogenik Faktörlerin Salınımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi	75
4.11.	Ex Vivo Kültürlerde PU-H71'in Tek Başına ve RT İle Kombine Kullanımının IL-6, VEGF ve MIP-2 Salınımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi	77
4.12.	Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Tümör Büyümesine Etkisi	78
4.13.	Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Tümör Ağırlığına Etkisi	79
4.14.	Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Akciğer Metastazına Etkisi	80
4.15.	Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Tümör Dokusundaki HIF-1 α Düzeylerine Etkisi	81
4.16.	Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan Sitokinlere Etkisi	82
4.16.1.	Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan IL-17 Düzeylerine Etkisi	82
4.16.2.	Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan TNF- α Düzeylerine Etkisi	83

4.16.3. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71’in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan IL-6 Düzeylerine Etkisi	83
4.16.4. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71’in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan IL-10 Düzeylerine Etkisi	84
4.16.5. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71’in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan IFN-γ Düzeylerine Etkisi	85
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	109

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1:	Poliakrilamid jelin hazırlanması	30
-----------------	----------------------------------	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1:	HSP ailesi	4
Şekil 2:	HSP90'nın açık, ATP, ADP bağlı hali ve kompleks hali	5
Şekil 3:	HSP90 inhibitörlerinin etki mekanizması	8
Şekil 4:	17-AAG'nin kimyasal yapısı	10
Şekil 5:	PU-H71'in kimyasal yapısı	11
Şekil 6:	Koloni oluşturma deneyinde oluşan kolonilerin görüntüsü	26
Şekil 7:	Protein assay standart hazırlama yöntemi	27
Şekil 8:	Fare MIP-2 ELISA standart hazırlama yöntemi	36
Şekil 9:	Fare SDF-1 ELISA standart hazırlama yöntemi	38
Şekil 10:	Fare VEGF ELISA standart hazırlama yöntemi	40
Şekil 11:	Fare TNF- α ELISA standart hazırlama yöntemi	41
Şekil 12:	Fare IL-6 ELISA standart hazırlama yöntemi	43
Şekil 13:	Fare IL-10 ELISA standart hazırlama yöntemi	45
Şekil 14:	Fare IL-17 ELISA standart hazırlama yöntemi	47
Şekil 15:	Fare IFN- γ ELISA standart hazırlama yöntemi	48
Şekil 16:	İnsan / Fare Total HIF-1 α ELISA standart hazırlama yöntemi	50
Şekil 17:	17-AAG'nin altı farklı dozda fare metastatik meme kanseri (4T1, 4TLM, 4THM, 4TBM) hücreleri ve metastatik olmayan fare meme kanseri (67NR) hücre hattında hücre büyümesi inhibisyon oranları	55
Şekil 18:	PU-H71'in altı farklı dozda fare metastatik meme kanseri (4T1, 4TLM, 4THM, 4TBM) hücrelerinde ve metastatik olmayan fare meme kanseri (67NR) hücre hattında hücre büyümesi inhibisyon oranları	56
Şekil 19:	PU-H71 ve 17-AAG'nin fare metastatik meme kanseri (4T1, 4TLM, 4THM, 4TBM) hücreleri ve metastatik olmayan fare meme kanseri (67NR) hücre hattında hesaplanan IC50 değerleri	57

Şekil 20:	0,1 µM dozunda PU-H71 ve 10 Gy RT kombine uygulamasının beyine metastaz yapan fare meme kanseri (4TBM) hücrelerinde proliferasyona etkisi	58
Şekil 21:	0,1 µM dozunda PU-H71 ve 10 Gy RT kombine uygulamasının karaciğere metastaz yapan fare meme kanseri (4TLM) hücrelerinde proliferasyona etkisi	59
Şekil 22:	0,1 µM dozunda PU-H71 ve 10 Gy RT kombine uygulamasının kalbe metastaz yapan fare meme kanseri (4THM) hücrelerinde proliferasyona etkisi	60
Şekil 23:	0,1 ve 0,01 µM dozunda PU-H71 ve 2, 4, 6 veya 8 Gy tek doz uygulanan RT'nin karaciğere metastaz yapan fare meme kanseri (4TLM) hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi	61
Şekil 24:	0,1 ve 0,01 µM dozunda PU-H71 ve 2, 4, 6 veya 8 Gy tek doz uygulanan RT'nin beyne metastaz yapan fare meme kanseri (4TBM) hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi	62
Şekil 25:	0,1 ve 0,01 µM dozunda PU-H71 ve 2, 4, 6 veya 8 Gy tek doz uygulanan RT'nin kalbe metastaz yapan fare meme kanseri (4THM) hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi	63
Şekil 26:	PU-H71'in 4TLM hücrelerini RT'ye duyarlaştırıcı etkisinin gösterilmesi	64
Şekil 27:	PU-H71'in 4TBM hücrelerini RT'ye duyarlaştırıcı etkisinin gösterilmesi	65
Şekil 28:	PU-H71'in 4THM hücrelerini RT'ye duyarlaştırıcı etkisinin gösterilmesi	66
Şekil 29:	4THM hücrelerinde PU-H71'in farklı dozlarda HSP90 ve HSP70 ekspresyonlarına etkisi	66
Şekil 30:	4THM hücrelerinde PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 µM dozlarında Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonuna etkisi	67
Şekil 31:	4TLM hücrelerinde PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 µM dozlarında Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonuna etkisi	68

Şekil 32:	4THM hücrelerinde PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 μ M dozlarında HSP90 hedef proteinleri, HER2 ve N-kadherin ekspresyonlarına etkisi	69
Şekil 33:	4TLM hücrelerinde PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 μ M dozlarında HSP90 hedef proteinleri, HER2 ve N-kadherin ekspresyonlarına etkisi	70
Şekil 34:	4TBM hücrelerinde PU-H71'in 0.1, 0.05, 0.01 ve 0.001 μ M dozlarında tek başına ve RT ile kombine uygulamasının HSP90 ve HSP70 ekspresyonlarına etkisi	70
Şekil 35:	4TBM hücrelerinde PU-H71'in 0.1, 0.05, 0.01 ve 0.001 μ M dozlarında tek başına ve RT ile kombine uygulamasının p38 ve ERK1/2 fosforilasyonuna etkisi	71
Şekil 36:	4THM hücrelerinde PU-H71'in 0.1, 0.05, 0.01 ve 0.001 μ M dozlarında tek başına ve RT ile kombine uygulamasının p38 ve ERK1/2 fosforilasyonuna etkisi	72
Şekil 37:	4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.1, 0.05, 0.01 ve 0.001 μ M dozlarında tek başına ve RT ile kombine uygulamasının p38 ve ERK1/2 fosforilasyonuna etkisi	73
Şekil 38:	4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının MIP-2 salınımına etkisi	74
Şekil 39:	4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının VEGF salınımına etkisi	74
Şekil 40:	4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının SDF-1 salınımına etkisi	75
Şekil 41:	4TBM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının MIP-2 salınımına etkisi	76
Şekil 42:	4TBM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının SDF-1 salınımına etkisi	76
Şekil 43:	Ex vivo kültürü yapılan 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.01 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının IL-6 salınımına etkisi	77

Şekil 44:	Ex vivo kültürü yapılan 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.01 µM dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının MIP-2 salınımına etkisi	78
Şekil 45:	Ex vivo kültürü yapılan 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.01 µM dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının VEGF salınımına etkisi	78
Şekil 46:	4TBM hücre hattıyla oluşturulan ortotopik metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının tümör büyümesine etkisi	79
Şekil 47:	4TBM hücre hattıyla oluşturulan ortotopik metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının tümör ağırlığı üzerine etkisi	80
Şekil 48:	4TBM hücre hattıyla oluşturulan ortotopik metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının akciğer makrometastazları üzerine etkisi	81
Şekil 49:	4TBM hücre hattıyla oluşturulan ortotopik metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının tümör dokusunda HIF-1α ekspresyonu üzerine etkisi	81
Şekil 50:	PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde IL-17 düzeylerine etkisi	82
Şekil 51:	PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde TNF-α düzeylerine etkisi	83
Şekil 52:	PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde IL-10 düzeylerine etkisi	84
Şekil 53:	PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde IFN-γ düzeylerine etkisi	84

Şekil 54: PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde IL-6 düzeylerine etkisi

85



SİMGELER ve KISALTMALAR

ADP:	Adenozin difosfat
Akt/PKB:	Protein Kinaz B (Protein Kinase B)
ATP:	Adenozin trifosfat
APS:	Amonyum Persülfat
BSA:	Dana Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
DMEM:	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	2,2',2'',2'''-(Etan-1,2-diildinitril) tetraasetik asit
ERK:	Ekstrasellüler sinyalle ilişkili kinaz (Extracellular Signal–Regulated Kinase)
FBS:	Fetal Dana Serumu (Fetal Bovine Serum)
HOP:	HSP70-HSP90 organize edici protein
HRP:	Horseradish Peroksidaz
HSP70:	Isı şok protein 70
HSP90:	Isı şok protein 90
GDP:	Guanozin di fosfat
GTPaz:	Guanozin tri fosfataz
GTP:	Guanozin tri fosfat
Gy:	Gray

PAGE:	Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS:	Fosfat tampon solüsyonu
PVDF:	Poliviniliden diflorid (Polyvinylidene difluoride)
RT:	Radyoterapi
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED:	N,N,N,N-tetrametiletildiamin
dk:	Dakika
i.p.:	intraperitoneal
kDa:	kilo Dalton
sn:	Saniye
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
mM:	Milimolar
ng:	Nanogram
rpm:	Dakikadaki dönüş sayısı
µl:	Mikrolitre
µM:	Mikromolar

1. GİRİŞ

Isı şok proteinleri hücreyi dış ortamdan gelen çeşitli streslere karşı korumakla görevli protein ailesidir. Hücrede stres oluşturacak faktörlerden ısı, besin yoksunluğu, oksidatif stres gibi protein hasarı oluşturan durumlarda ısı şok proteinlerinin ekspresyonu artmaktadır (Calderwood, 2013). Isı şok proteinlerinin bir üyesi olan HSP90'nın görevi proteinlerin çökmesini önlemek, yeni sentezlenen proteinlerin üçüncül yapılarını kazanmasını sağlamak, proteinlerin doğru katlanmasını sağlamak ve ribozomdan görev alacağı yerlere taşımaktır (Li ve Buchner, 2013). Dolayısıyla hücrede farklı görevlerde bulunan 200'den fazla proteinin doğru katlanmasından sorumludur. Stresli durumlarda bu proteinlerin sentezi hızlanır ve fizyolojik koşullardakinin 2 ila 10 katına kadar çıkabilir (Gooljarsingh ve ark., 2006).

Kanser hücreleri metabolizması hızlı, sürekli proliferen olan stresli hücrelerdir. Kanser hücrelerinde HSP90 ekspresyonunun normalin üzerinde olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Ferrarini ve ark., 1992). Ayrıca bazı HSP90 inhibitörlerinin kanser hücrelerine normal hücrelerden daha fazla afinite gösterdiği de yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Kamal ve ark., 2003; Moulick ve ark., 2011). Bu nedenle HSP90 inhibitörleri kanser tedavisinde yeni bir terapötik yaklaşım olarak görülmekte ve umut vadetmektedir. HSP90 inhibitörlerinin bazı kemoterapötiklerle veya RT ile birlikte kullanıldığında etkinliğin arttığı, tümör hücrelerinin RT'ye duyarlılığının arttığını gösteren birçok in vitro ve in vivo çalışma vardır (Djuzenova ve ark., 2012; Schilling ve ark., 2012; Yoshida ve ark., 2011).

PU-H71 yeni bir pürin bazlı HSP90 inhibitörüdür. PU-H71'in normal hücreleri etkilemediği konsantrasyonlarda kanser hücrelerine karşı seçici aktivitesi farklı hücrelerde gösterilmiştir (Gallerne ve ark., 2013; Qu ve ark., 2014; Segawa ve ark., 2014). PU-H71 prelinik çalışmalarda güçlü anti-kanser özellik göstermiştir ve günümüzde klinik çalışmalarda faz I aşamasındadır.

Radyoterapi yaklaşık 100 yıldır kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Tümör hücrelerini öldürmede daha etkin olmak için yeni yaklaşım kemoterapötik ajanlarla RT'yi kombine etmektir. Bazı kemoterapötik ajanlar RT ile birlikte kullanıldığında tümör hücrelerinin RT'ye duyarlılığını arttırarak, RT'nin daha etkili olmasını sağlamaktadır (Langlands ve

ark., 2013). HSP90 inhibitörlerinin de RT ile birlikte uygulandığında RT'nin etkinliğini arttırdığını gösteren in vitro ve in vivo çalışmalar bulunmaktadır.

Metastatik meme kanseri dünya genelinde kadınlarda kansere bağlı ölümlerin sebepleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Lokalize kanserlerde etkin tedaviler uygulanabiliyor olsa da metastatik kanserler için henüz etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Kanser hastaları primer kanserden dolayı değil, daha çok metastatik lezyonlar nedeniyle hayatını kaybetmektedir.

Bu nedenle çalışmamızda farklı organlara metastaz yapmış fare metastatik meme kanseri hücre hatlarında HSP90 inhibitörü PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının etkileri in vitro koşullarda araştırıldı. Öncelikle HSP90 inhibitörü 17-AAG ve PU-H71'in fare metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hücre hatlarında proliferasyon üzerindeki etkisi incelendi. PU-H71'in kanser hücrelerinin RT duyarlılığına etkisini belirlemek için koloni oluşturma deneyi yapıldı. Daha sonra HSP90 inhibitörü PU-H71'in tek başına ve RT ile birlikte hücre içi sinyal yollarında rol oynayan Akt, ERK ve p38 gibi proteinlerin fosforilasyonları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Ayrıca HSP90 inhibitörlerinin immünolojik etkileri de göz önüne alınarak anjiyogenik faktörlerden VEGF (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü), SDF (Stromal hücre Kaynaklı Faktör) ve MIP-2 (Makrofaj İnflamatuar Protein 2) 'nin salınımindaki değişiklikler de araştırıldı. In vivo çalışmalarda ise beyne metastaz yapan fare meme kanseri hücre hattı 4TBM ile oluşturulan fare metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının tümör büyüme hızına ve tümör büyüklüğüne etkisi ile akciğer metastazlarına etkisinin incelenmesi amaçlandı. PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının tümör dokusundaki HIF-1 α ekspresyonuna etkisi de araştırıldı. Ayrıca dalak ve lenf nodlarından miks lökosit kültürü oluşturularak PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine tedavisinin immün hücrelerde pro-inflamatuar sitokinlerden IL-6 (İnterlökin-6), IL-17 (İnterlökin-17), TNF- α (Tümör Nekroz Faktör-Alfa) ile anti-tümoral sitokinlerden IL-10 (İnterlökin-10) ve IFN- γ (İnterferon- Gama)'nın salınımını nasıl etkilediği de incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteins, HSP)

Şaperonlar, çoğunluğunu ısı şok proteinlerinin oluşturduğu büyük bir protein ailesinden oluşmaktadır. Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Protein, HSP) ilk kez 1962 yılında Ferruccio Ritossa tarafından tanımlanmıştır (Ritossa 1996). *Drosophila melanogaster* (meyve sineği) yüksek ısıya (42-46°C) maruz kaldığında üretimi artan bir protein grubu olarak ortaya çıkmıştır. Daha sonrasında prokaryotlardan ökaryotlara kadar tüm canlılarda varlığı gösterilmiştir ve tüm canlılarda korunmuş bir proteindir. HSP gibi moleküler şaperonlar protein degradasyon mekanizmaları (proteazomlar) ile birlikte hücrel homeostazı sağlar (Voellmy ve Boellmann, 2007).

HSP'lerin hücrede stres oluşturacak faktörlerden ısı, besin yoksunluğu, oksidatif stres gibi protein hasarı oluşturan durumlarda ekspresyonu artmaktadır (Calderwood 2013). Çoğu HSP moleküler şaperon olarak görev yapmaktadır (Şekil 1). HSP'ler diğer şaperonlar, koşaperonlar, ATPaz aktivite modülatörleri ve çeşitli aksesuar proteinler gibi moleküllerle bir araya gelerek fonksiyon gösterir (Goetz ve ark., 2003). Moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılırlar. Yüksek moleküler ağırlıklı HSP'ler ATP bağımlı olarak fonksiyon gösterirken küçük moleküler ağırlıklı HSP'ler ATP'den bağımsızdır. En çok çalışılan stresle indüklenebilir HSP'ler HSP90, HSP70 ve HSP27 (Jego ve ark., 2013).

2.1.1. HSP90

HSP90, ısı şok proteinleri ailesinin 90 kDa ağırlığındaki üyesidir. Total hücrel proteinlerin %1-2'sini oluşturur (McClellan ve ark., 2007). Tüm hücreler için gerekli bir proteindir. ATP bağımlı moleküler bir şaperondur. Normal fizyolojik koşullarda, bu proteinlerin görevi; proteinlerin çökmesini önlemek, yeni sentezlenen proteinlerin üçüncül yapılarını kazanmasını sağlamak, yanlış katlanmış ve çökmüş proteinleri birbirinden ayırmak ve doğru katlanmasını sağlayarak ribozomdan görev alacağı yerlere taşımaktır. Stres koşullarında bu proteinlerin sentezi hızlanır ve normalin 2 ila 10 katına kadar çıkabilir (Gooljarsingh ve ark., 2006). Bunun nedeni, hücrelerin sağ kalımını arttırmak için koruyucu mekanizmalar oluşturmaktır.

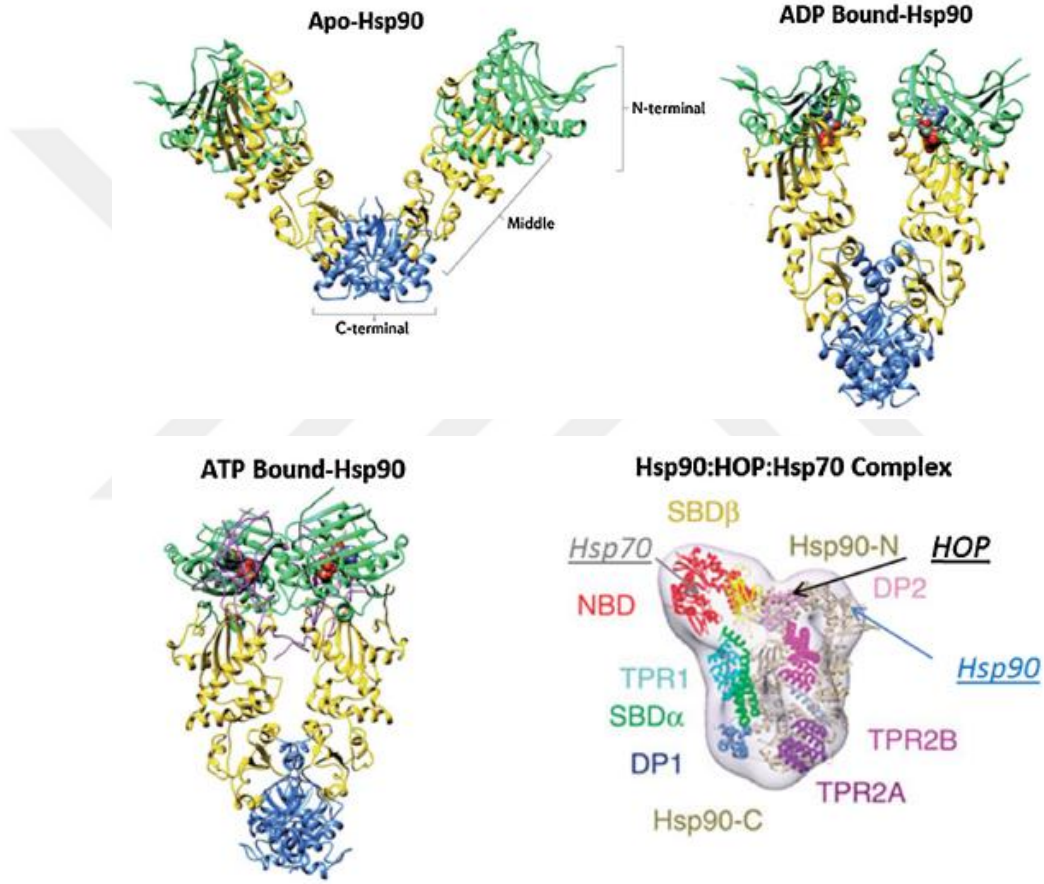
HSP	LOKALİZASYONU	İŞLEVİ
HSP100	Sitoplazma	Strese karşı tolerans
HSP90	Sitoplazma, endoplazmik reticulum (ER)	Hücre döngüsü, proliferasyon sinyal transdüksiyonunda rol oynayan proteinlerin tekrar katlanması ve stabilizasyonu
HSP70	Sitoplazma, mitokondri, ER	Isı şok yanıtının otoregülasyonu, organeller arası transport, antiapoptotik aktivite
HSP60	Sitoplazma, mitokondri	Proteinlerin yeniden katlanması ve agregasyonun önlenmesi
HSP40	Sitoplazma	HSP70 ile birlikte koşaperon aktivitesi
Küçük HSP'ler	Sitoplazma	Agregasyonların supresyonu, ısı inaktivasyonu

Şekil 1: HSP ailesi (You ve ark., 2008) ‘den uyarlanmıştır.)

HSP90 diğer moleküler şaperonlardan farklı olarak sinyal transdüksiyonunda (ör: steroid hormon reseptörleri, sinyal iletimindeki kinazlar) görevli bazı proteinlerin de stabilizasyonunu sağlar. Bu nedenle malign hücrelerin biyolojik ve klinik davranışlarında rol oynamaktadır. Ayrıca HSP90 büyümenin kontrolü, hücre sağ kalımı ve gelişiminde görevli çeşitli sinyal moleküllerinin katlanması ve stabilitesini kolaylaştırmaktadır (Dimopoulos ve ark., 2011). HSP90‘nın tanımlanmış 200’den fazla hedef (client) proteini vardır (<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>). HSP90’nın stabilize ettiği ya da katlanmasını sağladığı bu proteinleri HSP90’nın hedef proteinleri olarak tanımlayabiliriz. HSP90’nın hedef proteinleri arasında protein kinazlar, transkripsiyon faktörleri ve steroid hormon reseptörleri vardır (Li ve Buchner, 2013).

HSP90 her yerde bulunan fleksibl dimerik yapıda bir proteindir (da Silva ve Ramos, 2012). HSP90‘ın her bir dimeri üç ana bölgeden oluşmaktadır. Birincisi amino (N)-terminal domain; ATP bu bölgeye bağlanır, ATPaz aktivitesiyle hidrolize edici cep buradadır. Bu bölge HSP90’nın hedef proteinlerinin katlanmasını düzenler. İkincisi orta domain; hedef proteinlerin tanımlanması/bağlanmasından sorumludur. Üçüncü karboksi (C)- terminal domain; HSP90 dimerizasyonunu düzenler. HSP90’nın aktivitesi için ATP

gereklidir. HSP90'a ATP bağlanmasıyla HSP90 konformasyonel değişime uğrayarak kapanır ve daha kompakt bir hal alır (Şekil 2). Koşaperon olarak isimlendirilen geniş bir kofaktör grubu ile birlikte çalışır. Kaşaperonlar HSP90 ile ikili ya da üçlü kompleksler oluşturarak hedef proteinlerin olgunlaşmasını kolaylaştırırlar (Li ve Buchner, 2013). Daha sonra ATP hidrolize uğrar ve HSP90 açık konuma gelir, hedef protein ortama salınır.



Şekil 2: HSP90'nın açık, ATP, ADP bağlı hali ve kompleks hali (Trendowski 2015)

HSP90'nın farklı izoformları hücrenin farklı bölgelerinde bulunur. HSP90α ve HSP90β genellikle sitoplazmada bulunurken az miktarda nukleusta bulunabilir. gp96 (Grp94 (glikozla ilişkili protein 94), ERp99 veya endoplazmin) endoplazmik retikulumda, TRAP1 (Tümör nekroz faktör reseptör ilişkili protein 1) ise mitokondride bulunur. HSP90α stres ile indüklenen hücre koruyucu ve hücre döngüsünü düzenleyici fonksiyon gösterirken HSP90β ise temel olarak erken embriyolojik gelişim, sinyal transdüksiyonu ve uzun dönem hücre adaptasyonunda görev alan sürekli olarak eksprese edilen alt

tipidir (Sreedhar ve ark., 2004). Ayrıca HSP90'nın kanser hücrelerinde ekspresyonunun arttığı ve tümörün invazyonunu arttırdığını gösteren çalışmalar vardır (Wang X ve ark., 2009).

HSP90 substratları, N-terminal ATPaz domaini tarafından düzenlenir. HSP90 ve hedef proteinleri arasındaki birleşme/ ayrılma döngüsünü kontrol etmek için ATPaz domaini ATP'yi hidrolize eder (Jackson 2013; Li ve Buchner, 2013). Bu ATPaz aktivitesi, ATP bağlanma durumuna göre HSP90'nın farklı konformasyonlarını üretir ve nükleotidin hidroliz olup olmayacağına karar verir. HSP90'nın aktivitesi daha çok ko-şaperonlar tarafından düzenlenir, ADP- ve ATP- bağlanma durumu arasındaki değişime yardımcı olur ve hedef proteine spesifik komplekslerin oluşumunu düzenler. Özellikle HSP90'nın bir koşaperonu olan HSP70, HOP aracılığıyla (HSP organize edici protein olarak isimlendirilen bir köprü protein) hedef proteinlerin transferini kolaylaştırır (Chen ve Smith 1998). HSP90'nın hedef proteinlerinin doğru katlanmasını, aktivasyonu ya da degradasyonunu ko-şaperon proteinler ve post-translasyonel modifikasyonların derecesi belirler (Li ve Buchner, 2013; Walton-Diaz ve ark., 2013).

HSP90 sinyal transdüksiyonu, intrasellüler transport ve protein degradasyonu gibi önemli birçok fizyolojik süreçte rol oynadığından kanser tedavisi için ilgi çekici bir hedef oluşturmaktadır (Li ve Buchner, 2013). HSP90 onkogenik proteinleri koruyan bir moleküler şaperon olma özelliğinin yanı sıra normal ve malign hücrelerde farklı ekspresyon profilleri göstermektedir. HSP90 ekspresyonu tümör hücrelerinde normal hücrelere göre 2-10 kat daha fazladır (Ferrarini ve ark., 1992). Bu nedenle de kanser tedavisinde önemli bir hedef olarak görülmektedir. Ayrıca malign dokularda öncelikli olarak hasar oluşturması HSP90 inhibitörlerinin kanser tedavisinde kullanılmasında rasyonel bir strateji sağlamaktadır (Trendowski 2015).

2.1.2. HSP70

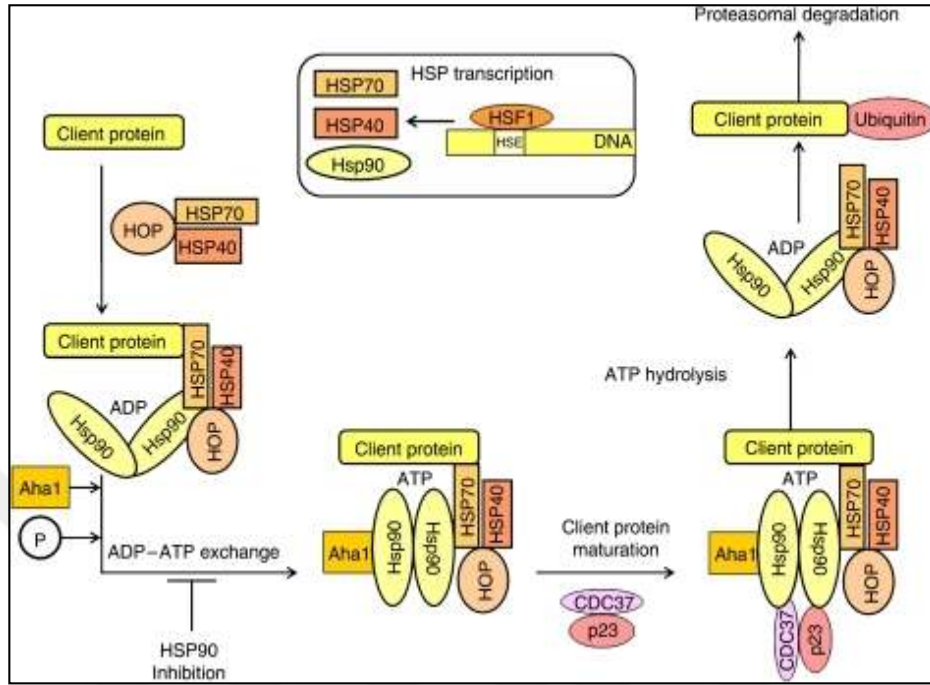
HSP70, HSP90 gibi moleküler bir şaperondur. HSP90'nın inhibisyonuna kompensatuar bir mekanizma olarak ekspresyonun artışıyla yanıt verir. Apoptozun düzenlenmesi gibi birçok fiziksel fonksiyondan sorumlu bir proteindir. Apoptozla ilişkili proteinlerin proteazom aracılı degradasyonunda HSP90'a benzer bir rol oynamaktadır.

HSP70 de HSP90 gibi karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. Bu etkisi, çoğu onkoproteinin stabilizasyonundan HSP90:HOP:HSP70 kompleksinin sorumlu olmasına bağlı olabilir. HSP90'nın inhibisyonu güçlü bir antitümör aktiviteye neden olmasına karşın bu etki ısı şok yanıtının temel düzenleyicisi HSF-1 (Isı Şok Faktör -1) 'in aktivasyonu ve dolayısıyla HSP70'in etkileriyle engellenebilir. HSF-1, HSP90 inhibe olduğunda aktive olur. HSF-1'in aktivasyonu bir geri besleme mekanizmasıyla HSP70'in düzeylerini artırır. Dolayısıyla HSP70'in anti-apoptotik etkileri HSP90 inhibitörleriyle baskılanır (Mahalingam ve ark., 2009).

2.2. HSP90 inhibitörleri

HSP90 inhibitörlerinin birçoğu HSP90'nın N-terminalindeki ATP bağlanma bölgesine bağlanır, şaperon döngüsünü durdurur ve proteinlerin katlanmalarını önleyerek hücre ölümüne sebep olur (Petrikaite ve Matulis, 2011). HSP90 inhibitörleri bu etkisini ATP bağlanma bölgesi için ATP ile (kompetitif) yarışarak yapar (Şekil 3). HSP90 inhibitörü 17-AAG, HSP90 kompleks formundayken ATP bağlanma bölgesine ATP ve ADP dahil diğer ligandlardan daha yüksek afinite gösterir. Kompleks oluşturmadığı durumlarda ise bu bölgenin HSP90 inhibitörüne afinitesi düşüktür (Kamal ve ark., 2003). Dolayısıyla HSP90 hem normal hem de neoplastik hücrelerde eksprese edilmesine karşın normal ve stresli ortamlarda belirgin bir aktivasyon farkı olduğundan potansiyel terapötik bir hedef olarak görülmektedir. Dolayısıyla HSP90 birçok hücrede yüksek oranda eksprese edilmesine karşın, HSP90 inhibitörleri normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerini daha selektif olarak öldürür (Kamal ve ark., 2003).

Moulick ve ark. yaptıkları çalışmalar sonucunda kanser hücrelerinde iki tip HSP90 varlığından söz etmişlerdir. Housekeeping HSP90 olarak isimlendirdikleri HSP90 tipinin normal hücrelerde de bulunan HSP90'a çok benzediğini ve küçük molekül inhibitörlerine (yeni nesil HSP90 inhibitörleri) düşük afinite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Epigenetik olarak housekeeping HSP90'dan farklı olan onkogenik HSP90 olarak isimlendirdikleri alt tipin ise küçük molekül inhibitörleri olarak bilinen HSP90 inhibitörlerine daha duyarlı olduğu buna karşın housekeeping HSP90'nın HSP90 inhibitörlerinin yüksek dozlarında ya da HSP90 inhibitörüne doygun hale getirildiğinde etkilendiğini bildirmişlerdir (Moulick ve ark., 2011).



Şekil 3: HSP90 inhibitörlerinin etki mekanizması (Mahalingam ve ark., 2009)

HSP90 inhibitörlerinin ilki olan Geldanamisin benzokuinon ansamisin grubu bir antibiyotiktir ve *Streptomyces hygroscopicus*'dan 1970 yılında izole edilmiştir (DeBoer ve ark., 1970). 1990'lı yıllarda insan kaynaklı tümör hücre Hatlarında yapılan çalışmalarda anti-tümör etkisi olduğu gösterilmiştir. Geldanamisin'in HSP90'ı direkt olarak hedef aldığı ise 1994 yılında tanımlanmıştır (Whitesell ve ark., 1994). Geldanamisin şaperon fonksiyonunu değiştirir ve birçok HSP90 hedef proteinin ubiquitin-proteazom yolağına sunumuna aracılık ederek bu proteinlerin degradasyonuna neden olur. Sonuç olarak hedef proteinler aktif formuna ulaşamaz ve proteazom aracılığı ile degrede olur (Mimnaugh ve ark., 1996).

Geldanamisin in vitro çalışmalarda güçlü sitotoksisite gösterse de in vivo çalışmalarda çözünürlüğünün yetersiz olması gibi olumsuz farmakokinetik özellikleri ve tolere edilemeyen karaciğer toksisitesi nedeniyle klinik çalışmalara girememiştir (Supko ve ark., 1995). Dolayısıyla çözünürlüğü arttırıp toksisiteyi azaltacak yarı sentetik HSP90 inhibitörleri geliştirilmeye çalışılmıştır. 17-AAG bunlardan biridir ve kliniğe giren ilk HSP90 inhibitörüdür. Etkinlik olarak doğal kaynaklı HSP90 inhibitörleri kadar iyi olsa da toksisitesi klinikte beklendiği kadar düşük olmadığından klinik çalışmalar hayal

kırıklığıyla sonuçlanmıştır. Bu nedenle doğal ürün kaynaklı Geldanamisin gibi birinci nesil HSP90 inhibitörlerinin yerini ikinci nesil tamamen sentetik küçük molekül HSP90 inhibitörleri almıştır (Neckers 2007) ve son on yılda HSP90 inhibitörlerinin keşfinde belirgin bir artış olmuştur. Etkinliği en az doğal kaynaklı HSP90 inhibitörleri kadar iyi ancak spesifikliğı ve terapötik indeksi daha geniş ve yan etkileri daha az olan HSP90 inhibitörleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu ürünler tamamen sentetik HSP90 inhibitörleridir. Bunlardan biri de pürin bazlı bir HSP90 inhibitörü olan PU-H71'dir.

HSP90 gibi moleküler şaperonların kanser tedavisinde hedef alınması monoklonal antikor ya da tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımına gerek kalmaksızın birçok malignitenin karsinogenezinde önemli rol oynayan onkoproteinlerin spesifik olarak inhibisyonuna neden olur (Trendowski 2015).

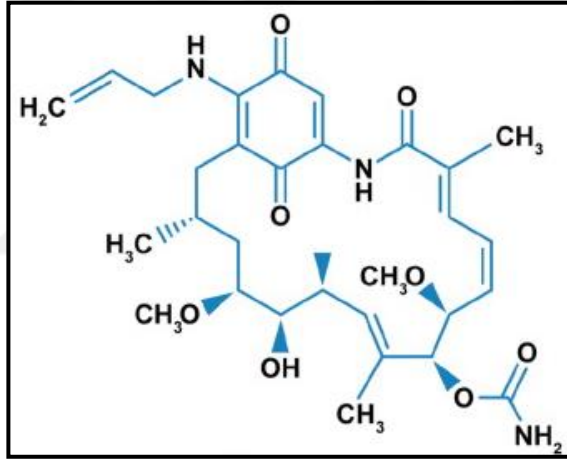
Meme kanser hücrelerinin sağ kalımında da gerekli onkojenik proteinlerin çoğı HSP90 tarafından stabilize edilir. Bu nedenle HSP90 inhibitörlerinin farklı kanser tiplerinin tedavisinde yarar sağlayabileceğine yönelik prelinik çalışmalar ile farklı faz aşamalarında klinik çalışmalar devam etmektedir. Günümüzde 17 farklı HSP90 inhibitörü çeşitli malign hastalıkların tedavisi için klinik değerlendirme altındadır (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=HSP90+inhibitor&Search=Search>). Bunlardan 17-AAG klinikte faz III aşamasındadır.

Kanser tedavisi dışında Alzheimer, Parkinson, Huntington Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda, fungal ve viral enfeksiyonlar, kistik fibrozis gibi hastalıkların tedavisi için de prelinik çalışmalar devam etmektedir (Joshi ve ark., 2016; Noh ve ark., 2012; Paul ve Mahanta, 2014; Wirk 2011). Ancak günümüzde sadece kanser tedavisi için klinik çalışma aşamasına gelebilmiştir.

2.2.1. 17-AAG

17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, Tanespimycin), Geldanamisin'in sentetik bir analogudur (Şekil 4). Geldanamisin'e benzer olarak HSP90'a bağlanır ve benzer dozlarda tümör hücrelerinde hedef proteinlerini destabilize eder (Schulte ve Neckers 1998). 17-AAG tümör kaynaklı HSP90'a normal hücrelerdeki HSP90'a göre 100 kat daha fazla afinite göstermektedir. Bunun nedeni tümör hücrelerinin HSP90 aktif konformasyonunu daha çok barındırmasıdır (Kamal ve ark., 2003).

Transgenik HER2 overeksprese tümör modellerinde 17-AAG'nin etkisi manyetik rezonans spektroskopisiyle görüntülenmiş ve tümörlerde belirgin bir gerileme gözlenmiştir (Rodrigues ve ark., 2012). Yapılan in vivo bir çalışmada immün sistemi çöktürülmüş farelerde, sol kalp ventrikülüne TM40D insan meme kanser hücreleri enjekte edilerek kemik metastazı oluşturulmuştur. Bu farelerde 17-AAG tedavisinin kemik metastazlarını azalttığı bildirilmiştir (Yan ve ark., 2013). Atimik kemirgenlerde feokromastoma metastaz modeli oluşturularak 17-AAG'nin metastaz ve sağ kalım etkisine bakılmış, HSP90 inhibitörü alan grupta metastazların anlamlı derecede az görüldüğü ve sağ kalımın arttığı bildirilmiştir (Giubellino ve ark., 2013).



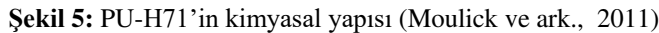
Şekil 4: 17-AAG'nin kimyasal yapısı (Dimopoulos ve ark., 2011)

Kliniğe ilk giren HSP90 inhibitörüdür. Ancak suda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle formülasyonun DMSO'da hazırlanması ve karaciğerde oluşturduğu toksik etkilerinden dolayı klinik çalışmalarda beklenen etki görülememiştir (Banerji ve ark., 2005; Tse ve ark., 2008).

2.2.2. PU-H71

PU-H71, Chiosis ve arkadaşları tarafından bulunan pürin bazlı bir HSP90 inhibitörüdür (Şekil 5). Tamamı sentetik olarak geliştirilen HSP90 inhibitörleri arasında en umut vaat edici olarak görülen PU-H71, HSP90 hedef proteini olarak karakterize edilmeyen onkoproteinlere karşı bile güçlü inhibitör etki göstermektedir.

4).

CCCN1C2=NC(=C(N)N=C2N1)S3=CC=CC(=C3)I

İyonize radyasyon yaklaşık 100 yıldır kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Hızlı şekilde proliferen olan kanser hücreleri radyasyonun oluşturduğu DNA hasarına normal hücrelerden daha duyarlıdır (Formenti ve Demaria, 2009)

RT, malign hücrelerin büyümesini kontrol altına almak veya öldürmek amacıyla kanser tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır. RT’de açığa çıkan elektromanyetik dalgalar normal dokular ile etkileşime girdiğinde birçok biyolojik etki yaratan elektronlar açığa çıkar; elektronlar hücrede bulunan su ile birleşir ve sonuçta hidroksil radikali başta olmak üzere birçok radikal oluşur. Bu radikaller DNA üzerinde tek ve çift iplik kırıkları yaratarak hücrenin ölmesine neden olur (Karu 1999). Tümör hücrelerini öldürmede daha etkin olmak için yeni yaklaşım kemoterapötik ajanlarla RT’yi birleştirmektir. Bazı kemoterapötik ajanlar RT ile birlikte kullanıldığında tümör hücrelerini RT’ye duyarlılığını arttırarak, RT’nin daha etkili olmasını sağlamaktadır (Langlands ve ark., 2013).

HSP90 inhibitörleri prelinik çalışmalarda RT ve farklı kemoterapötiklerle kombine olarak denenmektedir. HSP90 inhibisyonunun hücrede G2/M fazında duraklamaya neden olduğu bilinmektedir (Garcia-Morales ve ark., 2007; Senju ve ark., 2006). RT de benzer şekilde daha çok hücre döngüsünün G2 fazında duraklamaya ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Hwang ve Muschel, 1998).

HSP90 inhibitörlerinin de RT ile birlikte uygulandığında RT’nin etkinliğini arttırabileceğini düşündüren deneysel çalışmalar bulunmaktadır. HSP90 inhibitörlerinden Geldanamisin ve onun daha az toksik türevi 17-AAG’nin tümör hücrelerinin RT’ye duyarlılığını in-vitro ortamda arttırdığı gösterilmiştir (Machida ve ark., 2003; Matsumoto ve ark., 2005; Russell ve ark., 2003). 17-AAG ile yapılan in vivo çalışmalarda akciğer, glioma ve mesane kanser hücreleriyle immün sistemi çöktürülmüş farelerde RT ile kombine tedaviler uygulanmış ve tümör büyümesini yavaşlattığı görülmüştür (Kim ve Pyo, 2012; Okayasu ve ark., 2014; Sauvageot ve ark., 2009; Yoshida ve ark., 2011).

Şimdiye kadar PU-H71 ve RT’nin kombine kullanıldığı tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Akciğer kanser hücre hatlarında yapılan bu çalışmada PU-H71’in DNA çift zincir kırıklarının onarımını inhibe ederek hücreleri RT’ye duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Segawa ve ark., 2014). PU-H71 ve RT’nin birlikte kullanıldığına dair yayınlanmış in vivo bir çalışma henüz yoktur. Benzer şekilde, deneysel modellerde meme kanseri gelişimi (primer tümör büyümesi) ve metastazı üzerine PU-H71’in RT ile birlikte

uygulandığı ve in vivo etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. 17-AAG ve PU-H71'in de içinde olduğu HSP90 inhibitörleri ile RT kombine tedavisine yönelik bir klinik çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Meme kanserinde (in vitro ve in vivo) RT ile kombine diğer HSP90 inhibitörlerinin de kullanıldığı çalışma sayısının oldukça az olduğu gözlenmiştir. Yapılan in vitro bir çalışmada HSP90 inhibitörü AUY-922'nin MCF7 meme kanser hücrelerinde RT'ye duyarlılığı arttırdığı belirtilmiştir (Ha ve ark., 2011). Dolayısıyla bu çalışmada RT ile PU-H71'in kombine tedavisinin metastatik meme kanseri hücreleri üzerinde in vitro etkisi ile in vivo meme kanseri modelinde tümör büyümesi ve metastaz üzerine etkisi ilk defa araştırılmıştır.

Tümör hücrelerini öldürmede daha etkin olmak için yeni yaklaşım kemoterapötik ajanlarla RT'yi birleştirmektir. Bazı kemoterapötik ajanlar RT ile birlikte kullanıldığında tümör hücrelerini RT'ye duyarlı hale getirdikleri için tümör hücrelerinin ölmesinde daha etkin rol oynarlar. Geldanamisin ve onun daha az toksik türevi 17-AAG tümör hücrelerini RT'ye karşı daha duyarlı hale getirir ancak normal hücrelerde böyle bir etki gözlenmez (Machida ve ark., 2003; Matsumoto ve ark., 2005; Russell ve ark., 2003). HSP90 inhibitörlerinden bazıları da bu şekilde etki göstererek RT'ye duyarlılığı 100 kata kadar arttırabilir. Bunun yanı sıra NVP-AUY922 gibi bazı HSP90 inhibitörlerinin de RT duyarlılığını arttırıcı etkileri bulunmaktadır (Gandhi ve ark., 2013). PU-H71'in akciğer kanser hücrelerini RT'ye duyarlaştırdığı gösterilmiştir (Segawa ve ark., 2014).

2.4. Meme kanseri

Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin sebepleri arasında birinci sırada meme kanseri görülmektedir (Jemal ve ark., 2011). Meme kanseri genellikle lenf düğümü, akciğer, karaciğer, kemik ve beyine metastaz yapmaktadır. Tümör hücrelerinin metastatik özellikleri birbirinden farklılık göstermektedir.

Yaşam süresi boyunca her sekiz kadından biri meme kanseri teşhisi almaktadır. Meme kanseri, kadınlar arasında görülen en yaygın kanser tipidir. Amerika'da her yıl 220.000'den fazla kadın meme kanseri teşhisi almakta ve 40.000'den fazla kadın ise meme kanserinden hayatını kaybetmektedir (<http://www.nationalbreastcancer.org/breast-cancer-facts>).

Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2016'da yayınladığı Türkiye Kanseri İstatistikleri bilgilerine göre de Türkiye'de meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. 2013 yılı içerisinde tanı konulan her 4 kadın kanserinden 1'i meme kanseridir. Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %45'inin 50-69 yaş arasında olduğu, %40'ının ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir. Meme kanseri evreleri incelendiğinde veri tabanında yer alan invaziv vakaların %10'unda uzak metastaz görülmektedir.

Meme kanseri hastalarında artan HSP90 ekspresyonu lenf nodu tutulumu ve kötü prognozla korele bulunmuştur (Jameel ve ark., 1992). Ayrıca malign olmayan meme dokusuyla kanser meme dokusundaki HSP90 ekspresyonları karşılaştırıldığında kötü diferansiye karsinomlarda HSP90 ekspresyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Yano ve ark., 1999). Ayrıca, meme kanserli hastalarda yüksek HSP90 düzeyleri kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Pick ve ark., 2007). HSP90 inhibitörlerinin çoklu (multiple) onkojenik sinyal yolaklarını aynı anda baskılama potansiyeli olduğu için meme kanseri tedavisinde umut verici görülmektedir.

2.4.1. Metastaz

Metastaz bir tümör hücresinin orijinal tümörden ayrılıp başka bir organa taşınıp burada kontrolsüz bir şekilde büyümesi olarak tanımlanabilir. Metastatik kanser hücreleri yerleştikleri organın işlevini bozabilir, organı tahrip edebilir, ağrı ve patolojik belirtilere sebep olabilir. Kanser üzerine yapılan çalışmaların giderek artması ve gelişen teknolojiye rağmen kanser hastalarının çoğu primer tümörden dolayı değil organlarda gelişen metastazlar nedeniyle ölmektedir (Weigelt ve ark., 2005). Meme kanseri daha çok lenf nodu, kemik ve akciğer olmak üzere karaciğer ve beyin gibi diğer organlara da metastaz yapmaktadır (Minn ve ark., 2005).

2.4.2. Meme kanseri ve PU-H71

Bazı meme kanseri tiplerinde overeksprese olan HER2/Neu proteininin moleküler şaperonu HSP90'dır. Bu nedenle özellikle HER2 pozitif meme kanserlerinde HSP90 inhibitörleri yeni bir kemoterapötik ajan olarak klinik çalışmalarda da araştırılmaktadır.

PU-H71 diğer HSP90 inhibitörlerinden farklı olarak üçlü negatif meme kanserinde (östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve HER2/Neu gen ekspresyonu az ya da yok) de hem in vitro hem in vivo çalışmalarda güçlü bir antikanser aktivite göstermiştir (Caldas-Lopes ve ark., 2009). Bu çalışmada PU-H71, insan üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında belirgin şekilde HSP90 inhibisyonuna neden olmuştur.

İn vitro bir çalışmada PU-H71 tek başına ve TNF- α ile birlikte metastatik meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231, BT-474 ve MCF7'ye uygulanmıştır. TNF- α 'nın tümör hücreleri üzerinde PU-H71'in toksik etkisini arttırdığı ve PU-H71'in TNF- α 'nın indüklediği IKK- β degradasyonu ile NF- κ B transkripsiyonel aktivitesini downregüle ettiği gösterilmiştir (Qu ve ark., 2014). Başka bir çalışmada in vitro uygulanan PU-H71'in insan üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında (MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC-1806) hücre büyümesi ve proliferasyonundaki çeşitli anahtar mediatörlerin downregülasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca aktive Akt ve Bcl-xL degradasyonu ile apoptozu indüklediği ve Akt, ERK2, Tyk2'nin inhibisyonu ile üçlü negatif meme kanserinin invazyon potansiyelini azalttığı gösterilmiştir. Bunlara ek olarak PU-H71'in immün sistemi çöktürülmüş farelerde MDA-MB-231'in lokal gelişimini inhibe ettiği, bu tedaviye direnç gelişmediği, sağ kalımı arttırdığı ve sistemik toksisite göstermediği bildirilmiştir (Caldas-Lopes ve ark., 2009). PU-H71'in BCL6 pozitif diffüz B hücre lenfoma hücreleriyle yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda da anti-tümöral etki gösterdiği ve sistemik toksisiteye neden olmadığı gösterilmiştir (Cerchietti ve ark., 2009). PU-H71 akciğer kanseri hücre hattında RT ile kombine şekilde kullanılmış ve kanser hücrelerini radyasyona duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Segawa ve ark., 2014).

2.5. Hücre içi sinyal yolları

2.5.1. ERK 1/2

Ras-Raf-MEK-ERK (Ras-ERK yolağı veya ERK1/2 yolağı olarak da bilinir) sinyal yolağı büyüme faktörleri, sitokinler, stres gibi ekstrasellüler uyarılara yanıt olarak aktive olur. Memelilerin hücre ve dokularında hem fizyolojik hem de patolojik yanıtlara aracılık eder. Hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan transkripsiyon

faktörlerinin çoğu Ras-ERK yolağıyla aktive olur (Neuzillet ve ark., 2014). Kanser biyolojisinde iyi karakterize edilmiş kinaz kaskadlarından biridir. Büyüme faktörleri veya onkogenik kinazların aktif mutantları ile bu yolak tetiklenir. Birçok kanser tipinde Ras-ERK yolağı deregüledir ve tümör hücre farklılaşması, proliferasyon, sağkalım, migrasyon ve anjiogenezle ilişkilidir (McCubrey ve ark., 2007).

Ras-ERK yolağı küçük bir GTPaz olan Ras ile başlar. Ras aktivitesi GTP hidrolizi ile kontrol edilir. GDP bağlı formu etki göstermezken, GTP bağlı formu etkin bir enzim olarak görev yapmaktadır. Ras aktiflendiğinde bir MAP kinaz kinaz kinaz olarak bilinen Raf1'i fosforiller. Aktive olan Raf1, MAP kinaz kinaz olan MEK1/2'yi aktive eder ve sonuç olarak MEK1/2 de MAPK olan ERK1/2'yi fosforilleyerek aktive eder.

ERK1/2 kaskadı büyüme faktörleri ve sitokinlerin G-protein kapılı reseptörler, reseptör tirozin kinazlar veya bazı steroid hormon reseptörlerini tetiklemesiyle başlar. Transkripsiyonel regülatörler, apoptoz regülatörleri ve steroid hormon reseptörleri (östrojen reseptörü gibi) ERK1/2'nin substratlarıdır. ERK1/2'nin fosforilasyonu proliferasyon, farklılaşma, sağ kalım, anjiogenik, motilite ve invaziv etkilerin ortaya çıkmasında rol oynar (Whyte ve ark., 2009).

İnsan meme kanserlerinin yaklaşık %30'unda ERK1/2 yolağında mutasyonlar meydana gelmektedir. ERK1/2 sinyalinin disregülasyonu tek başına kanser gelişimine neden olmaz. Bunun yanı sıra bazı genlerde mutasyonlar ya da genlerin ekspresyon düzeylerinde değişiklikler meydana gelmesi gerekmektedir.

Meme tümörlerinin büyük bir kısmında ERK1/2 aşırı aktiftir ve downstream ERK1/2 hedefleri de hiperfosforiledir. Meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada lenf nodu (+) hastaların primer tümörlerinde lenf nodu (-) olan hastalara göre ERK1/2 aktivitesinin belirgin şekilde yüksek olduğu sonucu artmış ERK1/2 aktivitesinin metastazı etkilediği görüşünü desteklemiştir (Mueller ve ark., 2000).

2.5.2. p38

p38 bir mitojenle-aktive protein kinaz (MAPK) 'dır. Hücrel stres ve sitokinlere yanıt verdiği için stresle aktive olan MAPK olarak bilinmektedir. Fizyolojik olarak geniş bir etki alanı vardır. Özellikle TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımı için gereklidir (Gupta ve Nebreda, 2015). Kanser gelişimi açısından baktığımızda ise tümör

baskılayıcı rol oynadığı bilinmektedir. Kanserli dokularda normal dokulara göre daha az aktive olduğu bildirilmiştir.

2.5.3. Akt /PKB yolağı

PI3K/Akt yolağı, hücre siklusu, protein sentezi, metabolizma, motilite ve anjiogeneze gibi önemli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev almaktadır (Castaneda ve ark., 2010). Akt bir serin/treonin kinazdır ve anahtar hücresel süreçleri etkileyen çok sayıda downstream efektörleri ile PI3K yolağının ana mediatörüdür. Aktive olan Akt sitoplazmada hareket ederek farklı hücresel fonksiyonlarda görevli hedef proteinleri aktive eder. PI3K/Akt yolağının aktivasyonu meme kanseri hücrelerinin büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Dillon ve ark., 2007).

2.6. Anjiogenik faktörler

2.6.1. MIP-2

Makrofaj İnflamatuar Protein (MIP-2, CXCL2 olarak da bilinir) yaklaşık 6-8 kDa ağırlığında, etkin nötrofil kemoatraktan özelliği olan bir CXC kemokindir. MIP'ler ilk olarak endotoksin ile stimüle edilmiş fare makrofajlarından salgılanan ürünler olarak tanımlanmış daha sonra ise bu kemokinlerin nötrofil, fibroblast ve epitel hücreleri gibi çeşitli hücrelerden de salgılandığı bulunmuştur. İmmünregülatör ve inflammatuar etki göstermektedir (Driscoll 1994).

İnsan Interlökin-8 (IL-8, CXCL8)'in fonksiyonel karşılığı olarak kemirgenlerde bulunan MIP-2'nin yanı sıra bir de benzer etki gösteren CXCL1 (Keratinosit kaynaklı kemokin, KC) kemokini vardır. CXCL1 ile CXCL2 arasındaki aminoasit sekansları %90 benzerlik göstermektedir ve her ikisi de proinflammatuar etkilidir (Hol ve ark., 2010). Çeşitli inflammatuar hastalıklarda önemli rol oynamaktadır (Semple ve ark., 2010). MIP'ler hematopoezin düzenlenmesi ile IL-1, TNF- α ve histamin gibi inflammatuar mediatörlerin üretiminin uyarılmasında önemli rol oynarlar (Driscoll 1994). Nötrofiller enfeksiyon alanına ya da hastalıklı bölgeye ilk çağırılan hücrelerdir. Çeşitli inflammatuar mediatörler

arasında IL-8 (CXCL8), MIP-2 (CXCL2) ve KC (CXCL1) dahil CXC kemokinleri bu çağrıda en önemli mediatörlerdir.(Kobayashi 2008)

MIP-2 biyolojik etkilerini sadece CXCR2 üzerinden gösterirken IL-8 etkilerini CXCR1 ve CXCR2 olarak adlandırılan G protein kenetli iki hücre yüzey reseptörüne bağlanarak gösterir. IL-8 major proinflamatuvar sitokinlerden biridir. T lenfositleri, monositler ve eozinofiller için kemotaktik rol oynar. Dolayısıyla MIP-2 ve IL-8 fonksiyonel olarak benzer etki göstermektedir.

IL-8 anjiyenez ve inflamasyonla ilişkili bir kemokindir. Stromal hücreler ile tümör hücrelerinden salgılanır. IL-8, geç dönem tümörlerin peritümoral sıvılarında erken dönem tümörler ya da benign durumlara göre daha yüksek düzeylerde bulunmaktadır. IL-8 ve homologları inflamatuvar mediatörler olan IL-1 β ve TNF- α , IL-8 ekspresyonunu büyük oranda arttırmırlar (De Larco ve ark., 2004). Dolayısıyla IL-8 otokrin ve parakrin yolla hücre proliferasyonunu ve sağ kalımı arttırarak karsinogeneze katkıda bulunmaktadır (Todorovic-Rakovic ve Milovanovic, 2013).

CXCL1 ve CXCL2 ayrıca kemoterapiye dirençte de rol oynamaktadır. Kemoterapötik ajanlar kanser hücrelerini öldürmelerine rağmen endotel ve stromal hücrelerden salınan TNF üretiminin indüklenmesi kanser hücrelerinde CXCL1 ve CXCL2 'yi upregüle eder. Bunun gibi kemoterapi ile indüklenen bazı kemokinler kanser hücrelerinin kemoterapiye direncini etkileyerek sağkalımını arttırmaktadır (Palacios-Arreola ve ark., 2014).

IL-8 ayrıca NF- κ B'nin gen ekspresyonunu arttırarak hücre sağkalımı, anjiyenez ve invazyonda önemli rol oynamaktadır. HSP90 inhibitörleri NF- κ B ekspresyonunu down-regule ederek IL-8 üzerinde etki gösteriyor olabilir. NF- κ B, tümör hücrelerinde hücre sağkalımının artışı, kemoterapiye direnç, invaziv ve metastatik potansiyelle ilişkilidir (Caldas-Lopes ve ark., 2009). Kastrasyona dirençli prostat kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada artmış NF- κ B aktivitesi ve IL-8 ekspresyonunun PC3 hücrelerinin 17-AAG'ye duyarlılığının azalması ile korele olduğu görülmüştür. NF- κ B veya CXCR2 sinyalinin inhibisyonu PC3 hücrelerinin HSP90 inhibitörüne duyarlılığını arttırmıştır (Seaton ve ark., 2009).

2.6.2. VEGF

Anjiogenik faktörler arasında en çok üzerinde çalışılan ve vasküler sistemin farklılaşması ve gelişiminde temel rol oynayan Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)'dür. VEGF damar endotel hücrelerine özgü homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörüdür. 45 kDa ağırlığındadır. VEGF normal fizyolojik durumlarda endotel hücrelerin fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Anjiogenik süreçte endotel hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunda önemlidir (Connolly ve ark., 1989).

Endotel hücrelerine ek olarak hemopoetik kök hücrelerde, megakaryositlerde, retina öncü hücrelerinde, damar düz kas hücrelerinde ve bazı tümör hücrelerinde (küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri, nöroblastoma, meme ve mide kanserleri) bulunur (Byrne ve ark., 2005). Anjiogenezi arttırmasının yanı sıra damar geçirgenliğini de arttırmaktadır (Nicosia 1998). VEGF- α ekspresyonunu başta hipoksiyle indüklenen faktör-1 (HIF-1) olmak üzere diğer büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü α ve β , insülin benzeri büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü vs.), hipofiz hormonları, nitrik oksit, inflamatuvar sitokinler (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8) ve onkogenik mutasyonlar da düzenler (Lin ve Rosenfeld, 2007; Liu Y. ve ark., 1995; Tong ve Yao, 2006).

VEGF, tümörlerde neo-vaskülarizasyonu sağlayarak tümörün büyümesine katkıda bulunur. VEGF reseptörleri VEGFR1 ve VEGFR2 HSP90'nın hedef proteinleri arasındadır. Glioblastoma hücrelerinden yüksek oranda salınan VEGF'nin bir HSP90 inhibitörü IPI-504 tedavisiyle anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (Di ve ark., 2014). Benzer şekilde, yine bir HSP90 inhibitörü olan NVP-AUY922 ile tedavi edilen meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) VEGF ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (Terwisscha van Scheltinga ve ark., 2014).

2.6.3. SDF-1

SDF-1, birçok dokuda stromal hücreler tarafından salgılanır. SDF-1, ilk olarak kemik iliği stromal hücrelerinden klonlanmıştır. Kanser hücrelerindeki yüksek seviyelerinin ise ilk olarak 2001 yılında insan over kanserinde görüldüğü tespit edilmiştir. 2011'de

yayınlanan bir çalışmada benign ve malign epitelyal over tümörü olan hastalardan alınan dokularda SDF-1 ekspresyonuna bakılmıştır. Malign dokularda SDF-1 ekspresyonunun daha fazla olduğu gösterilmiştir (Machelon ve ark., 2011). Over kanserinin yanı sıra meme kanseri, glioblastoma, pankreas kanseri, prostat kanseri, tiroid kanseri ve diğer birçok insan tümörlerinde SDF-1 ekspresyonu gözlenmiştir. Daha sonraki çalışmalar meme kanseri ve prostat kanserinin kemik iliği ve lenf nodu metastazlarıyla SDF-1 ekspresyonu arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Kryczek ve ark., 2007).

Bu konuda kanser hücrelerinde yapılan bir çalışma olmamasına rağmen fare retinal pigment epitelyum hücrelerinde yapılan bir çalışmada hipoksi oluşmadan önce uygulanan 17-AAG tedavisiyle hipoksiyle indüklenen SDF-1 α ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Wang YQ ve ark., 2010).

2.7. HSP90'nın kanser gelişimde rol oynayan hedef proteinleri

2.7.1. HIF-1

Hipoksiyle indüklenebilir faktör 1 (HIF-1) anjiogenez, hücre sağ kalımı, glikoz metabolizması ve invazyon gibi kanser biyolojisinde önemli birçok basamakta rol oynayan genlerin transkripsiyonunu aktive eder. İntratümöral hipoksi ve genetik değişimler HIF1 α 'nın overekspresyonuna neden olabilir. Bu da birçok kanser tipinde artan mortalite ile ilişkilendirilmiştir. Preklinik çalışmalarda HIF-1 aktivitesinin inhibisyonu tümör büyümesinde belirgin etkiler oluşturmuştur (Semenza 2003).

2.7.2. HER2

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2), epidermal büyüme faktör reseptörleri ailesinin bir üyesidir ve bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. HER2 (ErbB2), ErbB3 ve ErbB4' e bağlanarak heterodimerizasyon oluşturur ve bunun sonucunda hücre içi downstream sinyal iletimini başlatır. HER2 geni hücre büyümesi, bölünmesi ve onarımının kontrolünde rol oynar (Moasser 2007). Meme kanserlerinin % 20-30 'unda gen amplifikasyonu veya protein overekspresyonu görülür. HER2 pozitif

hastaların klinik seyri daha agresif ve sağ kalım oranı daha düşüktür (Wolff ve ark., 2007).

2.7.3. N-kadherin

Kadherinler kalsiyum bağımlı transmembran reseptörlerdir. Birçok farklı organ sisteminde hücreler arasındaki kontağı ve iletişimi sağlarlar. Kanserde ise epitelyal mezenkimal geçiş sürecinde epitel hücrelerindeki kadherinler normal olarak eksprese olmaya devam ederler ya da down-regüle olurlarken mezenkimal hücrelerdeki kadherinler up-regüle olur. Bu durum metastatik kanser hücrelerinin hareketini, invazivliğini ve proliferasyonunu kolaylaştırabilir (Andrews ve ark., 2012). Geniş bir süperailmeye sahip olan kadherinlerin alt tiplerinden biri de N-kadherin'dir. N-kadherin meme bezinde mezenkimal hücrelerde ve sinir hücrelerinde eksprese edilir. Kanser hücrelerinin migrasyonunda ve tümörün invazivliğinin düzenlenmesinde rol oynarlar. İnvazyon oranı yüksek meme kanserlerinde N-kadherin ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (Hazan ve ark., 1997).

2.8. Kanser Gelişiminde Sitokinlerin Rolü

Solid tümörler içerisinde sadece tümör hücrelerini barındırmaz. Tümör hücreleri dışında malign olmayan stromal hücreler ve göç edebilen hematopoietik hücreler de vardır. Tümör mikroçevresini oluşturan bu hücreler salgıladıkları sitokinlerle tümör büyümesi, progresyon, metastaz ve anjiogenezi kontrol ederler. RT'nin lokal ve sistemik etkinliğinin (metastatik hücreler üzerindeki anti-tümöral etkisi-abiskopal etkinlik) kısmen CD8⁺T hücrelerine bağlı olduğu gösterilmiştir (Lee Y ve ark., 2009). Abiskopal etkide CD8⁺T hücreleri ile birlikte TNF, IL-1 ve IL-6 ekspresyonunun RT sonrası artmasının da önemli olduğu düşünülmektedir (Formenti ve Demaria, 2009). Kanserle ilişkili inflamasyonda rol oynayan proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörü NF-κB yolağında, HSP90'nın stabilize ettiği proteinler IKK alfa ve IKK beta da vardır. Kornea hücrelerinde yapılan bir çalışmada hafif ısı şoku etkisiyle HSP90 yoluyla inflamatuvar sitokinlerden IL-1β ve IL-6'nın arttığı gösterilmiştir, aynı zamanda ısı şokuyla oluşturulan inflamatuvar yanıtta HSP90-Akt-NF-κB sinyal yolağının önemli rolü olduğu kanısına varılmıştır (Tsai ve ark., 2013). Başka

bir çalışmada HSP90 inhibitörü 17-DMAG'ın J774 makrofaj hücrelerinde Akt ve NF- κ B yolağının baskılanmasıyla inflamasyonun azaldığı gösterilmiştir (Shimp ve ark., 2012). Kronik lenfoid lösemi hücrelerinde yapılan bir çalışmada 17-DMAG'ın HSP90 inhibisyonu ile NF- κ B yolağının aktivasyonunu engellediği bildirilmiştir (Hertlein ve ark., 2010). Ayrıca HSP90 inhibisyonunun IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ve NO (nitrik oksit) dahil inflamatuvar mediatörleri ve sitokinleri azalttığı bildirilmiştir (Chatterjee ve ark., 2007; Mandrekar ve ark., 2008; Wax ve ark., 2003).

Yeni bir HSP90 inhibitörü olan PU-H71'in inflamatuvar sitokinlere etkisine dair yapılan detaylı bir çalışma yoktur. Tümör mikroçevresinde rol oynayan proinflamatuvar sitokinlerden en bilineni TNF- α 'dır. Tümör hücrelerine toksik etki gösterdiği gibi sağ kalım, invazyon ve metastazda da rol oynamaktadır. IL-6, tümör mikroçevresindeki önemli inflamatuvar sitokinlerden biridir (Kumari ve ark., 2016). Hem immün hücreler hem de tümör hücreleri için büyüme faktörü gibi rol oynar. Hücre sağ kalımı ve tümörögenizde önemlidir. IL-10 immünsüpresif ve anti-inflamatuvar bir sitokindir. Tümör gelişiminde kompleks etkileri vardır. Bazı çalışmalarda anti-tümör etkinlik gösterirken bazı çalışmalarda ise tümörögenizi arttırabileceği gösterilmiştir (Candido ve Hagemann, 2013). IL-17 pro-inflamatuvar bir sitokindir. Tümör oluşumunda çift yönlü bir etkisi olduğundan söz edilmektedir. Birinci etkisi, tümör anjiogenezini düzenlemek ve immün denetimden tümör hücrelerinin kaçmasını sağlamaktır. İkinci etkisi ise doğal öldürücü hücreler ve sitotoksik T lenfositlerinin aktivasyonunu arttırmaktadır ve nötrofil, doğal öldürücü hücreler, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerini tümör dokusuna çağırarak anti-tümör fonksiyonlar da göstermektedir. IFN- γ bazı kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterir ve anti-anjiogenik aktiviteye sahiptir. Ayrıca diğer sitokinlerle birlikte anti-tümör aktivitenin önemli bir düzenleyicisi olabilir (Lee S ve Margolin, 2011). Çalışmamızda HSP90 inhibitörünün immünolojik etkilerini görmek için in vivo deneylerimizde farelerin aksiller lenf nodu ve dalaklarından miks lenfosit kültürü oluşturuldu ve IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α ve IFN- γ ekspresyonlarına bakıldı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre kültürü

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve İdamesi

Çalışmamızda fare meme kanseri hücre hattı 4T1 ve 4T1'in farklı organlara metastaz yapmış alt tipleri kullanılmıştır. 4T1 hücreleri, Balb-c farelerde kendiliğinden oluşan meme kanseri hücre hattıdır. 4THM hücreleri, 4T1 tümör hücreleri enjekte edilen farelerin kalp metastazlarından elde edilmiş hücrelerdir. 4TLM hücreleri, 4T1 hücreleriyle oluşturulan tümör modelinde karaciğer metastaz yapan 4T1'in alt grubudur. 4TBM ise 4THM hücreleriyle oluşturulan tümör modelinde beyine metastaz yapan hücrelerdir. 67NR ise Balb-c farelerde kendiliğinden oluşan metastatik özellik göstermeyen meme kanseri hücre hattıdır.

Hücre kültür işlemleri steril laminar hava akımlı çalışma kabininde gerçekleştirildi. Sıvı nitrojenle saklanan hücreler, 37°C su banyosunda çözöldü ve 10 mm'lik hücre kültür petrilere ekildi.

4T1, 4THM, 4TLM, 4TBM ve 67NR hücreleri, DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium) besiyerine % 5 fetal sığır serumu, 1 mM sodyum piruvat, 0.02 mM non-essential amino asit ve 40 mg/ml gentamisin eklenerek çoğaltıldı. Hücreler 37°C sıcaklıkta, % 5 CO₂ ve nem içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücre hatları canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak takip edildi. Petrilere %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözleendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.

3.1.2. Hücrelerin Sayımı

Hücrelerin sayımı için öncelikle petri zemininden ayrılmaları sağlandı. Bu işlem için, hücrelerin içinde bulunduğı petrilere besiyerleri çekilip atıldı. Üzerine 1 ml Tripsin-EDTA eklenen hücreler 1-2 dk içerisinde zeminden ayrılınca üzerlerine 1:3 oranında besiyeri ile nötralize edilip, 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. 1600 rpm'de 3 dk. santrifüjlenen hücrelerin süpernatantları atılarak dibe çöken hücre peleti 5 ml besiyeri içinde tekrar homojenize edildi. Bu süspansiyondan besiyeri ile 1:10 hücre süspansiyonu elde edildi. Hemasitometre (Thoma lamı) ile sayım yapıldı. Planlanan

hücre sayısı hesaplanarak belirlenen oranlarda hücre peleti dilüe edildi ve petrilere istenilen sayıda hücre ekimi yapıldı.

3.2. HSP90 İnhibitörlerinin Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

17-AAG (LC Labs, A-6880) 10 mg 1,7 ml DMSO (dimetil sülfoksit) içinde çözüldü. Hücre kültüründe kullanılmak üzere 50 mM'lık stok solüsyonlar halinde hazırlandı. 100 µl'lik alikotlar halinde - 20°C 'de saklandı.

İn vitro çalışmalarda kullanılan PU-H71 (Platypus Tech., A11130), 25 mg 1 ml DMSO içinde çözüldü. Deneylerde kullanılmak üzere 50 mM' lük stok solüsyonlar halinde steril koşullarda (laminar flow) hazırlanan PU-H71, 100 µl'lik alikotlar halinde - 20°C 'de saklandı.

İn vivo çalışmalarda kullanılan PU-H71 (Selleckchem, S8039), %10 DMSO içeren PBS içerisinde 75 mg/kg olacak şekilde taze olarak hazırlandı. İntraperitoneal yolla insülin enjektörü ile hayvanlara enjekte edildi.

3.3. Radyoterapi

Hücreler PU-H71 tedavisinden sonra deney protokollerine göre farklı dozlarda ışınladı. Proliferasyon ve sitokin salınımına etkilerin araştırıldığı çalışmalarda 5 ya da 10 Gy RT kullanıldı. Koloni oluşturma deneylerinde ise 2, 4, 6 ve 8 Gy ışınlama yapıldı. Tedaviler tek doz olarak verildi. Tedaviden 48-72 saat sonra hücre çoğalması WST kullanılarak belirlendi. Hücre kültürlerinin ışınlanmasında Cobalt-60 cihazı kullanıldı. 40 cm x 40 cm'lik alan boyutunda 100 cm SSD (Source Skin Distance, kaynağın cilt mesafesine uzaklığı) mesafesinde ışınlama yapıldı. 26,5 Gy/sa ışınlama dozu kullanıldı. İn vivo çalışmalarda uygulanan RT koşulları in vivo çalışmalar bölümünde açıklandı.

3.4. Hücre Kültüründe Kullanılan Hücre Canlılık Testi (WST-1 Testi)

PU-H71'in farklı konsantrasyonlarıyla (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 10 µM) 72 saat inkübasyonları sonucu hücrelerdeki sitotoksik etkileri belirlemek üzere WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche) kullanıldı. WST solüsyonu %5 FBS içeren besiyeri ile 1:10 oranında karıştırılarak hazırlandı. Kuyucuklardan süpernatantlar çekilip atıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl %10 WST içeren besiyeri eklendi. Daha sonra

96 kuyucuklu hücre kültür pleytleri 37 °C’de ve % 5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde 3 saat inkübe edildi. Üç saat sonunda 420-600 nm referans dalga boyu aralığında spektrofotometrede ölçüm yapıldı. KCjunior (BIO-TEK) programı kullanılarak hücre sayıları çıkan değerlere göre hesaplandı. Her ilacın doz etki tablosu ve eğrisi çizilerek hücrelerin % 50’sini (IC50) öldüren konsantrasyonlar GraphPad Prism 5 software programı kullanılarak oluşturuldu. Bu sonuçlara göre diğer in vitro çalışmalarda kullanılacak konsantrasyonlara karar verildi.

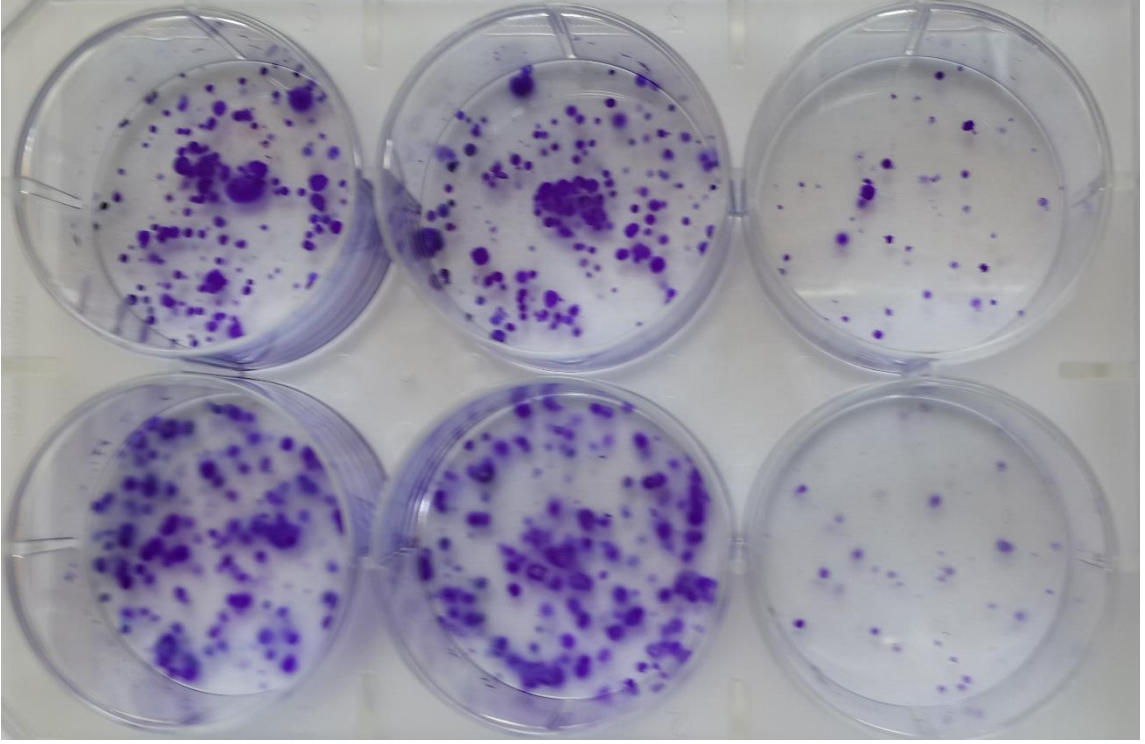
3.4.1. Hücre sayısını belirlemek için standart hazırlanması

Hücre kültürü pleytinden besi yeri uzaklaştırılarak üzerine 1 ml Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi, Hücrelerin pleyt yüzeyinden kaldırıldı ve Tripsin-EDTA’nın etkisini etkisizleştirmek için taze besi yeri eklendi. Thoma lamında hücreler sayıldıktan sonra ilk standart 120.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu pleyte ekildi. Her bir kuyucukta bir öncekinin yarısı kadar hücre olacak şekilde hücreler dilue edilerek ekildi. Hücreler 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda her bir kuyucuğa %5 FBS’li besiyeri ile hazırlanan %10’ luk WST-1 100 µl eklendi. 3 saat inkübasyon sonrasında spektrofotometrede 420-600 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Elde edilen değerler KCjunior programı kullanılarak hesaplandı. Bu işlem kullanılan her bir hücre hattı için yapıldı.

3.5. Koloni Oluşturma Deneyi

PU-H71’in meme kanseri hücre hatlarında RT’ye duyarlılığı değiştirip değiştirmediğini belirlemek amacıyla 6 kuyucuklu pleytlere 300 hücre/kuyucuk şeklinde ekim yapıldı. Hücreler pleyt tabanına bağlandıktan sonra (yaklaşık 6 saatte gerçekleşti) PU-H71 0,1 ve 0,01 µM dozlarda hücrelere uygulandı. 24 saat sonra 2, 4, 6, 8 Gy tek doz RT uygulandı. RT sonrasında tüm kuyucuklardaki besi yerleri taze siyle değiştirildi. Yaklaşık 12-14 gün sonunda hücrelerin üzerindeki süpernatant çekilip atıldı ve 1x PBS ile yıkama yapıldı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra metanol:asetik asit (3:1) solüsyonu ile hücreler fiksle edilmek için 5 dk inkübe edildi. % 0.5 kristal violet (metanol içerisinde) boyası ile damla damla, yüzeyi kaplayacak şekilde koloniler boyandı. 15 dakikalık inkübasyondan sonra kuyucuklar su ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı (Şekil 6).

Kolonilerin fotoğrafları çekildi ve bilgisayarda fotoğraflar üzerinden işaretlenerek koloniler sayıldı, sağkalım fraksiyonu hesaplandı (Franken ve ark., 2006).



Şekil 6 : Koloni oluşturma deneyinde oluşan kolonilerin görüntüsü.

3.6. Western Blot Yöntemi

Hücre kültüründe PU-H71 ve RT'nin tek başına veya birlikte kullanımının, hücre içi sinyal yollarında rol oynayan proteinlerden ERK1/2, p38, Akt'nin fosforilasyonuna etkisi Western Blot Yöntemi ile incelendi. Ayrıca uygulanan tedavilerin intrasellüler HSP90 ve HSP70 ekspresyonu üzerine etkileri yine bu yöntemle belirlendi. PU-H71'in tek başına veya RT ile kombine uygulamasının HSP90'nın hedef proteinlerinden HER2 ve N-kadherin ekspresyonuna etkileri de Western Blot yöntemi kullanılarak incelendi.

3.6.1. Hücre Lizatı Hazırlanması

Triton-X Lizis Tamponu

100mM Sodyum Florür (NaF-Sigma S7920), 50mM HEPES (Sigma H3375), 150mM Sodyum Klorür (NaCl- Merck1.06404.1000), %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2

Triton-X100 (Merck 1.08603.1000), 1mM Magnezyum Klorür ($MgCl_2$ -Sigma M8266), 1mM EGTA (Amresco 0732), 1mM Sodyum-o-vanadat (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche) karıştırılarak hazırlandı. Solüsyonun pH'sı 7,4 (pH metre:Hanna Instruments pH 211)' e ayarlandı.

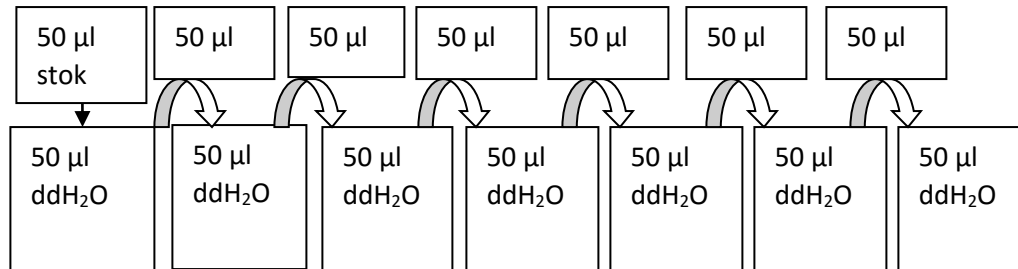
Örneklerin hazırlanması

Besi ortamı uzaklaştırılarak, hücreler soğuk 1x PBS ile yıkandıktan sonra 6 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğuna 300 µl Triton-X Lizis tamponu konarak hücreler pipetajla kaldırıldı ve steril 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alındı. Buz içinde 30 dk tutulan örnekler 1 dk. vortekslendikten sonra 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant lizat olarak steril bir ependorf tüpe transfer edildi. Örnekler kullanılana kadar $-80^{\circ}C$ 'de saklandı.

Doku lizatları hazırlanırken ise ötanazi edilen hayvanların primer tümör dokularından alınan parçalar ependorf tüplerde sıvı nitrojene atıldı ve sonrasında $-80^{\circ}C$ 'de saklandı. Lizat hazırlanacağı zaman buza alınan örnekler tartıldı ve 0,1 gr dokuya 900 µl lizis tamponu eklendi. Bir makas yardımıyla dokular küçük parçalara ayrıldı ve sonrasında sonikasyon yapıldı (Bandelin Sonopuls 2070). Örnekler $+4^{\circ}C$ 'de 10.000 rpm'de 20 dk santrifüj edildikten sonra ependorf tüpün üzerindeki süpernatant temiz bir ependorf tüpe alındı ve HIF-1 α ELISA yönteminde bu lizatlar kullanıldı.

3.6.2. Örneklerdeki Protein Miktarının Belirlenmesi

Hem hücre kültüründen elde edilen hem de hayvanlardan alınan primer tümörlerden elde edilen lizatlardan eşit miktarda yüklenebilmesi için protein miktar tayini yapılmıştır.



Şekil 7: Protein assay standart hazırlama yöntemi

-Stok Standart 2,66mg/ml

-5X protein assay boyası (Bio-Rad Protein assay Dye Reagent Contrate Cat.No.500-0006) ddH₂O eklenerek 1X'e dilüe edilir.

-Örneklerden 5µl alınarak 95µl ddH₂O ile dilüe edilir. Ependorf tüpte hazırlanan bu dilüsyonlardan 5µl ve 10 µl alınarak 96 kuyucuklu pleyte konur ve 1X Dye ile 170 µl' ye tamamlanır.

-96 kuyucuklu pleytin bir sırasına ise 40 µl standartlar yüklenir ve 170 µl' ye 1X Dye ile tamamlanır.

-Yarım saat karanlıkta oda ısısında bekletilir.

-Spektrofotometre cihazında 595 nm'de okunur.

-Örneklerdeki protein miktarları KCjunior programı kullanılarak hesaplandı. Çıkan protein miktarlarına göre örneklerden ne kadar kullanılacağı hesaplandı.

3.6.3. Western Blot Protokolü

Western Blot yönteminde kullandığımız solüsyonlar:

1. Resolving Buffer:

1,5 M Tris Base pH: 8.8

1 lt.'si için 181,64 gr Tris base tartılır ve distile suda çözülür.

2. Stacking Buffer:

0,5 M TrisBase pH:6,8

1 lt si için 60,5 gr Tris base tartılır ve distile suda çözülür.

3. 10x Running Buffer:

15 gr. Tris Base + 94 gr. Glisin + 50 ml %10 SDS karışımı 1'lt ye distile su ile tamamlanır. Solüsyon pH ayarı gerektirmemektedir.

4. 10x TBS:

Tris base 24,2 gr + NaCl 80gr + 800 ml ddH2O çözündürülür. pH: 7,6'ya ayarlanır. 1lt'ye kadar ddH2O koyulur.

1x TBST; 1 lt 1x TBS'ye 1ml Tween 20 eklenerek elde edilir.

5. 2x SDS Loading Dye:

20ml ddH2O + 20ml stacking buffer +20ml %10 SDS + 40ml gliserol +6 mg bromofenol blue karıştırılır ve her birinde 950ul olacak şekilde ependorf tüplere bölünür -80°C'ye kaldırılır, kullanılacağı zaman 50µl β-merkaptoetanol eklenir.

6. %10 APS:

Taze hazırlanmalıdır. 0,1 gr APS 1 ml ddH20'da çözülür.

7. Transfer Buffer:

3,75gr glisin + 7,25gr Tris Base 1 lt distile suda çözülür. Karışıma 250 ml metanol eklenir. Solüsyon +4°C 'de saklanmalıdır.

8. Akrilamid/Bisakrilamid:

29:08 oranında karıştırılarak hazırlanır.

9. Commasive Blue :

200ml asetik asit + 1800ml H₂O + 0,5 gr comassie blue, 1 saat karıştırılır, filtreden geçirilir.

Örneklerin hazırlanması

Buzda çalışılır. Örneklerden belirlenen miktarda alınır, örnek miktarının yarısı kadar 2x SDS-β-merkaptoetanol (loading dye) eklenir. Vortekslenir ve 95°C'de 4 dk kaynatıldıktan sonra kısa bir santrifüj yapılır ve örnekler jele yüklenir.

Örneklerin Jele Yüklenmesi

Tablo 1'deki oranlara göre istenilen yoğunlukta jel dökülür.

Jelin ilk kuyusuna büyük jelde 10 µl, küçük jelde 5 µl protein ladder, eğer boş kalıyorsa son kuyusuna 20 µl loading dye yüklenir. (bantların kaymaması için)

Örnekler, öncelikle büyük jel için 120 Volt (küçük jelde 40 Volt) , stackingi geçince büyük jelde 150 Volt'da (küçük jelde 70 Volt) yürütülür.

Örnekler yürütüldükten sonra, jelin soğuması için cam hafif akan suyun altına birkaç dakika bırakılır.

Jelin Hazırlanması

Resolving	%7	%10	%12	%15	Stacking	5ml' lik	10ml'lik
Su	10ml	7.7ml	7ml	4.7ml	Su	3ml	6ml
Resolving Buffer	5ml	5ml	5ml	5ml	Stacking Buffer	1.25ml	2,5ml
Acr(29:08)	4.7ml	7ml	8ml	10ml	Acr(29:08)	0,625ml	1,25ml
%10SDS	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml	%10SDS	50µl	100µl
%10 APS	0.2ml	0.2ml	0.2ml	0.2ml	%10 APS	50µl	100µl
Temed	20µl	20µl	20µl	20µl	Temed	5µl	10µl
Toplam	20ml	20ml	20ml	20ml			

Resolving jelin düz olması için üzerine %1'lik SDS hazırlanır.

Büyük jel Dökülüyorsa

Resolving	%7	%10	%12	%15	Stacking	5ml' lik	10ml'lik
Su	15ml	11,55ml	10,5ml	7.05ml	Su	3ml	6ml
Resolving Buffer	7,5ml	7,5ml	7,5ml	7,5ml	Stacking Buffer	1.25ml	2,5ml
Acr(29:08)	7,05ml	10,5ml	12ml	15ml	Acr(29:08)	0,625ml	1,25ml
%10SDS	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	%10SDS	50µl	100µl
%10 APS	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	%10 APS	50µl	100µl
Temed	30µl	30µl	30µl	30µl	Temed	5µl	10µl
Toplam	30ml	30ml	30ml	30ml			

Tablo 1: Poliakrilamid jelin hazırlanması

Transfer Aşaması

Jel kullanılacağı kısımlardan kesilir ve transfer buffer içinde bırakılır. (1-2 dak)
Sandwich hazırlanırken, süngerler ve whatman kağıtları transfer bufferda ıslatılır.
Membran methanolde 1dk ıslatılır. Ve sırasıyla;

Siyah yüzey -sünger- whatman kâğıdı (2 kat) –**Jel –Membran**-whatman kâğıdı (2 kat) -
sünger-beyaz yüzey şeklinde sandviç hazırlanır.

Tabakalar arasında hava kabarcığı kalmaması için her aşamada cam tüp tabakaların
üzerinde gezdirilir.

Sandviç kapatılır ve sandviğin siyah yüzeyi tankın siyah tarafına gelecek şekilde cihaza
yerleştirilir.

Transfer buffer eklenir ve tankın kapağı kırmızı kutup kırmızıya siyah kutup siyaha
gelecek şekilde kapatılır.

Buz içerisinde gece boyu 40 Volt'ta transfer işlemi gerçekleştirilir.

Boyama, Bloklama ve Blotlama

Transfer sonucunda sandviç siyah tarafından açılır. Kurutma kâğıdıyla beraber jel
membran üzerinden alınır.

Membranın transfer yapılan kısmı işaretlenir. (Membranın jele bakan yüzeyi)

Membran methanolde 1 dk kadar fikse edilir. (Membran kesinlikle kurutulmamalıdır)

Transfer kontrol işlemi için membran pons ile (3 dk), jel ise commasive boyası (10 dk)
ile boyanır ve protein bantları görünür hale gelir. Boyalar solunmamalıdır, bu yüzden
kapaklı kaplar kullanılır.

Boyama işlemi sonrasında membran 1x TBS-T ile , jel ise destain ile yıkanır.

Bloklama

TBST'de %5 süt tozu hazırlanır. Bloklama solüsyonu olarak kullanılır. Membran bu
solüsyonda 2 saat shakerda inkübasyona bırakılır.

Blotlama

- TBS-T ile % 1 BSA hazırlanır.
- Belirlenen primer & sekonder antikör dilüsyonu, 1xTBS-T 'de çözünmüş %1 BSA solüsyonu ile hazırlanır- vorteks yapılır.
- Primer antikorda; oda ısısında 2 sa ya da gece boyu ise +4°C de rotator üzerinde inkübe edilir.

Yıkama

1x TBS-T ile 10 dk. shakerda yıkanır. Bu işlem 3 kez tekrarlanır.

- Membran sekonder antikör ile 2 sa oda ısısında shakerda inkübe edilir.

Yıkama

1x TBS-T ile 10 dk. Shakerda yıkanır. Bu işlem 3 kez uygulanır.

Görüntüleme

Eski bir film üzerine membran yerleştirilir. (jele bakan yüzeyi yukarıda olacak şekilde)

Üzerine ECL (Electrochemiluminescence) gezdirilir ve 5 dk beklenir. 5 dk sonra fazla solüsyon süzdürülerek atılır. Membran kasetteki şeffaf dosya arasına alınır, karanlıkta kaset içine film koyularak ışımaya göre bekleme süresi belirlenir. Yakalanan bantlar film banyosu yapılarak görünür hale getirilir.

3.7. Ex vivo kültür çalışması

Balb-c cinsi farelere kültürde çoğaltılan 4TLM hücreleri Hank's Solüsyonu'nda 0,1 ml içinde 100.000 hücre/fare olacak şekilde sağ üst ikinci meme dokusuna enjekte edilerek ortotopik kanser modeli oluşturuldu. Tümör hücre enjeksiyonundan 15-20 gün sonra nekropsi yapıldı. Farenden çıkartılan tümör dokuları kültür besisi yerine alındı. Besi yerinde makasla küçük parçalara ayrılan dokular taze besisi yeri ile kültür petrilere ekildi. Hücreler %80 doluluk oranına ulaştığında primer tümör eksplantlarına 0,01 µM dozunda PU-H71 ve 5 Gy RT uygulandı. Tedavilerden 48 saat sonra primer tümör eksplantlarının süpernatantları toplandı ve IL-6, VEGF ve MIP-2 düzeylerine ELISA yöntemiyle bakıldı.

3.8. İn vivo çalışmalar

4T1 ve alt tipleri ile oluşturulan metastatik meme kanseri modeli insan metastatik meme kanserini taklit etmektedir. Bu nedenle hücre kültürü deneylerimizde HSP90 inhibitörü PU-H71'e iyi yanıt aldığımız 4TBM hücreleri ile ortotopik meme kanseri modeli oluşturuldu. Bu model uygulama sonrası sistemik metastazlar oluşturuyor olması ile de evre 4 metastatik meme kanseri için iyi bir model oluşturmaktadır.

Deney Hayvanları: Çalışmada 6-8 haftalık dişi Balb-c cinsi fareler kullanıldı. Fareler KOBAY firmasından (Ankara) temin edildi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Ünitesi'ne getirtilip deneye kadar ve deneyler süresince bakımları burada sağlandı.

İn-vivo tümör oluşturulması: Balb-c cinsi farelere kültürde çoğaltılan 4TBM hücreleri Hank's Solüsyonu'nda 0,1 ml içinde sağ üst ikinci meme dokusuna enjekte edilerek ortotopik kanser modeli oluşturuldu. 4TBM hücreleri 100.000 hücre/fare olarak meme dokusuna uygulandı. Bu farelerde 1 ay içinde sistemik metastazlar oluşmaktadır. Çalışmada oluşturulan deney grupları:

1. Kontrol n= 12
2. PU-H71 n=12
3. PU-H71 + RT n=12
4. RT n=12

Tümör büyümesinin takibi: PU-H71'in ve RT kombine uygulamasının tümör büyüme hızına etkisini görmek için tümör enjeksiyonundan 1 hafta sonra tedavi süresince haftada 2-3 kez tümör boyutları kumpas yardımıyla ölçüldü. Tedavi sonunda ölçülen değerler $V=LW^2/2$ formülü ile hesaplanarak tümör hacmi belirlendi.

V= tümör hacmi

L= tümörün boyu

W= tümörün genişliği

3.8.1. Tedavilerin uygulanması

PU-H71 tedavisi: Çalışmada daha önce yapılan hayvan çalışmalarında ciddi yan etki göstermeyen HSP90 inhibitörü PU-H71 kullanıldı. Literatürde yer alan bilgilere göre farelerde toksisite oluşturmada etkili görünen dozlar göz önüne alındı (Caldas-Lopes ve ark., 2009). PU-H71, 75 mg/kg i.p. haftada 3 kez olacak şekilde uygulandı. Tedavilere tümör enjeksiyonundan dört gün sonra başlandı ve deneyin sonlanma tarihinden iki gün önce bitirildi. Kontrol ve RT gruplarına da eş zamanlı olarak tedavi gruplarıyla aynı miktarda i.p. %10 DMSO içeren 1x PBS enjeksiyonu yapıldı.

Lokal RT uygulaması: Farelerde lokal RT uygulamasıyla ilgili daha önce yaptığımız çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmalardan biri yayınlandı (Erin ve ark., 2015). Hayvanlara RT öncesi ketamin/xylazin anestezisi uygulandı. Anestezi altındayken bacaklarından ve kuyruklarından zemine flasterle yapıştırıldı. Hayvanların sağ üst meme dokusunun 1,5 cm² cilt bölgesi (enjeksiyonun yapıldığı yer) 0,5 cm kalınlığında bolus materyali kullanılarak ışınladı. RT uygulaması Elekta Synergy LINAC tedavi cihazı kullanılarak 4 MV enerji ile 75 cm (SSD) mesafeden verildi. Radyasyon doz hızı 400 cGy/dk olarak hesaplandı. RT, tümör hücresi enjeksiyonundan 6 gün sonra 18 Gy dozunda belirtilen koşullarda uygulandı.

Metastaz düzeyindeki değişikliklerin belirlenmesi: Çalışmada kullanılan fare meme kanseri modelinde kontrol grubunda fareler tümör hücrelerinin enjeksiyonundan yaklaşık 25-30 gün içinde ölmektedir. Bu nedenle, eş zamanlı metastazdaki değişimi belirleyebilmek için, tümör enjeksiyonundan sonraki 28. günde akciğer metastazlarını belirlemek için dokular çıkartıldı. Akciğerler 1x PBS ile yıkanıp Bouin solüsyonuna alındı. Akciğerler Bouin fiksatifinde bekletildiğinde metastatik lezyonlar beyaz nodüller şeklinde görünür hale gelmektedir (Erin ve ark., 2004). Bu nodüller sayılarak makroskopik metastaz indeksi çıkartıldı.

3.8.2. Miks lökosit kültürü

Tümör oluşturulmuş fareler sakrifiye edildikten sonra dalak ve aksiler lenf nodları çıkartıldı ve besi yerine alındı. Laminar kabinde dalak ve lenf nodları ezilip filtreden (mesh'ten) geçirilerek tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Sayılan hücreler

kuyucukta 3-4 milyon hücre olacak şekilde 48 kuyucuklu pleytlere ekildi. Her örnek için 2 farenin dokusu birleştirildi ve her çalışma grubundan 6 fare ile toplam 3 örnek hazırlandı. TNF- α ölçümü uyarımlardan (LPS, Con-A ya da ışınlanmış 4TBM hücreleri) 20 saat sonra toplanan süpernatantlardan yapıldı. Diğer sitokinler (IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-17) için uyarımdan 40 saat sonraki süpernatantlar kullanıldı.

3.9. ELISA Yöntemi

Hücreler 24 kuyucuklu pleytlere 7000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi, tedaviler % 5 FBS içeren besi yerinde 48 saat sonra uygulandı. 24 saat sonra 10 Gy RT verildi. 48 saat sonra ise süpernatantlar toplandı. Daha sonra bu süpernatantlardan MIP-2, SDF-1 ve VEGF düzeylerine ELISA yöntemiyle bakıldı. Eş zamanlı olarak hücre sayısındaki değişiklikler de WST-1 kiti ile belirlendi. ELISA sonuçları hücre sayılarına eşlenerek grafikler oluşturuldu.

Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate Buffer Saline, PBS): 8 g NaCl (Sigma), 0,2 g KCl (Sigma), 1,44 g NaH₂PO₄ (Sigma), ve 0,24 g KH₂PO₄ (Sigma) tartılarak, 800 ml distile su içinde çözüldü. pH 7.4' e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon steril kabinde 0,22 μ m vakumlu filtreden geçirildi.

3.9.1. Fare MIP-2 ELISA (Antigenix America, RMF431CK)

Solüsyonların hazırlanması

Capture Ab: Kit içindeki 50 μ g capture antikör içine 500 μ l ddH₂O eklendi (0,1 μ g/ml).

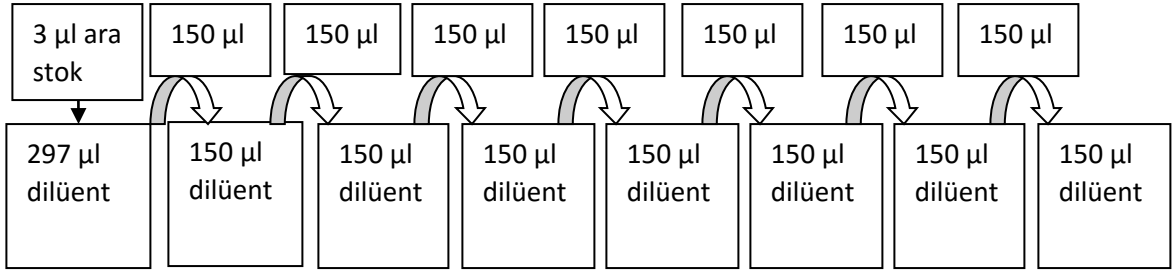
Alikotlandı, -20°C'de saklandı. (1ml PBS + 1 μ l capture Ab)

Tracer Ab: Kit içindeki 25 μ g tracer antikör içine 500 μ l ddH₂O eklendi. Alikotlandı,

-20°C'de saklandı. (1ml dilüent + 1 μ l tracer Ab)

Standart: Kit içindeki standart içine 50 μ l ddH₂O eklendi (ana stok, 20000 ng/ml). 100 kez sulandırılıp ara stok (200 ng/ml) yapıldı (5 μ l ana stok+500 μ l ddH₂O).

1. standart : 2000 pg/ml ile başlar.



Şekil 8: Fare MIP-2 ELISA standart hazırlama yöntemi

Dilüent: PBS içinde %0,2 Tween20 + %5 FBS

Bloklama solüsyonu: PBS içinde %5 FBS

Yıkama solüsyonu: PBS içinde %0,05 Tween20

HRP: Dilüent ile 1:1000 oranında hazırlandı.

Substrat: TMB A ve B 1:1 oranında karıştırıldı ve ışıktan korundu.

Durdurma solüsyonu: 2N H₂SO₄

Protokolün uygulanması

-Yukarıda belirtildiği şekilde (0,625 µg/ml) Capture Antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, pleytin üzeri kapatıldı.

- Gece boyu oda ısısında inkübe edildi.

- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.

- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300µl dağıtıldı.

- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.

- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.

- Standart ve örnekler 100µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.

- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.

- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.

- 0,3 µg/ml oranında hazırlanan detection (tracer)100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.

- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- HRP 100 µl yüklendi.
- 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 30 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 100 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-650 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.9.2. Fare CXCL12/SDF-1 ELISA (R&D, DY460)

Solüsyonların hazırlanması

Capture Ab: Kit içindeki 360µg/ml capture antikor içine 1 ml PBS eklendi (0,1µg/ml).

Alikotlandı, -80 °C’de saklandı. (1ml PBS + 0,8 µl capture Ab)

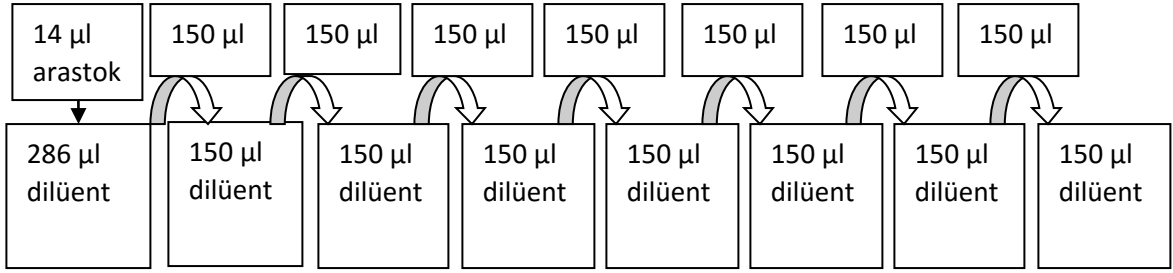
Tracer Ab: Kit içindeki 72µg/ml tracer antikor içine 1 ml dilüent eklendi. Alikotlandı,

-80 °C’de saklandı. (1ml dilüent + 0,8 µl tracer Ab)

Standart: Kit içindeki 130ng/ml standart içine 500 µL ddH₂O veya dilüent eklendi.

Alikotlandı, -80 °C’de saklandı.

1. standart: 6000 pg/ml ile başlar.



Şekil 9: Fare SDF-1 ELISA standart hazırlama yöntemi

Dilüent: PBS içinde %1 BSA

Bloklama solüsyonu: PBS içinde %5 FBS

Yıkama solüsyonu: PBS içinde %0,05 Tween20

HRP: Dilüent ile 1:200 oranında hazırlandı.

Substrat: TMB A ve B 1:1 oranında karıştırıldı ve ışıktan korundu.

Durdurma solüsyonu: 2N H₂SO₄

Protokolün uygulanması

- Yukarıda belirtildiği şekilde (2 µg/ml) Capture Antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, pleytin üzeri kapatıldı.
- Gece boyu oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300µl dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- 400 ng/ml oranında hazırlanan detection (tracer) 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.

- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- HRP 100 µl yüklendi.
- 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 20 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.9.3. Fare VEGF ELISA (Peprotech, 900-K99)

Solüsyonların hazırlanması

Bloklama solüsyonu: PBS içinde %5 FBS

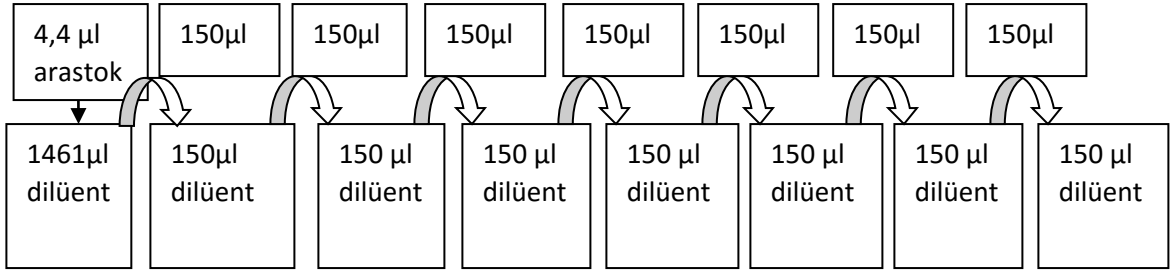
Yıkama solüsyonu: PBS içinde %0,05 Tween20

Dilüent: PBS içinde %0,05 Tween20 + %0,1 BSA

Substrat: ABTS

Durdurma solüsyonu: 0,1M Sitrik asit

1.Standart: 3000 pg/ml



Şekil 10: Fare VEGF ELISA standart hazırlama yöntemi

Protokolün uygulanması

- 11 ml PBS'te 25 µl Capture Antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, pleytin üzeri kapatıldı.
- Gece boyu oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300 µl dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- 11 ml dilüente 12,5 µl detection (tracer) eklendi ve her bir kuyucuğa 100 µl dağıtıldı.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- 11ml dilüente 3,7 µl HRP eklendi ve 100 µl her bir kuyucuğa yüklendi.
- 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- ABTS Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.

- 20 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 415 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.9.4. Fare TNF- α ELISA (eBioscience, 88-7324-88)

Solüsyonların hazırlanması

Coating Buffer: 1 paket coating buffer tozu + 1lt ddH₂O

Capture Ab: 1/250 dilüsyon, 12ml coating buffer + 48µl capture Ab

Detection Ab: 1/250 dilüsyon, 12ml dilüent + 48µl detection Ab

Wash Buffer: PBS içinde %0,05 Tween20

Blocking buffer: 5X assay dilüent 1X assay dilüent haline getirildi.

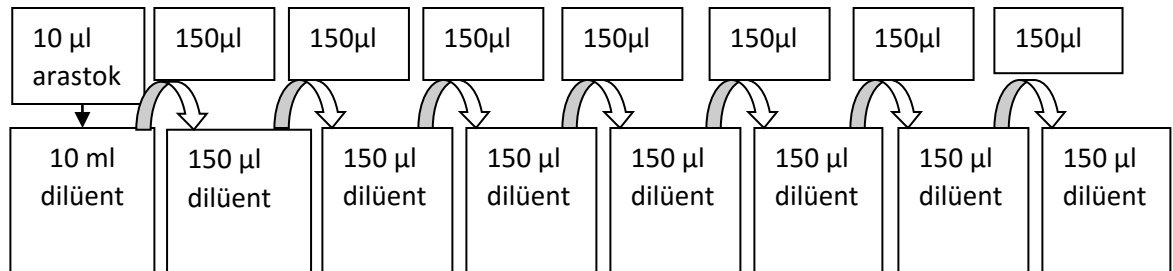
Assay Dilüent: 5X assay dilüent 1X assay dilüent haline getirildi.

Enzyme, Avidin HRP: 1/250 dilüsyon, 12 ml assay dilüent + 48ul HRP

Substrat: TMB

Durdurma Solüsyonu: 2N H₂SO₄

1. Standart: 1000 pg/ml



Şekil 11: Fare TNF- α ELISA standart hazırlama yöntemi

Protokolün uygulanması

- Yukarıda belirtilen dilüsyonda Capture Antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, pleytin üzeri kapatıldı.
- Gece boyu +4°C inkübe edildi.
- 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300 µl dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Belirtilen dilüsyonda hazırlanan detection (tracer) 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- HRP 100 µl yüklendi.
- 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 7 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 15 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-570 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.9.5. Fare IL-6 ELISA (Biolegend, 431303)

Solüsyonların hazırlanması

Coating Buffer: 0,1 M Sodium Carbonate,

7,13 gr NaHCO_3 , 1,59 gr Na_2CO_3 ; 1 litre suyla tamamlanır. ; pH 9,5 olacak şekilde ayarlanır. 2-8 °C saklanır.

Capture Ab: Coating buffer içinde 1/400 dilüsyonda hazırlandı

Detection Ab: Assay dilüent içinde 1/400 dilüsyonda hazırlandı

Enzyme, Avidin HRP: Detection solüsyonunun içinde 1/1000 dilüsyonda hazırlandı

Wash Buffer: PBS içinde %0,05 Tween20

Blocking buffer: PBS içinde %10 FBS

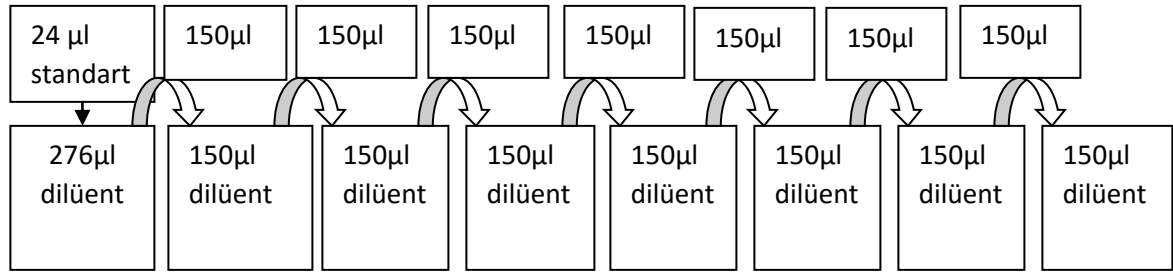
Assay Dilüent: PBS içinde %10 FBS

Substrat: TMB

Durdurma Solüsyonu: 2N H_2SO_4

Standart: stok standart 1 ml dd H_2O ile sulandırılır.

1. standart =2000pg/ml



Şekil 12: Fare IL-6 ELISA standart hazırlama yöntemi

Protokolün uygulanması

- Yukarıda belirtilen dilüsyonda Capture Antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, pleytin üzeri kapatıldı.
- Gece boyu +4°C inkübe edildi.
- 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.

- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300 µl dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Belirtilen dilüsyonda hazırlanan detection (tracer)+ HRP 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 7 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 30 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-570 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.9.6. Fare IL-10 ELISA (Biolegend, 431403)

Solüsyonların hazırlanması

Coating Buffer: 0,2 M Sodyum Fosfat, pH: 6,5

11,8g Na₂HPO₄, 16,1g NaH₂PO₄, 1L ddH₂O

Capture Ab: Coating buffer içinde 1/500 dilüsyonda

Detection Ab: Assay dilüent içinde 1/500 dilüsyonda

Avidin HRP: Assay dilüent içinde 1/1000 dilüsyonda hazırlandı

Wash Buffer: PBS içinde % 0,05 Tween20

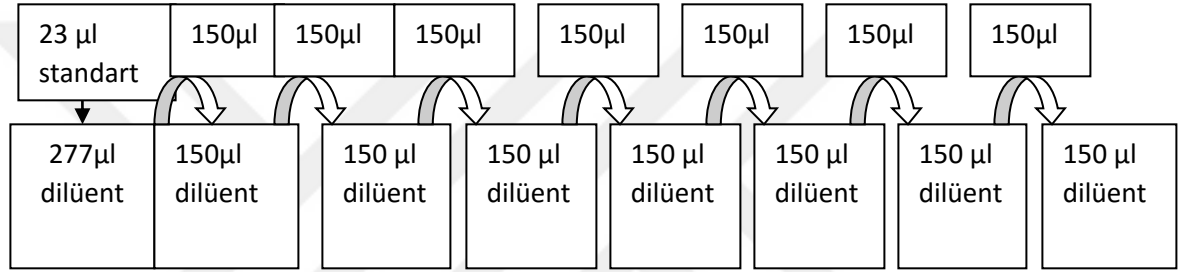
Blocking buffer: PBS içinde %10 FBS

Assay Dilüent: PBS içinde %10 FBS

Substrat: TMB

Durdurma Solüsyonu: 2N H₂SO₄

Standart: STD.tüpü 200ul assay dilüent ile sulandırılır. std1=2000pg/ml



Şekil 13: Fare IL-10 ELISA standart hazırlama yöntemi

Protokolün uygulanması

- Yukarıda belirtilen dilüsyonda Capture Antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, pleytin üzeri kapatıldı.
- Gece boyu +4°C inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300 µl dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Belirtilen dilüsyonda hazırlanan detection (tracer) 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.

- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- HRP 100 µl yüklendi.
- 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 30 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 100 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-570 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.9.7. Fare IL-17 ELISA (Biolegend, 432503)

Solüsyonların hazırlanması

Coating Buffer: 1X coating buffer (5X coating buffer ddH₂O ile 1X yapılır.)

Capture Ab: Coating buffer içinde 1/560 dilüsyonda

Detection Ab: Assay dilüent içinde 1/560 dilüsyonda

Avidin HRP: Assay dilüent içinde 1/1000 dilüsyonda hazırlandı

Wash Buffer: PBS içinde %0,05 Tween20

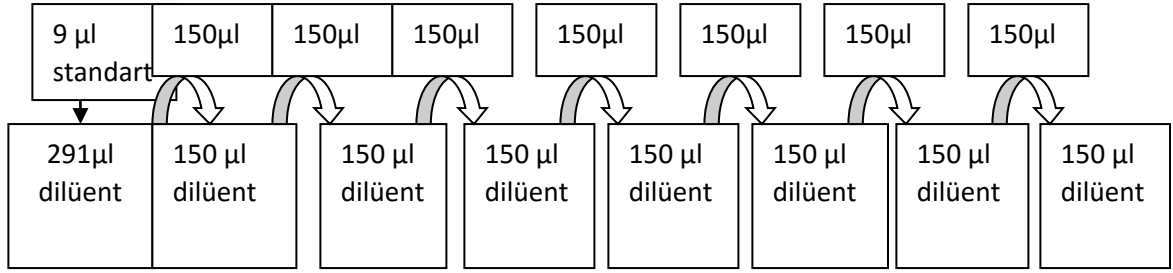
Blocking buffer: PBS içinde %5 FBS

Assay Dilüent: PBS içinde %5 FBS

Substrat: TMB

Durdurma Solüsyonu: 2N H₂SO₄

Standart: STD.tüpü 200ul assay dilüent ile sulandırılır. std1=1000pg/ml



Şekil 14: Fare IL-17 ELISA standart hazırlama yöntemi

Protokolün uygulanması

- Yukarıda belirtilen dilüsyonda Capture Antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, pleytin üzeri kapatıldı.
- Gece boyu +4°C inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300 µl dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Belirtilen dilüsyonda hazırlanan detection (tracer) 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- HRP 100 µl yüklendi.
- 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.

- 30 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 100 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-570 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.9.8. Fare IFN- γ ELISA (Biolegend, 430803)

Solüsyonların hazırlanması

Coating Buffer: 8,4 gr NaHCO₃, 3,56 gr Na₂CO₃; to 1 lt; pH: 9,5

Capture Ab: Coating buffer içinde 1/500 dilüsyonda

Detection Ab: İçinde 1/500 dilüsyonda

Avidin HRP: Assay dilüent içinde 1/1000 dilüsyonda hazırlandı

Wash Buffer: PBS içinde %0,05 Tween20

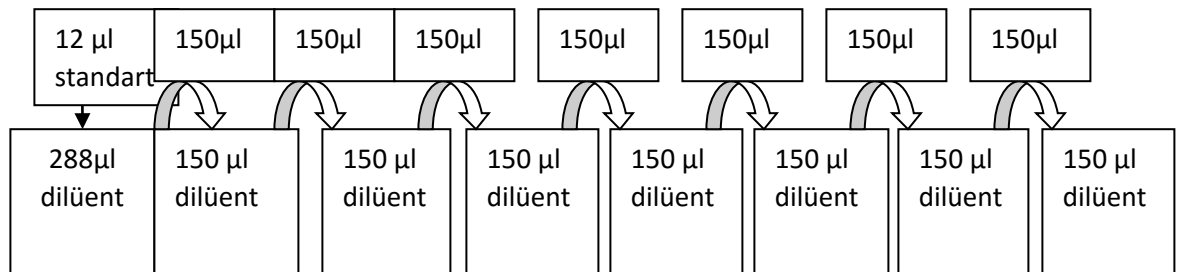
Blocking buffer: PBS içinde %10 FBS

Assay Dilüent: PBS içinde %10 FBS

Substrat: TMB

Durdurma Solüsyonu: 2N H₂SO₄

Standart: STD.tüpü 200ul assay dilüent ile sulandırılır. std1=1000pg/ml



Şekil 15: Fare IFN- γ ELISA standart hazırlama yöntemi

Protokolün uygulanması

- Yukarıda belirtilen dilüsyonda Capture Antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde dağıtıldı, pleytin üzeri kapatıldı.
- Gece boyu +4°C inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300 µl dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Belirtilen dilüsyonda hazırlanan detection (tracer) 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- HRP 100 µl yüklendi.
- 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 30 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 100 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 450-570 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.9.9. İnsan / Fare Total HIF-1 α ELISA (R&D, DYC1935E)

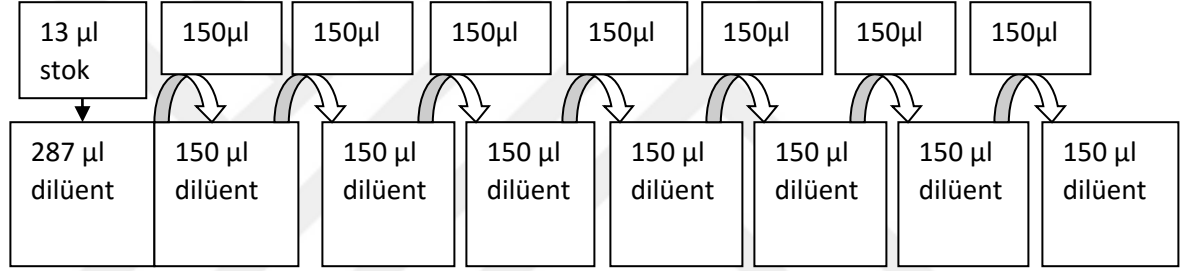
Solüsyonların hazırlanması

Capture Ab: Kit içindeki 720 μ g/ml capture antikor içine 200 μ l PBS eklendi. Alikotlandı, -80 °C’de saklandı. (1ml PBS + 1 μ l capture Ab)

Detection Ab: Kit içindeki 3.6 μ g/ml detection antikor içine 1000 μ l reagent dilüent eklendi, alikotlandı, -80 °C’de saklandı. (1ml dilüent + 8.3 μ l detection Ab)

Standart: Kit içindeki standart içine 500 μ l reagent dilüent eklendi.

1. standart : 8000 pg/ml



Şekil 16: İnsan / Fare Total HIF-1 α ELISA standart hazırlama yöntemi

Reagent Dilüent: yıkama solüsyonu içinde %5 BSA

Blocking buffer: yıkama solüsyonu içinde %5 BSA

Wash Buffer: PBS içinde %0,05 Tween20

Streptavidin HRP: 1:1000 oranında hazırlandı.

Substrat: TMB A ve B 1:1 oranında karıştırıldı ve ışıktan korundu.

Durdurma Solüsyonu: 2N H₂SO₄

Protokolün uygulanması

-Yukarıda belirtilen dilüsyonda capture antikor hazırlanıp her bir kuyucuğa 100 μ l olacak şekilde dağıtıldı, pleytin üzeri kapatıldı.

- Gece boyu oda ısısında inkübe edildi.

- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.

- Bloklama solüsyonu her bir kuyucuğa 300 μ l dağıtıldı.

- 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Standart ve örnekler 100 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 7 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
- Belirtilen dilüsyonda hazırlanan detection (tracer) 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 2 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- HRP 100 µl yüklendi.
- 20 dk oda ısısında inkübe edildi.
- 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Substrat 100 µl her bir kuyucuğa dağıtıldı.
- 20 dk renk değişimine göre karanlıkta oda ısısında bekletildi.
- 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi.
- 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı.
- Değerler KCjunior programında hesaplandı.

3.10. Çalışmada Kullanılan sarf malzemeler, kimyasallar, kitler ve cihazlar

Bu çalışmada, tüm gereçler Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi Araştırma laboratuvarında sağlandı ve tüm deneyler bu araştırma laboratuvarında yürütüldü. Çalışmada kullanılan kimyasalların tamamı moleküler biyoloji için uygun saflıktadır.

Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Hücre kültür pleyti, 100 mm (Corning)
6 kuyucuklu hücre kültür pleyti (Corning)
12 kuyucuklu hücre kültür pleyti (Corning)
24 kuyucuklu hücre kültür pleyti (Corning)
96 kuyucuklu hücre kültür pleyti (Corning)
Santrifüj tüpleri (15 ml ve 50 ml) (BD)
Hücre dondurma tüpleri (TRP)
Steril serolojik pipet (BD)
Pipet uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) (Thermo)
Eppendorf tüpü (Axygen)

Çalışmada kullanılan kimyasallar

p-ERK1/2 antikoru	Cell Signaling Technology- ABD
p-p38 antikoru	Cell Signaling Technology- ABD
p-Akt (Ser473) Rabbit mAb,	Cell Signaling Technology- ABD
HSP90 antikoru	Cell Signaling Technology- ABD
HSP70 antikoru	Cell Signaling Technology- ABD
HER2 (erbB-2) antikoru	Millipore-ABD
N-Cadherin antikoru	BD Bioscience
GAPDH	Meridian Life Science
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
Fare MIP-2 ELISA	Antigenix America, RMF431CK
Fare CXCL12/SDF1 ELISA	R&D, DY460
Fare VEGF ELISA	Peprtech, 900-K99
Fare TNF- α ELISA	eBioscience, 88-7324-88

Fare IL-6 ELISA	Biolegend, 431303
Fare IL-10 ELISA	Biolegend, 431403
Fare IL-17A ELISA	Biolegend, 432503
Fare IFN- γ ELISA	Biolegend, 430803
İnsan/ Fare HIF-1 α ELISA kit	BD biosciences
Mouse IgG HRP	Thermo scientific
Akrilamid	Applichem
Tris Base	Applichem
Sodyumdodesil sülfat (SDS)	Sigma Aldrich -Almanya
Amonyum per sülfat (APS)	Riedel-de haen-Almanya
TEMED	Amresco-ABD
WST	Roche
PVDF Membran	Millipore
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Thermo scientific-ABD
FBS (Fetal Dana Serumu)	Biological Industries
Gentamisin	İ.E. Ulagay, Türkiye
Tween 20	Applichem- Almanya
ECL	Biorad
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Proteaz inhibitör kokteyli	Roche diagnostic-Almanya
Süt Tozu (yağsız)	Pınar- Türkiye
Dimetil sülfoksit(DMSO)	Amresco-ABD
Cyristal violet	Sigma-ABD
Bradford Dye reagent 1X	Biorad-ABD
Brom fenol mavisi	Merck- Almanya
B-Merkaptoetanol	Merck- Almanya
Gliserol	Biotech- ABD
Tripsin % 0.05 (1X)	Thermo scientific-ABD
Etanol	Merck
Methanol	Merck

Kullanılan Aletler ve Gereçler

Inverted mikroskop (Olympos)

Class II LaminAir (Esco)

CO₂ inkübatörü (%5 CO₂) (Thermo)

Buzdolabı (+4 ve -20) (Beko)

Santrifüj (Eppendorf)

Mikro santrifüj (Eppendorf)

Derin dondurucu (-80 °C) (Thermo)

Sıvı azot tankı

Vorteks (Velp)

Su banyosu (Memmert)

Otoklav (Nüve)

Transfer cihazı (Amersham)

Soğutmalı mikrosantrifüj (Thermo)

Elektroforez güç kaynağı (Amersham)

Spektrofotometre (Thermo)

Hassas Terazı (Denver instrument)

Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı (Ika RH Basic)

Distile su cihazı (GFL)

Buz makinası (Uğur)

Jel yürütme tankı (Biorad)

Çeker ocak

pH metre

otomatik pipetler

Sonikatör (Bandelin Sonopuls 2070)

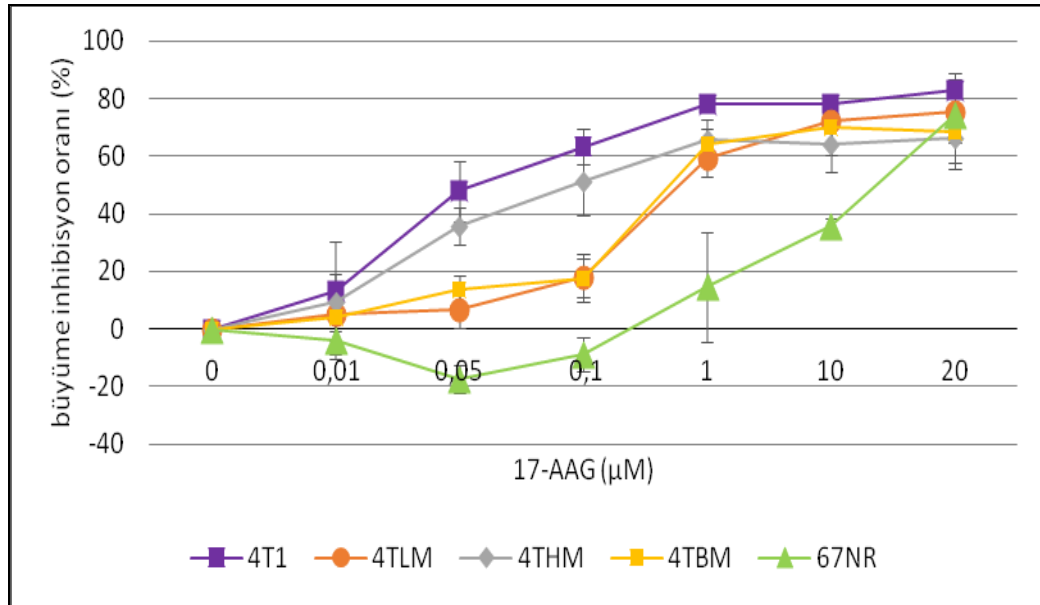
Thoma lamı (Marienfeld- C964730)

4. BULGULAR

4.1. HSP90 İnhibitörlerinin Kanser Hücre Hatlarında Proliferasyona Etkisi

4.1.1. 4T1, 4THM, 4TLM, 4TBM ve 67NR Hücre Hatlarında 17-AAG'nin Doza Bağlı Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi

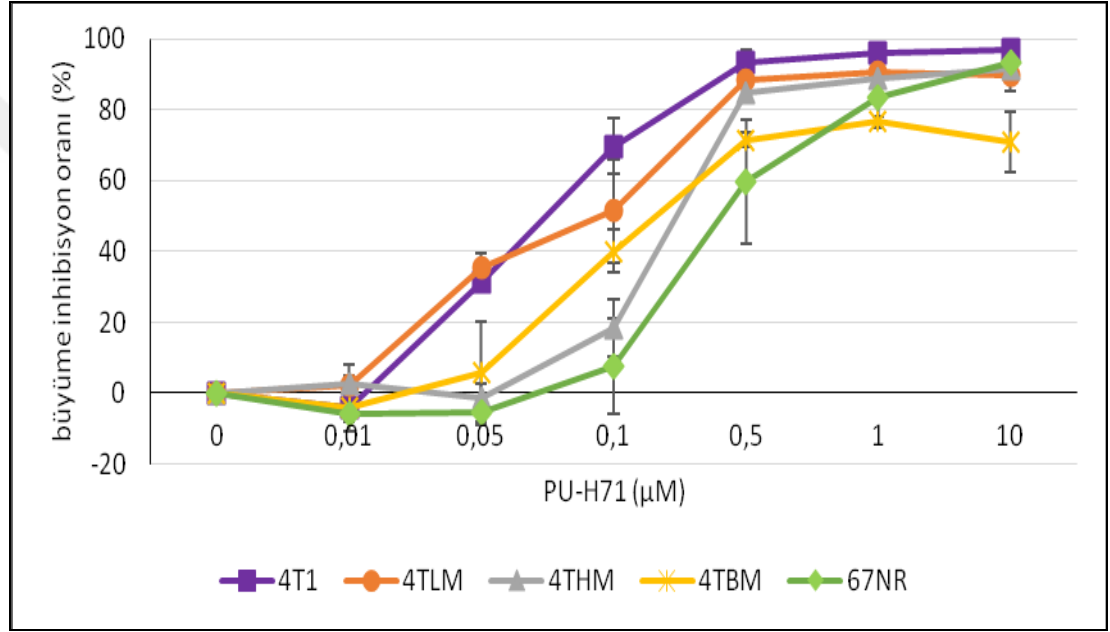
4T1 ve 4T1'in metastatik alt tipleri 4THM, 4TLM, 4TBM ile metastatik olmayan 67NR fare meme kanseri hücre hatlarında 17-AAG'nin artan konsantrasyonlarda (0,01 μ M – 20 μ M) hücre proliferasyonuna etkisi incelendi. 72 saatlik tedavi sonrasında WST-1 ile hücre proliferasyonu belirlendi. Çalışmada kullanılan fare meme kanseri hücre hatlarının hepsinde 17-AAG hücre proliferasyonunu inhibe etti (Şekil 17). Ayrıca 1 μ M ve 10 μ M dozlarda 17-AAG'nin hücre büyümesini 17-AAG'nin metastatik hücre hatlarında metastatik olmayan meme kanseri hücre hattı 67NR'ye göre anti-proliferatif etkisinin anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü. Tedavi gruplarındaki canlı hücre sayıları kontrol grubundaki canlı hücre sayılarına oranlanarak inhibisyon değerleri hesaplandı.



Şekil 17: 17-AAG'nin altı farklı dozda fare metastatik meme kanseri (4T1, 4TLM, 4THM, 4TBM) hücreleri ve metastatik olmayan fare meme kanseri (67NR) hücre hattında hücre büyümesi inhibisyon oranları. Her bir hücre için en az üç tekrarlı deneyler yapıldı.

4.1.2. 4T1, 4THM, 4TLM, 4TBM ve 67NR Hücre Hatlarında PU-H71'in Doza Bağlı Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi

4T1 ve 4T1'in metastatik alt tipleri 4THM, 4TLM, 4TBM ile metastatik olmayan 67NR fare meme kanseri hücre hatlarında PU-H71'in artan konsantrasyonlarda (0,01 μ M – 10 μ M) hücre proliferasyonuna etkisi incelendi. Doza bağlı olarak tüm hücrelerde proliferasyonu inhibe ettiği görüldü (p < 0.05) (Şekil 18).

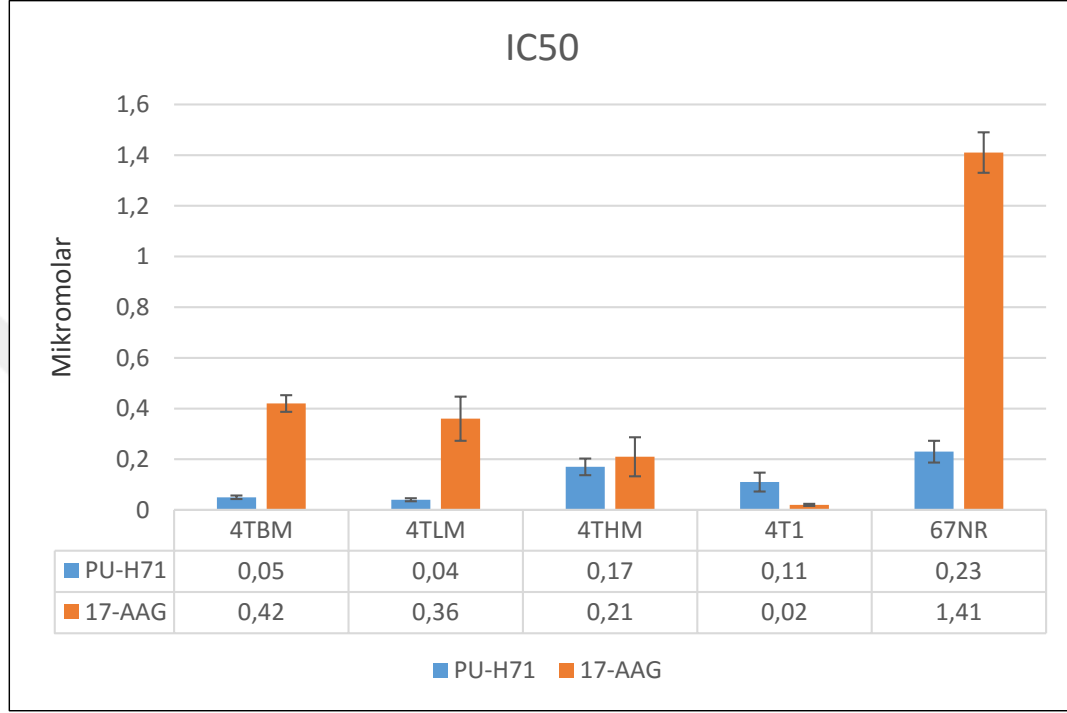


Şekil 18: PU-H71'in altı farklı dozda fare metastatik meme kanseri (4T1, 4TLM, 4THM, 4TBM) hücreleri ve metastatik olmayan fare meme kanseri (67NR) hücre hattında hücre büyümesi inhibisyon oranları. Her bir hücre için en az üç tekrarlı deneyler yapıldı.

4.1.3. 4T1, 4THM, 4TLM, 4TBM ve 67NR Hücre Hatlarında PU-H71 ve 17-AAG'nin IC50 Değerlerinin Hesaplanması

4T1, 4THM, 4TLM, 4TBM ve 67NR hücre hatlarında 17-AAG ve PU-H71'in doza bağlı etkisi incelendiğinde, kullanılan her bir hücre hattı için inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerleri hesaplandı (Şekil 19). 17-AAG'nin metastatik meme kanseri hücre hatlarında IC₅₀ değerleri 0.02-0.42 μ M arasında değişirken metastatik olmayan hücre hattı 67NR'de 1.41 μ M olarak belirlendi. PU-H71'in ise metastatik meme kanseri hücre hatlarında IC₅₀ değerleri 0.04-0.17 μ M arasında değişirken metastatik olmayan hücre hattı 67NR'de 0.23 μ M olarak belirlendi. 4TLM ve 4TBM hücreleri hem 17-AAG hem

de PU-H71 ile benzer IC50 değeri gösterdi. Hücre hatları arasında PU-H71'e en duyarlı olanların 4TBM ve 4TLM olduğu gözlemlendi.



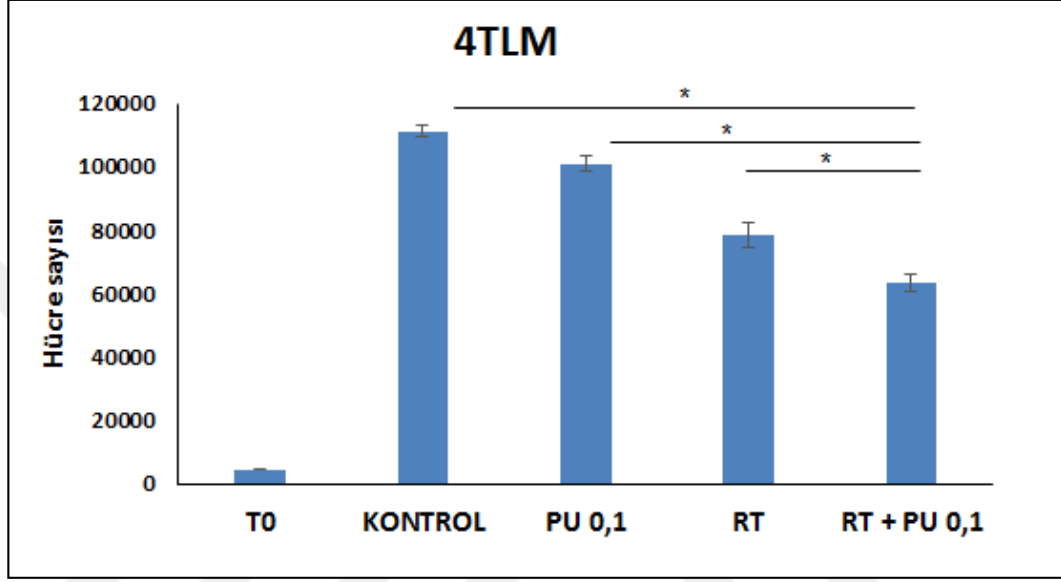
Şekil 19: PU-H71 ve 17-AAG'nin fare metastatik meme kanseri (4T1, 4TLM, 4THM, 4TBM) hücreleri ve metastatik olmayan fare meme kanseri (67NR) hücre hattında hesaplanan IC50 değerleri.

4.2. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71 ve RT Kombine Tedavisinin Hücre Proliferasyonuna Etkisi

4.2.1. 4TLM Hücre Hattında PU-H71'in RT İle Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi

4TLM hücrelerinde kombine tedavinin proliferasyona etkilerini belirlemek için 0,1 μ M PU-H71 tedavisinin ardından 10 Gy RT uygulandı. WST-1 yöntemi ile belirlenen proliferasyon değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyonun kombine tedavi ile anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. Ayrıca tek başına PU-H71 tedavisi ve tek başına RT ile karşılaştırıldığında da kombine tedavi anlamlı şekilde hücre proliferasyonunu baskıladı (*, $p < 0.05$) (Şekil 20).

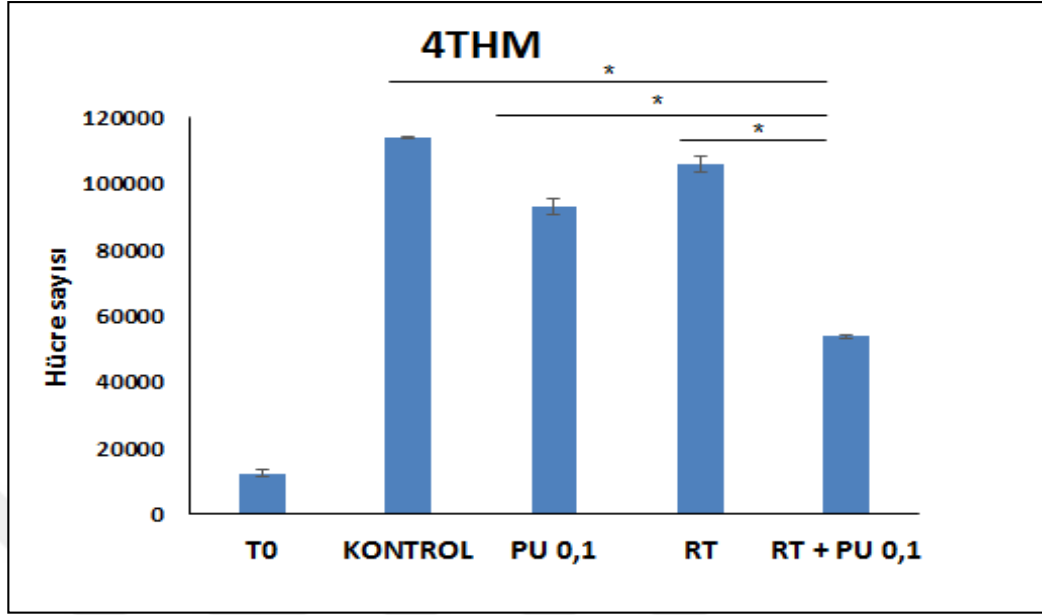
Hücrelerin büyüme inhibisyon oranları dikkate alındığında tedavilerin anti-proliferatif etkisi sumasyondan çok supra-aditif gibi görünmektedir. (RT- %29; PU-H71- % 9; kombine tedavi- %43).



Şekil 20: 0,1 μ M dozunda PU-H71 ve 10 Gy RT kombine uygulamasının karaciğere metastaz yapan fare meme kanseri (4TLM) hücrelerinde proliferasyona etkisi. T0: tedavi başlangıcındaki hücre sayısı.

4.2.2 4THM Hücre Hattında PU-H71'in RT İle Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi

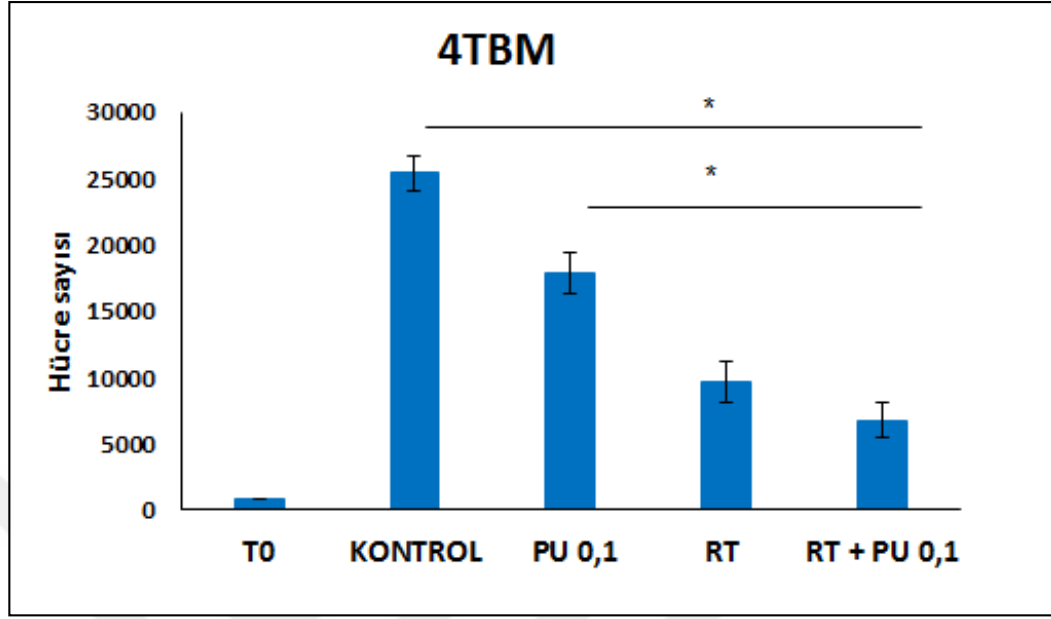
Kalbe metastaz yapan fare meme kanseri hücre hattı 4THM hücrelerinde kombine tedavinin proliferasyona etkilerini belirlemek için 0,1 μ M PU-H71 tedavisinin ardından 10 Gy RT uygulandı. WST-1 yöntemi ile belirlenen proliferasyon değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyonun kombine tedavi ile anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi. Ayrıca tek başına PU-H71 tedavisi ve tek başına RT ile karşılaştırıldığında da kombine tedavi anlamlı şekilde hücre proliferasyonunu baskıladı (*, $p < 0.05$) (Şekil 21). Hücrelerin büyüme inhibisyon oranları dikkate alındığında tedavilerin anti-proliferatif etkisi sumasyondan çok supra-aditif gibi görünmektedir. (RT- %7; PU-H71- %18; kombine tedavi- %52).



Şekil 21: 0,1 μ M dozunda PU-H71 ve 10 Gy RT kombine uygulamasının kalbe metastaz yapan fare meme kanseri (4THM) hücrelerinde proliferasyona etkisi. T0: tedavi başlangıcındaki hücre sayısı.

4.2.3. 4TBM Hücre Hattında PU-H71'in RT İle Kombine Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin WST-1 Yöntemiyle İncelenmesi

4TBM hücrelerinde kombine tedavinin proliferasyona etkilerini belirlemek için 0,1 μ M PU-H71 tedavisinin peşi sıra 10 Gy RT uygulandı. WST-1 yöntemi ile belirlenen proliferasyon değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında proliferasyonun kombine tedavi ile belirgin şekilde azaldığı gözlemlendi. Ayrıca tek başına PU-H71 tedavisine göre kombine tedavi anlamlı şekilde hücre proliferasyonunu baskıladı (*, $p < 0.05$) (Şekil 22).

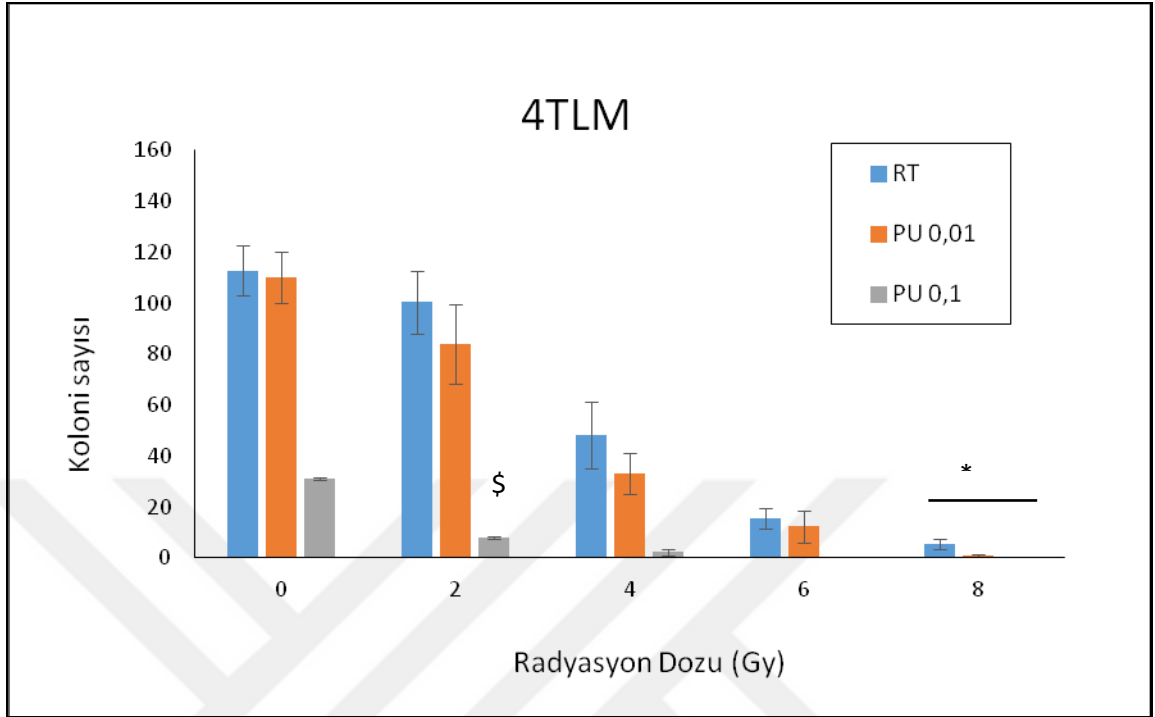


Şekil 22: 0,1 μ M dozunda PU-H71 ve 10 Gy RT kombine uygulamasının beyine metastaz yapan fare meme kanseri (4TBM) hücrelerinde proliferasyona etkisi. T0: tedavi başlangıcındaki hücre sayısı.

4.3. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71 ve RT Kombine Tedavisinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi

4.3.1. 4TLM Hücre Hattında PU-H71'in RT İle Kombine Uygulamasının Hücrelerde Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi

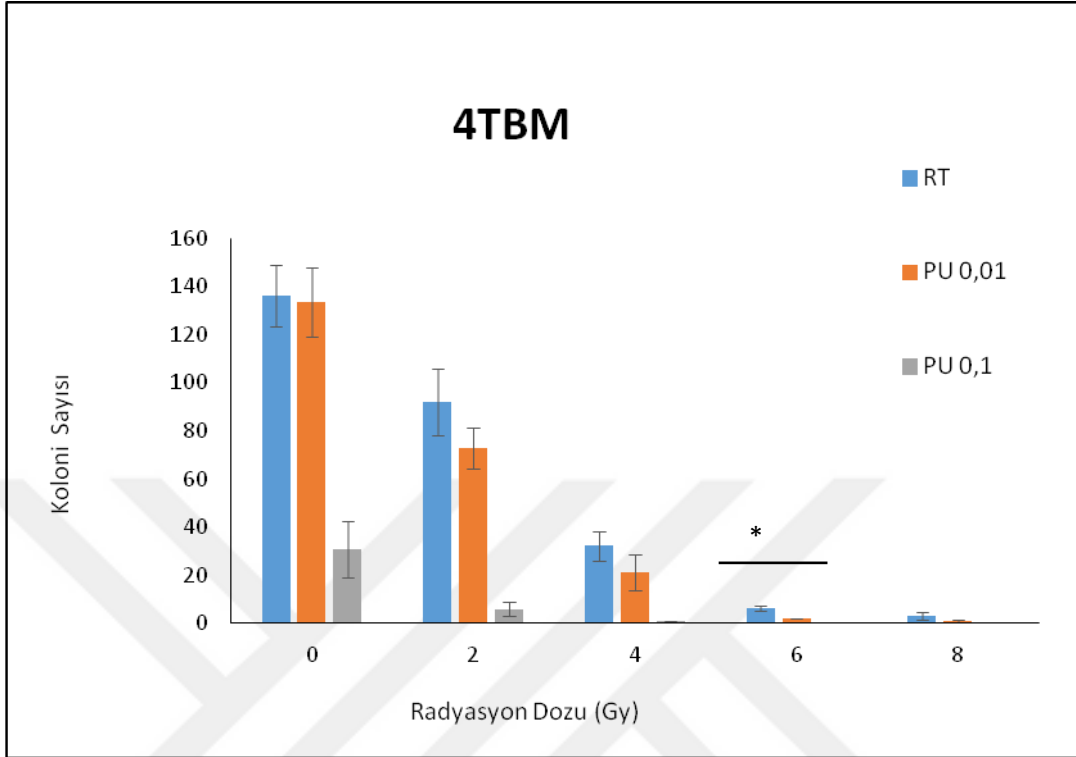
4TLM hücrelerinde PU-H71'in RT ile indüklenen hücre ölümünü arttırıp arttırmadığını belirlemek için 24 saatlik PU-H71 tedavisi sonrasında tek doz olarak 2, 4, 6 veya 8 Gy RT uygulandı. Çalışmamızda tek başına PU-H71 tedavisinin ve RT'nin de tek başına farklı dozlarda koloni oluşumuna nasıl etki ettiği araştırıldı. PU-H71'in iki farklı dozu seçildi. PU-H71'in 0,1 μ M dozu önceki proliferasyon deneylerinde etkin doz olarak belirlendi. RT ile birlikte uygulanacağı için normalde etkin olmayan ancak RT ile etkin olabileceği düşünülen daha düşük doz, 0,01 μ M doz da çalışmada kullanıldı. 0,01 μ M dozla RT kombine edildiğinde tek başına tedaviye göre koloni sayılarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Ancak 0,1 μ M PU-H71 2 Gy RT ile kombine uygulandığında tek başına PU-H71'e göre anlamlı düzeyde koloni sayısını azalttı (*, \$, $p < 0.05$) (Şekil 23).



Şekil 23: 0,1 ve 0,01 μ M dozunda PU-H71 ve 2, 4, 6 veya 8 Gy tek doz uygulanan RT'nin karaciğere metastaz yapan fare meme kanseri (4TLM) hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi.

4.3.2. 4TBM Hücre Hattında PU-H71'in RT İle Kombine Uygulamasının Hücrelerde Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi

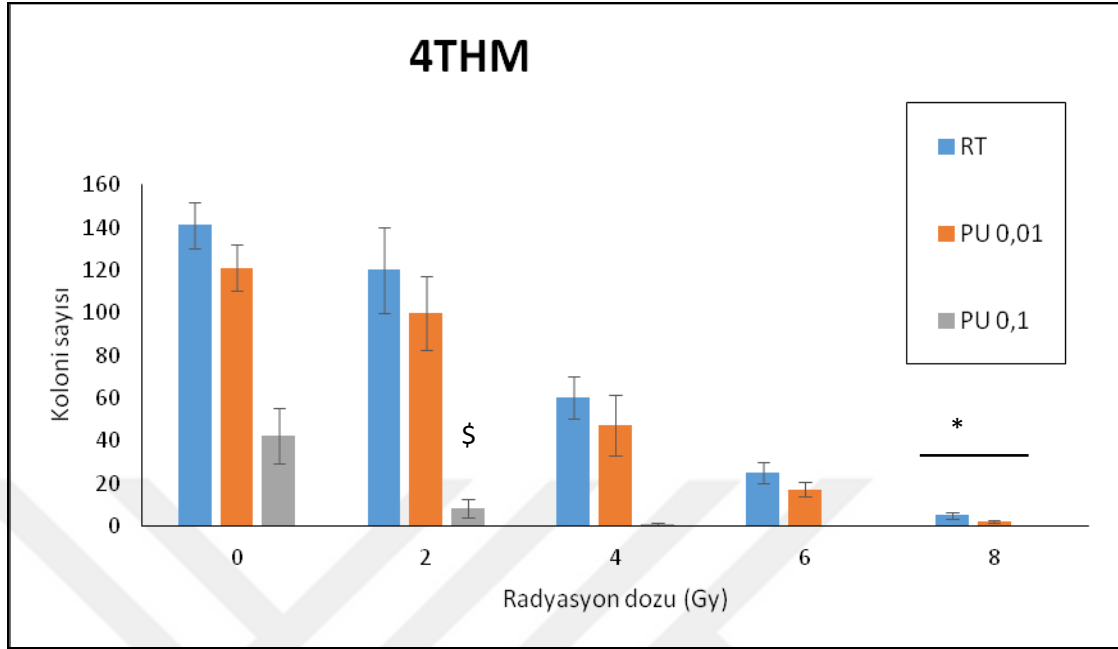
4TBM hücrelerinde PU-H71 ile RT birlikte uygulanarak hücrelerin koloni oluşumuna etkisi incelendi. PU-H71'in 0,1 μ M ve 0,01 μ M dozları tek başına ve 2, 4, 6 veya 8 Gy RT ile kombine şekilde kullanılarak koloni oluşturma deneyleri yapıldı. 0,01 μ M dozunda PU-H71 ile RT kombine edildiğinde tek başına tedaviye göre koloni sayılarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. PU-H71'in 0,1 μ M dozu ile 6 Gy RT birlikte kullanıldığında tek başına RT'ye göre anlamlı şekilde koloni sayısını azalttığı gözlemlendi (*, $p < 0.05$) (Şekil 24).



Şekil 24: 0,1 ve 0,01 μM dozunda PU-H71 ve 2, 4, 6 veya 8 Gy tek doz uygulanan RT'nin beyine metastaz yapan fare meme kanseri (4TBM) hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi.

4.3.3. 4THM Hücre Hattında PU-H71'in RT İle Kombine Uygulamasının Hücrelerde Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi

4THM hücrelerinde PU-H71 ile RT birlikte uygulanarak hücrelerin koloni oluşumuna etkisi incelendi. PU-H71'in 0,1 μM ve 0,01 μM dozları tek başına ve 2, 4, 6 veya 8 Gy RT ile kombine şekilde kullanılarak koloni oluşturma deneyleri yapıldı. 0,01 μM dozunda PU-H71 ile RT kombine edildiğinde tek başına tedaviye göre koloni sayılarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Ancak 0,1 μM PU-H71 2 Gy RT ile kombine uygulandığında tek başına PU-H71'e göre anlamlı düzeyde koloni sayısını azalttı. PU-H71'in 0,1 μM dozu ile 8 Gy RT birlikte kullanıldığında tek başına RT'ye göre anlamlı şekilde koloni sayısını azalttığı gözlemlendi (*, \$, $p < 0.05$) (Şekil 25).

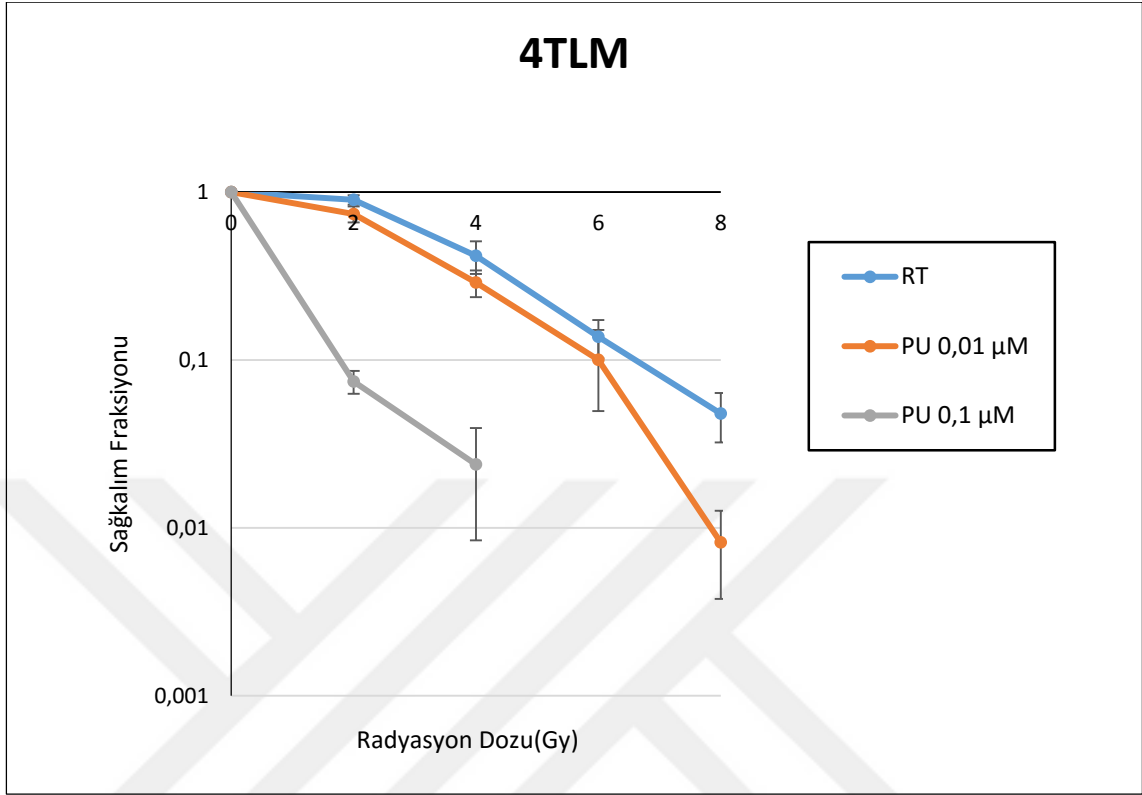


Şekil 25: 0,1 ve 0,01 μ M dozunda PU-H71 ve 2, 4, 6 veya 8 Gy tek doz uygulanan RT'nin kalbe metastaz yapan fare meme kanseri (4THM) hücrelerinde koloni oluşumuna etkisi.

4.4. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71'in RT Duyarlılığına Etkisi

4.4.1. 4TLM Hücre Hattında PU-H71'in RT Duyarlılığına Etkisi

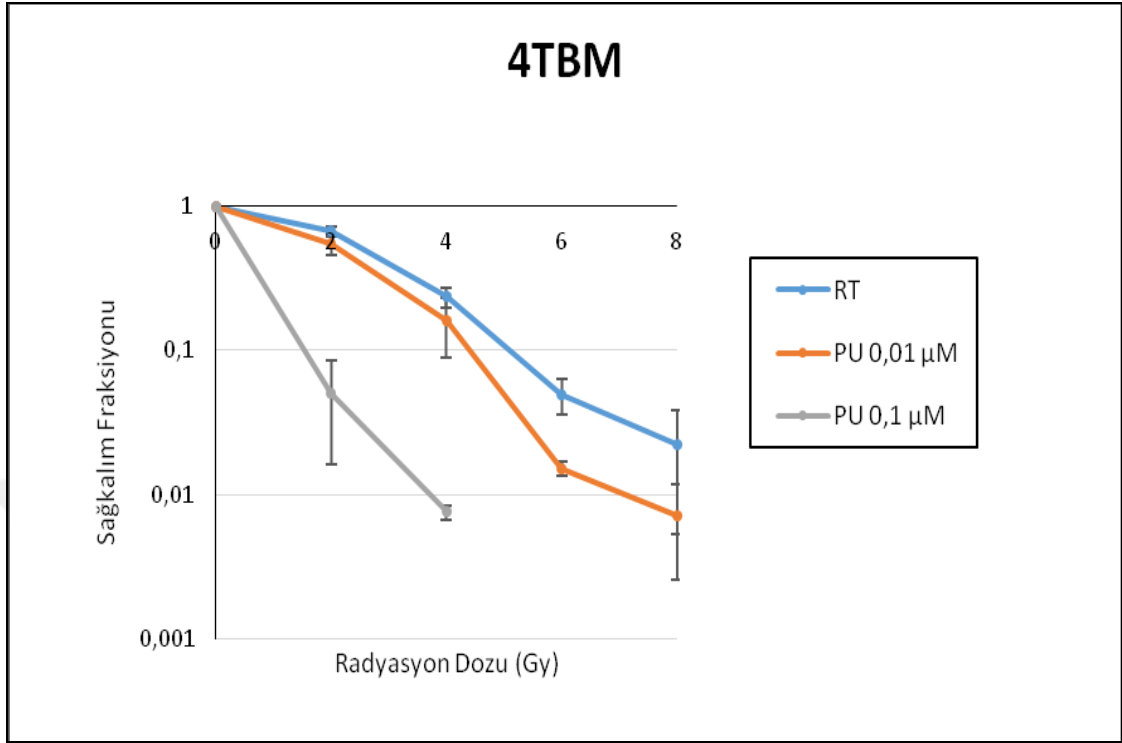
Bazı HSP90 inhibitörlerinin RT'ye duyarlılığı arttırdığı yönünde literatürde yer alan bilgilere göre (Gandhi ve ark., 2013; Schilling ve ark., 2012) PU-H71'in de metastatik fare meme kanseri hücre hatlarında RT'ye duyarlılık oluşturup oluşturmadığı çalışmamızda incelendi. Bunu belirlemek için literatürde sıklıkla uygulanan koloni oluşturma deneyleri yapıldı. Sağ kalım oranları literatüre göre (Franken ve ark., 2006) hesaplandıktan sonra sağ kalım fraksiyonu grafikleri logaritmik olarak oluşturuldu. 0,1 μ M dozunda PU-H71'in 4TLM hücre hattında RT'ye duyarlılığı arttırdığı gösterildi (Şekil 26).



Şekil 26: PU-H71'in 4TLM hücrelerini RT'ye duyarlaştıracı etkisinin gösterilmesi.

4.4.2. 4TBM Hücre Hattında PU-H71'in RT Duyarlılığına Etkisi

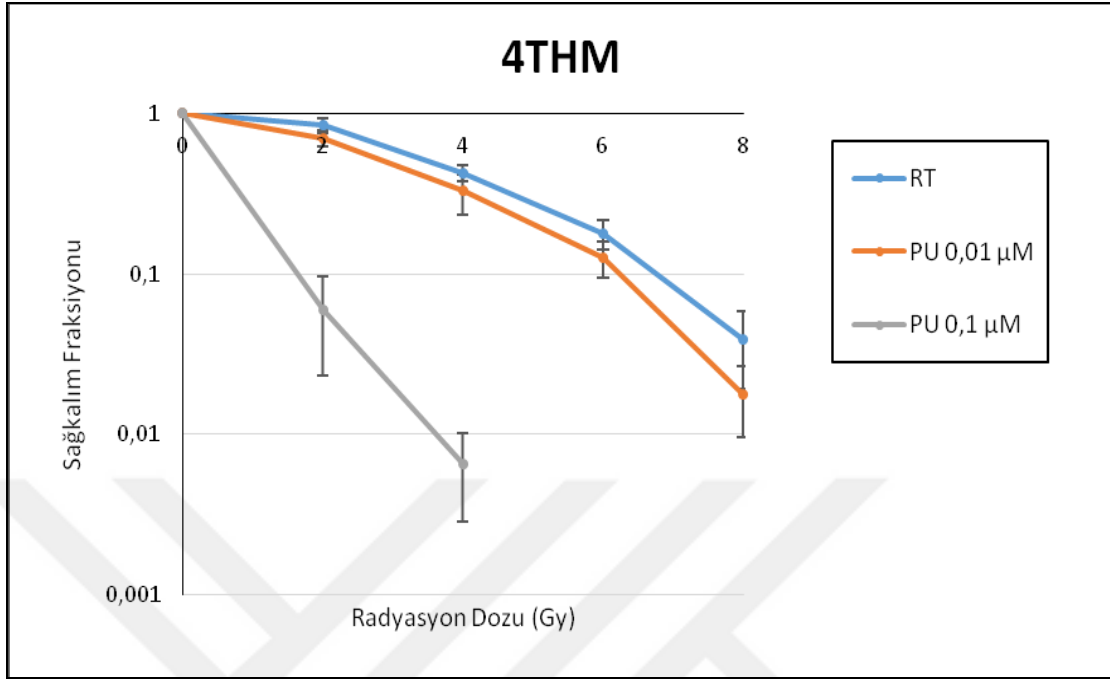
Beyine metastaz yapan fare meme kanseri hücrelerinde PU-H71'in RT'ye duyarlılığı arttırıp arttırmadığı görmek için koloni oluşturma deneyi yapıldı. Sayılan kolonilerden sağ kalım oranları hesaplanarak sağkalım fraksiyonu grafikleri logaritmik olarak oluşturuldu. 0,1 µM dozunda PU-H71'in 4TBM hücre hattında RT'ye duyarlılığı arttırdığı gösterildi (Şekil 27).



Şekil 27: PU-H71'in 4TBM hücrelerini RT'ye duyarlaştırıcı etkisinin gösterilmesi.

4.4.3. 4THM Hücre Hattında PU-H71'in RT Duyarlılığına Etkisi

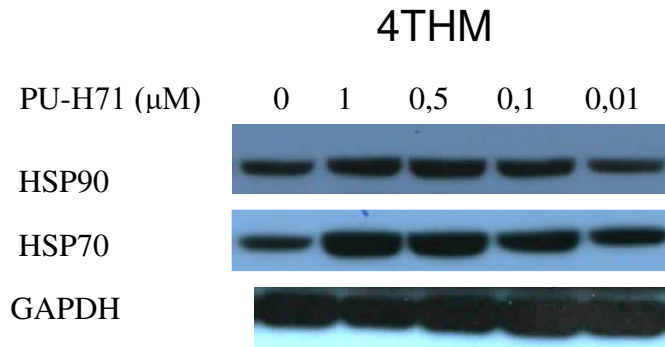
Kalbe metastaz yapan fare meme kanseri hücrelerinde PU-H71'in RT'ye duyarlılığı arttırıp arttırmadığı görmek için koloni oluşturma deneyi yapıldı. Sayılan kolonilerden sağ kalım oranları hesaplanarak sağkalım fraksiyonu grafikleri logaritmik olarak oluşturuldu. 0,1 µM dozunda PU-H71'in 4THM hücre hattında RT'ye duyarlılığı arttırdığı gösterildi (Şekil 28).



Şekil 28: PU-H71'in 4THM hücrelerini RT'ye duyarlaştırıcı etkisinin gösterilmesi.

4.5. PU-H71'in Metastatik Meme Kanseri Hücrelerinde HSP90 ve HSP70 Ekspresyonlarına Etkisi

HSP90 inhibitörü PU-H71'in değişen dozlarda hücredeki HSP90 ekspresyonuna etkisinin olmadığını sadece fonksiyonuna yönelik etki gösterdiğini belirtmek için hücre hatlarından biri, 4THM seçilerek HSP90 ve HSP70 ekspresyon düzeylerine bakıldı. Şekil 29'da görüldüğü üzere PU-H71'in farklı dozlarında HSP90 ekspresyonu değişmedi. HSP70 düzeyleri incelendiğinde ise HSP90'nın inhibisyonunu kompanse edebilmek için literatüre benzer şekilde doza bağımlı olarak HSP70 ekspresyonunun arttığı görüldü (Caldas-Lopes ve ark., 2009).



Şekil 29: 4THM hücrelerinde PU-H71'in farklı dozlarda HSP90 ve HSP70 ekspresyonlarına etkisi.

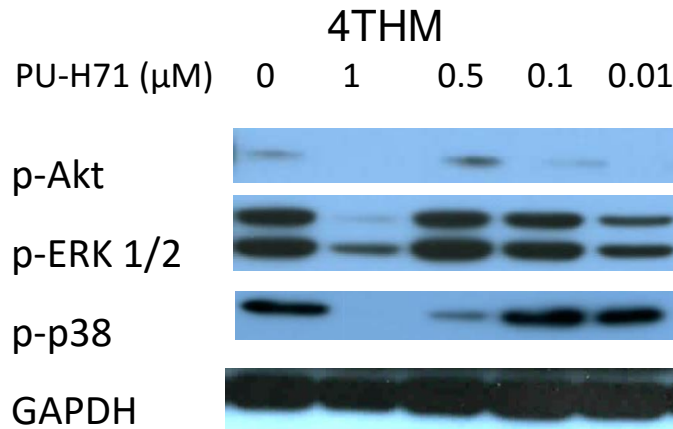
4.6. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71'in Hücre İçi Sinyal Yolağı Proteinlerinin Aktivasyonuna Etkisi

Çalışmamızda kullandığımız hücre hatlarında HSP90 inhibitörlerinin hücre proliferasyonları üzerindeki etkileri görüldükten sonra hangi yollar üzerinden bu etkilerin ortaya çıkabileceği araştırıldı. Bunun için hücre hatları PU-H71'in farklı dozları ile muamele edildikten 48 saat sonra hücre lizatları toplandı. Daha sonra hücre lizatlarından Western Blot yöntemi ile hücre içi sinyal yollarında rol oynayan proteinlerin; Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonundaki değişiklikler incelendi.

4.6.1. 4THM Hücre Hattında PU-H71'in Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Rol Oynayan Proteinlerin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi

4THM hücre hattında PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 μM dozlarında Akt fosforilasyonuna etkisi incelendi. PU-H71 'in özellikle 1 ve 0.01 μM dozlarında Akt fosforilasyonunu tamamen inhibe ettiği ancak 0.5 μM dozunda ise belirgin bir etki göstermediği belirlendi. 4THM hücrelerinde PU-H71'in belirlenen dozlarında Akt fosforilasyonunda U-Shaped etki oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 30).

PU-H71'in özellikle hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan ERK1/2 fosforilasyonuna etkisi de çalışmamızda Western Blot yöntemiyle incelendi. PU-H71 'in özellikle 1 μM dozunda ERK1/2 fosforilasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiği belirlendi.

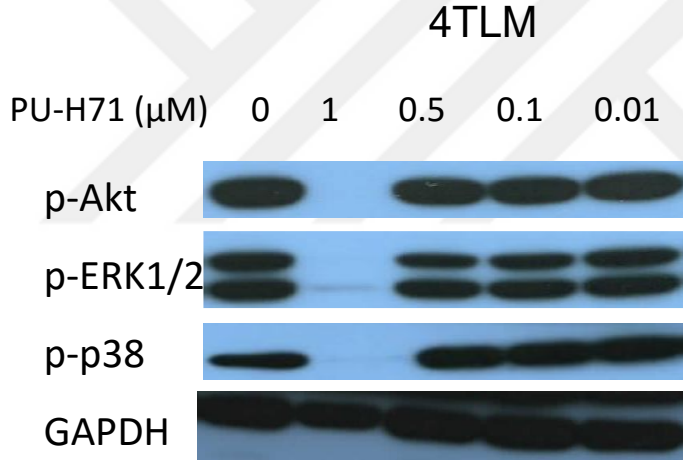


Şekil 30: 4THM hücrelerinde PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 μM dozlarında Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonuna etkisi. GAPDH kontrol amacıyla kullanıldı.

Benzer şekilde sitokin salınımında önemli rol oynayan p38 sinyal yolağı proteininin de PU-H71'in yüksek dozlarında p38 fosforilasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiğini gözlemlendi.

4.6.2. 4TLM Hücre Hattında PU-H71'in Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Rol Oynayan Proteinlerin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi

4TLM hücre hattında PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 μ M dozlarında Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonuna etkisi incelendi. 4TLM hücre hattında PU-H71 'in 1 μ M dozunda Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonunu belirgin şekilde baskıladığı daha düşük dozlarda ise belirgin bir etki göstermediği belirlendi (Şekil 31).



Şekil 31: 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 μ M dozlarında Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonuna etkisi. GAPDH kontrol amacıyla kullanıldı.

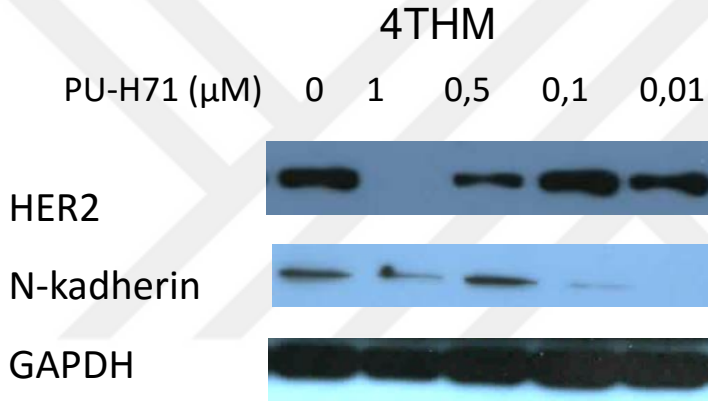
4.7. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71'in HSP90 Hedef Proteinlerine Etkisinin İncelenmesi

HSP90'nın şimdiye kadar tanımlanmış 200'den fazla hedef proteini vardır. Bunlardan HER2, meme kanserlerinde önemli rol oynamakta ve meme dokusunda HER2 aktivasyonu hücre sağkalımı ve proliferasyonunu arttırmaktadır (Fizman ve Jasniz, 2011). HER2 tedaviye dirençte de rol oynamaktadır (Martin ve ark., 2014). Bir diğer HSP90 hedef proteini olan N-kadherin ise tümör hücrelerinde invazyonun artışıyla ilişkili bir adezyon molekülüdür (Hazan ve ark., 2000). Dolayısıyla HSP90 inhibitörü

PU-H71'in HSP90'nın hedef proteinlerinden meme kanserinde önemli rol oynayan HER2 ve N-kadherin ekspresyonlarına etkisi de çalışmamızda incelendi.

4.7.1. 4THM Hücre Hattında PU-H71'in HSP90 Hedef Proteinlerine Etkisinin İncelenmesi

Kalbe metastaz yapan fare meme kanseri hücre hattında farklı dozlarda PU-H71 uygulaması sonucu HER2 ekspresyonunun doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi. Ayrıca diğer bir HSP90 hedef proteini olan N-kadherin ekspresyonunda ise p-Akt de olduğu gibi U-shaped etki gözlemlendi (Şekil 32).

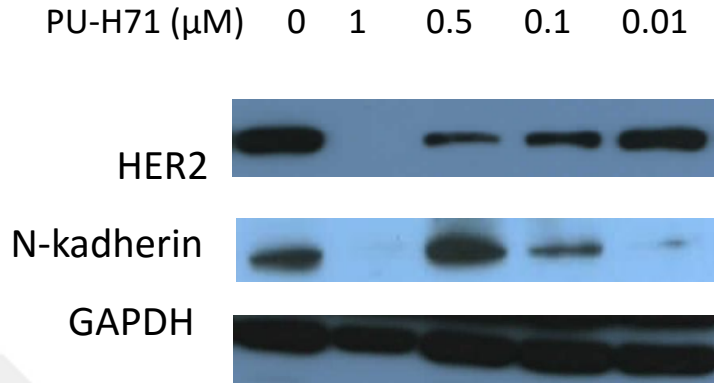


Şekil 32: 4THM hücrelerinde PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 µM dozlarında HSP90 hedef proteinleri, HER2 ve N-kadherin ekspresyonlarına etkisi. GAPDH kontrol amacıyla kullanıldı.

4.7.2. 4TLM Hücre Hattında PU-H71'in HSP90 hedef proteinlerine Etkisinin İncelenmesi

4TLM hücrelerinde de 4THM hücre hattına benzer olarak PU-H71'in farklı dozlarda uygulanmasıyla HSP90 hedef proteinlerinden HER2 ekspresyonunun doza bağlı olarak azaldığı gözlenirken N-kadherin ekspresyonunda ise U-shaped etki gözlemlendi (Şekil 33).

4TLM

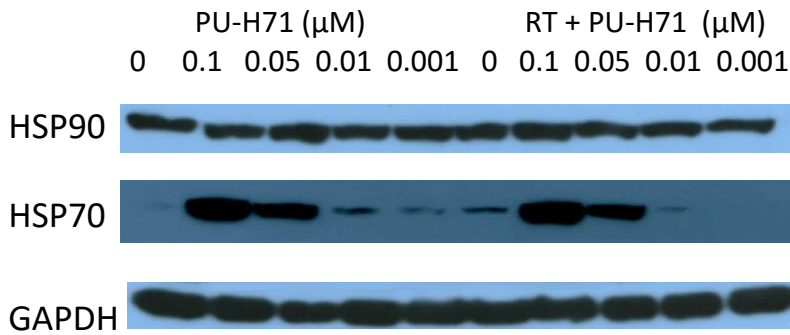


Şekil 33: 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 1, 0.5, 0.1 ve 0.01 μ M dozlarında HSP90 hedef proteinleri, HER2 ve N-kadherin ekspresyonlarına etkisi. GAPDH kontrol amacıyla kullanıldı.

4.8. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71 ve RT Kombine Uygulamasının HSP90 ve HSP70 Ekspresyonlarına Etkisi

Farklı dozlarda HSP90 inhibitörü PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının metastatik meme kanseri hücrelerindeki HSP90 ekspresyonuna etkisinin olmadığını belirtmek için hücre hatlarından biri, 4TBM seçilerek HSP90 ve HSP70 ekspresyon düzeylerine bakıldı. Şekil 34'te görüldüğü üzere HSP90 düzeyleri PU-H71'in farklı dozlarında ve RT ile kombine edildiğinde değişmedi. HSP70 düzeylerinde ise HSP90'nın inhibisyonunu kompanse edebilmek için doza bağımlı olarak ekspresyonunun arttığı görüldü (Şekil 34).

4TBM



Şekil 34: 4TBM hücrelerinde PU-H71'in 0.1, 0.05, 0.01 ve 0.001 μ M dozlarında tek başına ve RT ile kombine uygulamasının HSP90 ve HSP70 ekspresyonlarına etkisi. GAPDH kontrol amacıyla kullanıldı.

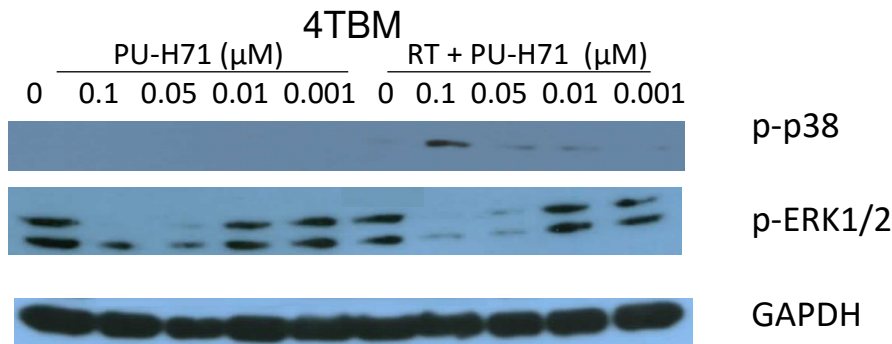
4.9. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücre Hatlarında PU-H71 ve RT Kombine Uygulamasının Hücre İçi Sinyal Yolağı Proteinlerinin Aktivasyonuna Etkisinin İncelenmesi

Çalışmamızda kullandığımız hücre hatlarında HSP90 inhibitörü PU-H71'in RT ile kombine kullanımının hücre proliferasyonları üzerindeki etkileri görüldükten sonra hangi yollar üzerinden bu etkilerin ortaya çıkabileceği araştırıldı. Bunun için hücre hatları PU-H71'in daha düşük dozları ile muamele edildikten 24 saat sonra RT uygulandı. RT'den 24 saat sonra hücre lizatları toplandı. Daha sonra hücre lizatlarından Western Blot yöntemi ile hücre içi sinyal yollarında rol oynayan proteinlerin; ERK1/2 ve p38 fosforilasyonundaki değişiklikler incelendi.

4.9.1. 4TBM Hücre Hattında PU-H71 ve RT'nin Kombine Uygulamasının Hücre İçi Sinyal Yollarında Rol Oynayan Proteinlerin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi

PU-H71 ve RT kombine tedavisinin hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan ERK1/2 fosforilasyonuna etkisini incelediğimizde PU-H71 'in 0.1 ve 0.05 μ M dozlarında ERK1/2 fosforilasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiği gözlemlendi. Aynı dozlar RT ile kombine edildiğinde ise ERK1/2 fosforilasyonunda tek başına PU-H71 ile oluşandan daha fazla inhibisyon gözlemlendi.

Ayrıca sitokin salınımında önemli rol oynayan p38 sinyal yolağı proteininin de PU-H71 ile tek başına tedavilerde fosforilasyon göstermediği ancak RT ile kombine uygulandığında ise PU-H71'in göreceli olarak yüksek dozlarında p38 fosforilasyonunu belirgin şekilde arttırdığı gözlemlendi (Şekil 35).

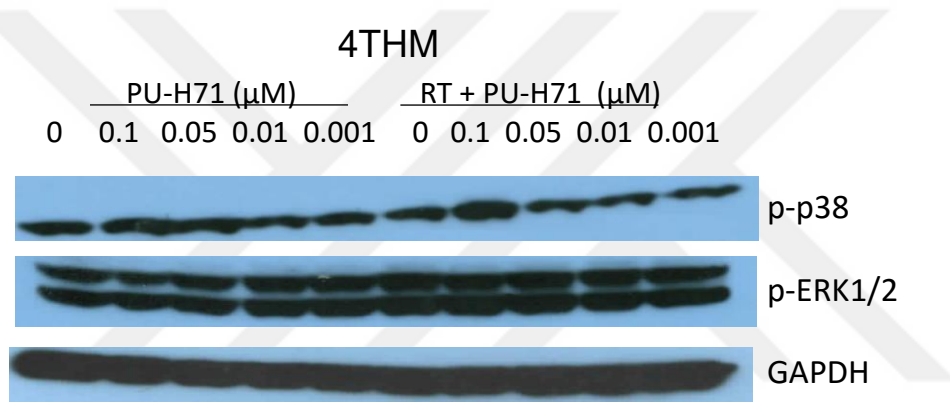


Şekil 35: 4TBM hücrelerinde PU-H71'in 0.1, 0.05, 0.01 ve 0.001 μ M dozlarında tek başına ve RT ile kombine uygulamasının p38 ve ERK1/2 fosforilasyonuna etkisi. GAPDH kontrol amacıyla kullanıldı.

4.9.2. 4THM Hücre Hattında PU-H71 ve RT'nin Kombine Uygulamasının Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Rol Oynayan Proteinlerin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi

4THM hücrelerinde PU-H71 ve RT kombine tedavisinin ERK1/2 fosforilasyonuna etkisini incelediğimizde PU-H71 'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasında çok belirgin bir değişiklik gözlenmedi.

Ancak bu hücrelerde PU-H71 'in 0.1 ve 0.05 μ M dozları ile tek başına tedavilerde p38 fosforilasyonunun arttığı, bu artışın özellikle PU-H71'in 0.1 μ M dozu ile RT kombine uygulandığında daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 36).



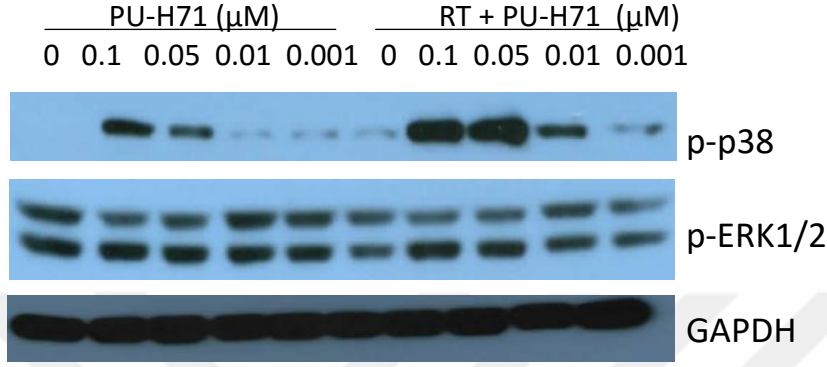
Şekil 36: 4THM hücrelerinde PU-H71'in 0.1, 0.05, 0.01 ve 0.001 μ M dozlarında tek başına ve RT ile kombine uygulamasının p38 ve ERK1/2 fosforilasyonuna etkisi. GAPDH kontrol amacıyla kullanıldı.

4.9.3. 4TLM Hücre Hattında PU-H71 ve RT'nin Kombine Uygulamasının Hücre İçi Sinyal Yolaklarında Rol Oynayan Proteinlerin Fosforilasyonları Üzerine Etkisi

PU-H71 ve RT kombine tedavisinin 4TLM hücrelerinde ERK1/2 fosforilasyonuna etkisini incelediğimizde PU-H71 'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasında çok belirgin bir değişiklik gözlenmedi.

Ancak 4TLM hücrelerinde PU-H71 'in 0.1 ve 0.05 μ M dozları ile tek başına tedavilerde p38 fosforilasyonunun arttığı gözlemlendi. PU-H71'in 0.1 ve 0.05 μ M dozları RT ile kombine uygulandığında ise p38 fosforilasyonunda daha belirgin bir artış gözlemlendi (Şekil 37).

4TLM

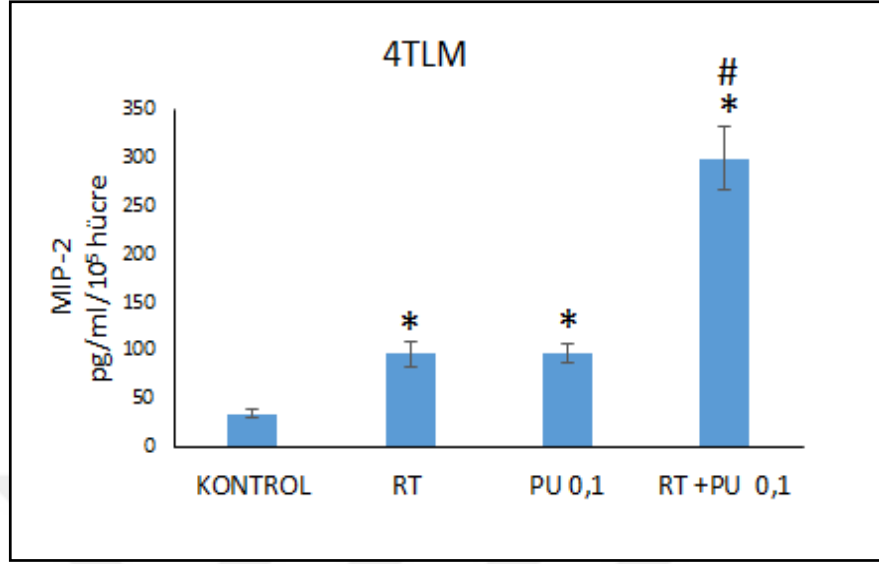


Şekil 37: 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.1, 0.05, 0.01 ve 0.001 μ M dozlarında tek başına ve RT ile kombine uygulamasının p38 ve ERK1/2 fosforilasyonuna etkisi. GAPDH kontrol amacıyla kullanıldı.

4.10. Fare Metastatik Meme Kanseri Hücrelerinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Kullanımının Anjiogenik Faktörlerin Salınımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

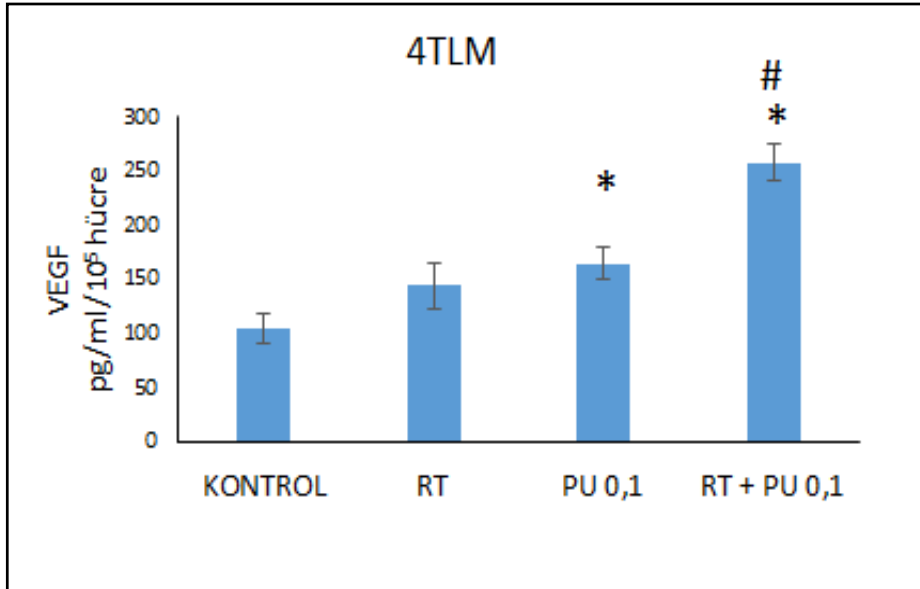
4.10.1. 4TLM Hücrelerinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Kullanımının Anjiogenik Faktörlerin Salınımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

4TLM hücre hattında HSP90 inhibitörü PU-H71'in (0.1 μ M) tek başına ve RT ile kombine edilerek MIP-2, VEGF ve SDF salınımı üzerine etkisi araştırıldı. 0,1 μ M PU-H71 ve RT tek başına MIP-2 salınımı tedavisiz gruba göre anlamlı şekilde arttırdı. Kombine tedavinin ise şekil 38'de görüldüğü gibi hem kontrole göre hem de tek başına uygulanan PU-H71 ve RT'ye göre anlamlı şekilde daha fazla MIP-2 salınımı arttırdığı gözlemlendi (*, $p < 0,05$) (Şekil 38).



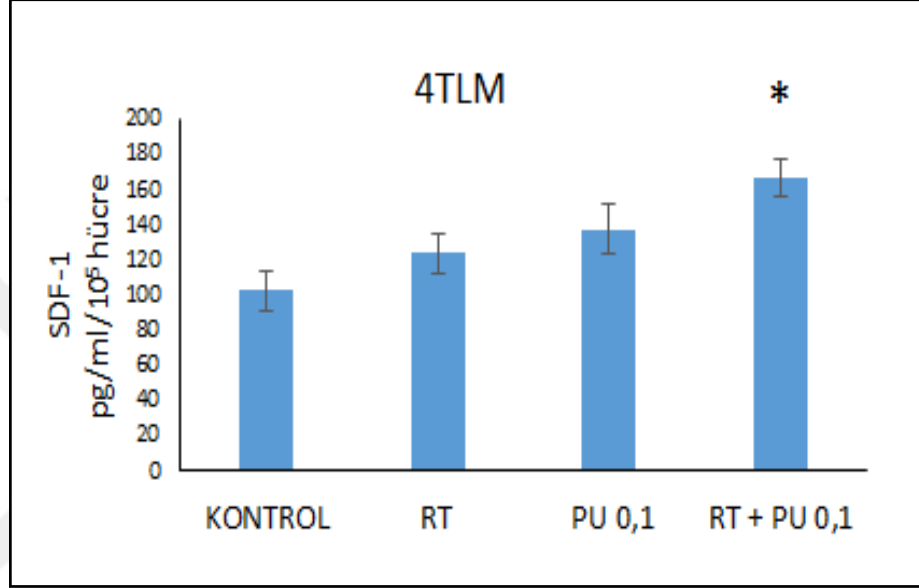
Şekil 38: 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının MIP-2 salınımına etkisi.

4TLM hücrelerinde PU-H71'in (0.1 μ M) tek başına ve RT ile kombine edilerek VEGF salınımı üzerine etkisine baktığımızda MIP-2 salınımına benzer bir profil çizdiğini görüldü. 0,1 μ M PU-H71 tek başına VEGF salınımını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttırdı (Şekil 39). Kombine tedavi ise hem kontrole göre VEGF salınımını arttırdı hem de tek başına uygulanan PU-H71 ve RT'nin oluşturduğu artıştan anlamlı şekilde daha fazla VEGF salınımı arttırdığı görüldü (*, $p < 0,05$).



Şekil 39: 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının VEGF salınımına etkisi.

4TLM hücrelerinde PU-H71'in (0.1 μ M) tek başına ve RT ile kombine edilerek SDF salınımı üzerine etkisini incelediğimizde diğer anjiogenik faktörlerin salınımına benzer bir şekilde 0,1 μ M PU-H71 ile RT kombine tedavisinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde SDF salınımını arttırdığı görüldü (Şekil 40) (*, $p<0,05$).

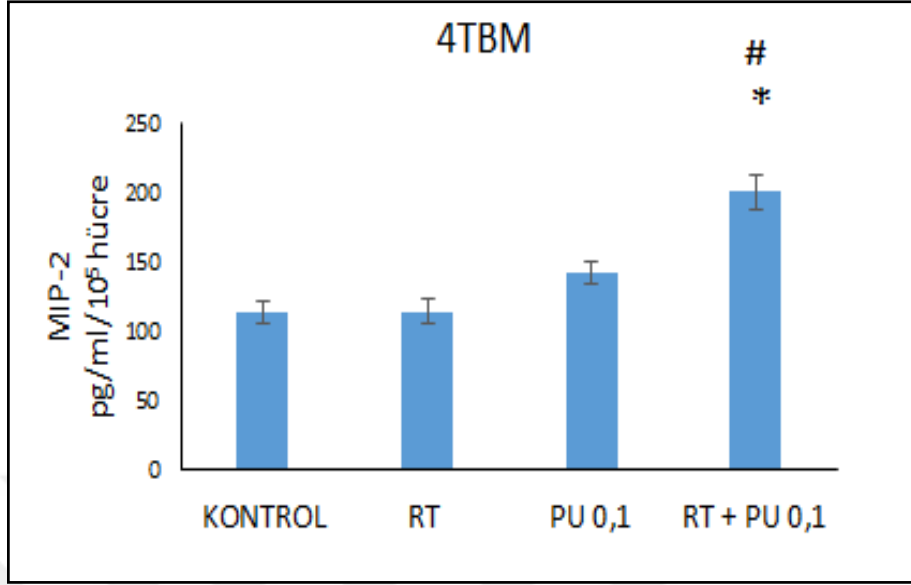


Şekil 40: 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının SDF-1 salınımına etkisi.

4.10.2. 4TBM Hücrelerinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Kullanımının Anjiogenik Faktörlerin Salınımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

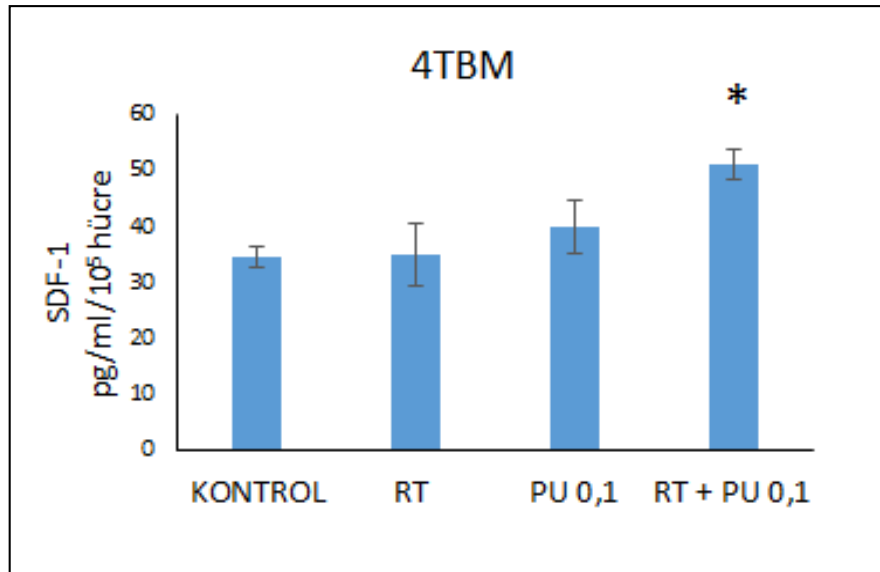
4TBM hücre hattında PU-H71'in (0.1 μ M) tek başına ve RT ile kombine tedavisinin MIP-2, VEGF ve SDF salınımı üzerine etkisi araştırıldı. Kombine tedavi uygulanan grupta hem kontrole göre hem de tek başına uygulanan PU-H71 ve RT'ye göre MIP-2 salınımının anlamlı şekilde arttırdığı görüldü (Şekil 41) (*, $p<0,05$).

PU-H71 ve RT'nin tek başına ve kombine şekilde VEGF salınımına etkileri de incelendi. Ancak 4TBM hücrelerinden yeterince VEGF salınımı oluşmadığı için gruplar arasında karşılaştırma yapılamadı.



Şekil 41: 4TBM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının MIP-2 salınımına etkisi.

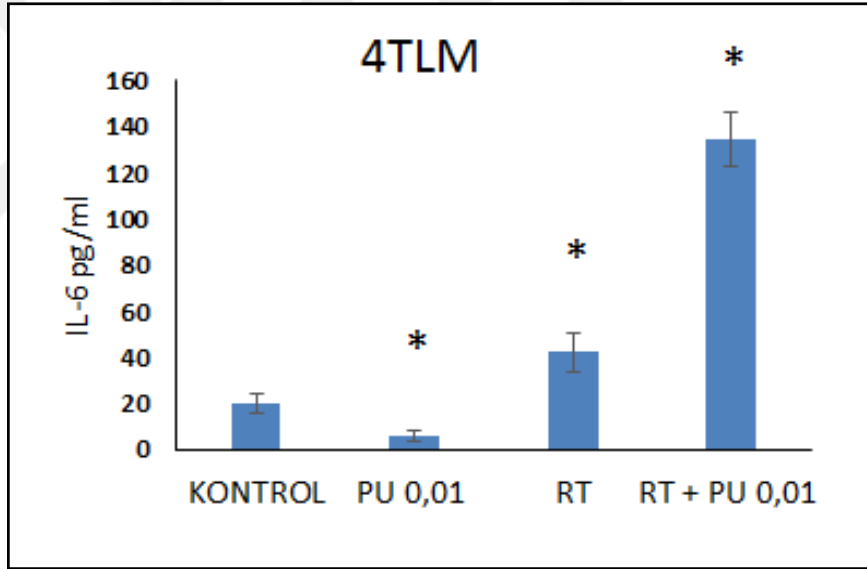
4TBM hücrelerinde PU-H71'in (0.1 μ M) tek başına ve RT ile kombine edilerek SDF salınımı üzerine etkisine baktığımızda diğer anjiogenik faktör MIP-2 salınımına benzer bir şekilde 0,1 μ M PU-H71 ile RT kombine tedavisinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde SDF salınımını arttırdığı görüldü (Şekil 42) (*, $p < 0,05$).



Şekil 42: 4TBM hücrelerinde PU-H71'in 0.1 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının SDF-1 salınımına etkisi.

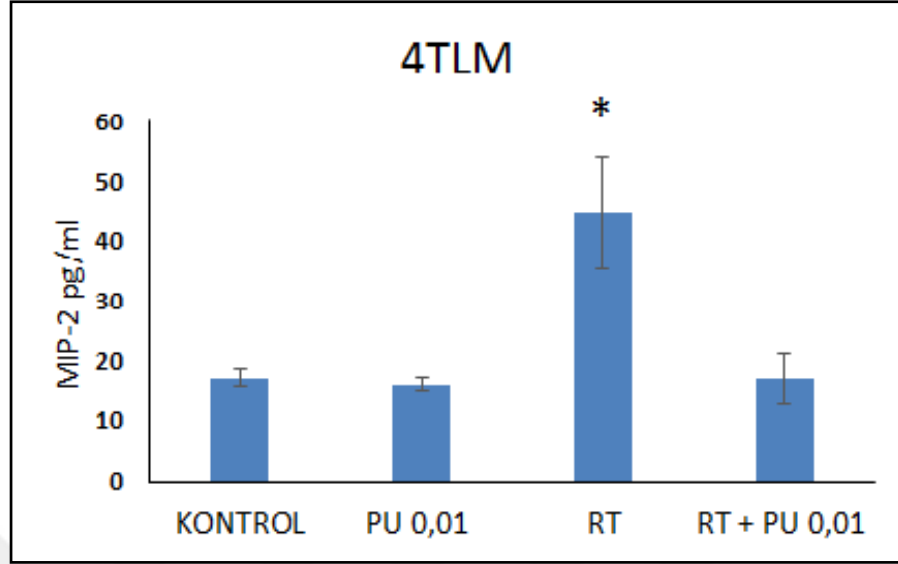
4.11. Ex vivo kültürlerde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Kullanımının IL-6, VEGF ve MIP-2 Salınımı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

4TLM enjeksiyonu yapılan farelerden alınan primer tümörlerle oluşturulan ex vivo kültürlerine 0,01 μ M PU-H71 ve 5 Gy RT uygulamasının IL-6, VEGF ve MIP-2 salgını üzerine etkileri incelendi. IL-6, çalışmada kullandığımız fare metastatik meme kanseri hücre hatları 4TBM, 4TLM ve 4THM'de in vitro koşullarda ELİSA kitiyle saptanacak miktarda salınmamaktadır. Ancak hazırladığımız primer tümör eksplantlarından IL-6 salgını belirgin şekilde gözlenmektedir. Şekil 43'te görüldüğü gibi RT tek başına veya PU-H71 ile kombine edildiğinde IL-6 salgını anlamlı şekilde arttırdı. Tek başına uygulanan PU-H71 ise IL-6 salgını anlamlı şekilde azalttı (*, $p < 0,05$).

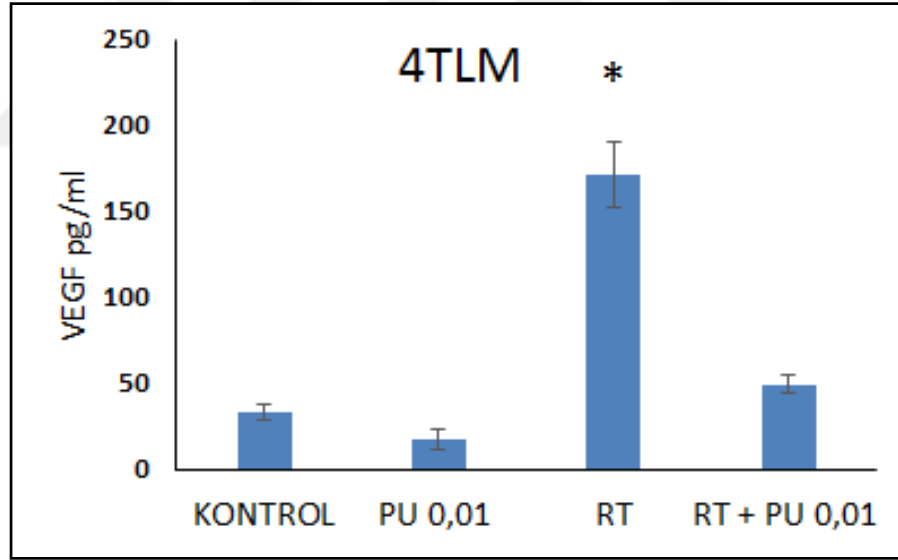


Şekil 43: Ex vivo kültürü yapılan 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.01 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının IL-6 salgınına etkisi.

Ex vivo kültürler in vivo durumları in vitro kültürlerden daha iyi yansıttığı için VEGF ve MIP-2 üzerindeki değişiklikler de incelendi. RT tek başına in vitro kültürlerden elde edilen sonuçlarla benzer olarak MIP-2 (Şekil 44) ve VEGF (Şekil 45) düzeylerini arttırdı. Tek başına uygulanan PU-H71, VEGF ve MIP-2 düzeylerinde bir değişiklik oluşturmazken kombine tedavi grubunda RT ile indüklenen VEGF ve MIP-2 düzeylerindeki artışı engelledi (Şekil 44 ve 45) (*, $p < 0,05$).



Şekil 44: Ex vivo kültürü yapılan 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.01 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının MIP-2 salınımına etkisi.

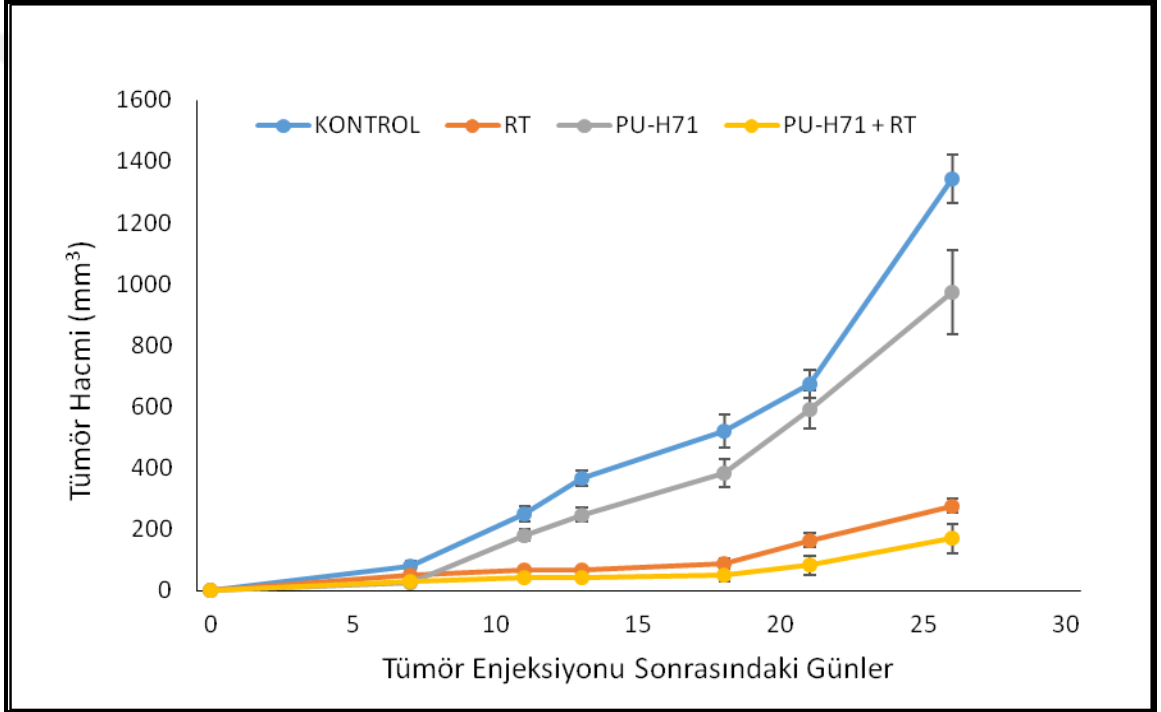


Şekil 45: Ex vivo kültürü yapılan 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 0.01 μ M dozunda tek başına ve RT ile kombine uygulamasının VEGF salınımına etkisi.

4.12. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Tümör Büyümesine Etkisi

4TBM hücreleriyle oluşturulan fare metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve tek doz RT ile kombine uygulamasının tümör büyümesine etkisi incelendi. PU-H71, 75 mg/kg i.p. haftada 3 kez enjekte edildi. RT ise tümör hücresi enjeksiyonundan 6 gün sonra 18 Gy dozunda uygulandı. Tedavi süresince kumpasla yedi

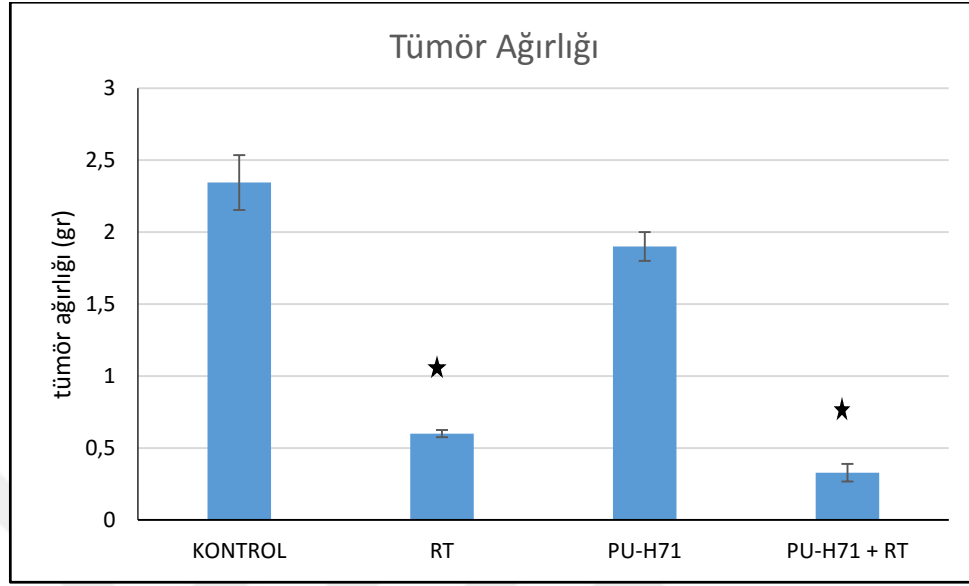
kez ölçüm yapıldı. Alınan değerler hesaplanarak tümör hacmi belirlendi. Şekil 46’da görüldüğü üzere 4TBM metastatik meme kanseri modelinde PU-H71 tek başına uygulandığında kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde tümör büyümesini geciktirdi. Sadece RT uygulanan grupta beklendiği üzere kontrol grubuna göre anlamlı şekilde tümör büyümesinde gecikme gözlenirken PU-H71 ile RT kombine uygulanan grupta sadece RT uygulanan gruba göre anlamlı şekilde tümör büyümesinde gecikme görüldü ($p<0,05$).



Şekil 46: 4TBM hücre hattıyla oluşturulan ortotopik metastatik meme kanseri modelinde PU-H71’in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının tümör büyümesine etkisi.

4.13. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71’in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Tümör Ağırlığına Etkisi

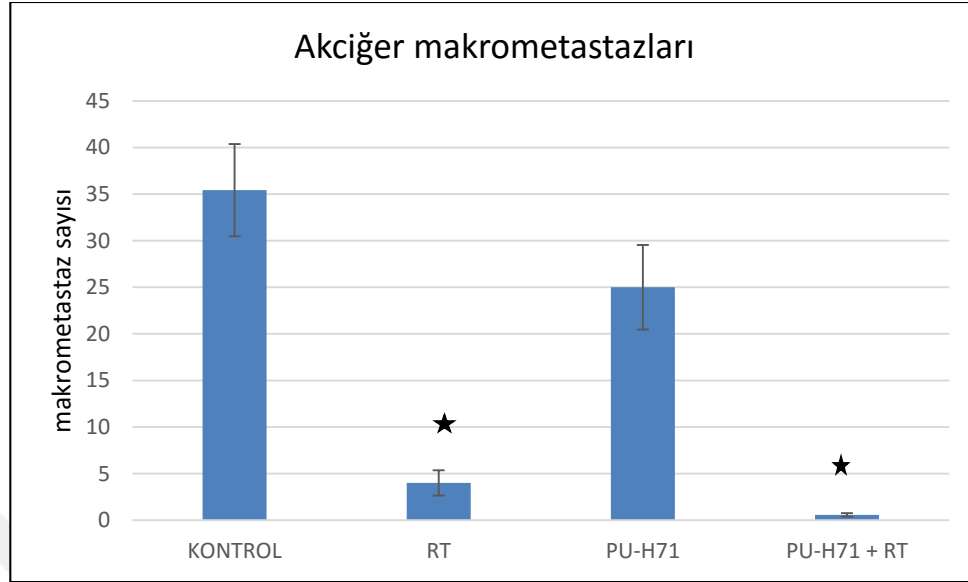
4TBM hücreleriyle oluşturulan fare metastatik meme kanseri modelinde PU-H71’in tek başına ve tek doz RT ile kombine uygulamasının tümör ağırlığına etkisi de incelendi. Tümör ağırlığı açısından değerlendirildiğinde şekil 47’de görüldüğü gibi tek başına RT kontrole göre tümör ağırlığını azalttı. PU-H71 ve RT kombine tedavisi ise kontrol ve tek başına PU-H71 grubuna göre tümör ağırlığını azalttı. Beklenildiği üzere tedavilerin tümör hacmine ve ağırlığına etkisinin benzer olduğu görüldü.



Şekil 47: 4TBM hücre hattıyla oluşturulan ortotopik metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının tümör ağırlığı üzerine etkisi.

4.14. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Akciğer Metastazına Etkisi

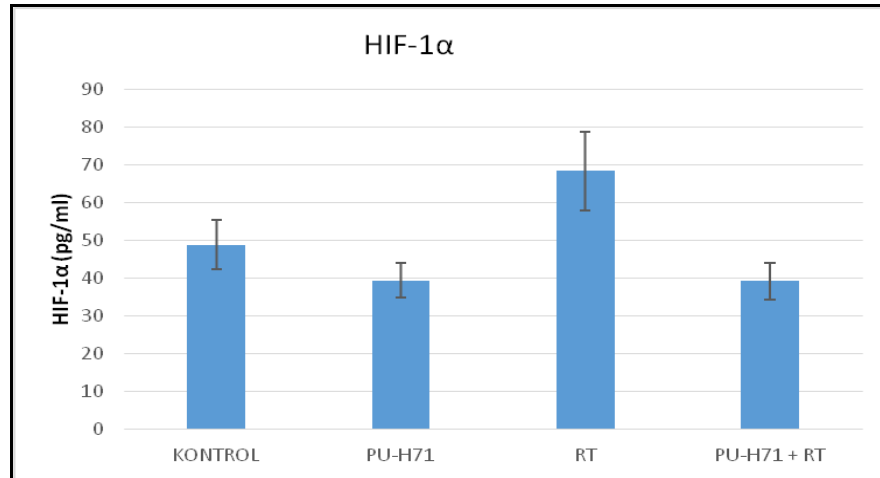
Çalışmada kullandığımız hücre hatları sıklıkla akciğere metastaz yapmaktadır. 4TBM hücreleriyle oluşturulan fare metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve tek doz RT ile kombine uygulamasının oluşan akciğer makrometastazlarına etkisi incelendi. Tek başına PU-H71 kontrole göre akciğer makrometastaz sayısında anlamlı bir değişiklik oluşturmadı. Tek başına uygulanan RT ise kontrol ve tek başına PU-H71'e göre anlamlı düzeyde akciğer makrometastazlarını azalttı. PU-H71 ve RT kombine tedavisinin ise akciğer makrometastaz sayısını kontrol, yalnız PU-H71 ve yalnız RT gruplarına göre anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi (Şekil 48).



Şekil 48: 4TBM hücre hattıyla oluşturulan ortotopik metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının akciğer makrometastazları üzerine etkisi.

4.15. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Tümör Dokusundaki HIF-1 α Düzeylerine Etkisi

4TBM hücreleriyle oluşturulan fare metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve tek doz RT ile kombine uygulamasının tümör dokusunda HIF-1 α ekspresyonuna etkisi de incelendi. Farelerden alınan tümör dokularından lizat elde edildikten sonra HIF-1 α değerleri ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Tedavi grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 49).



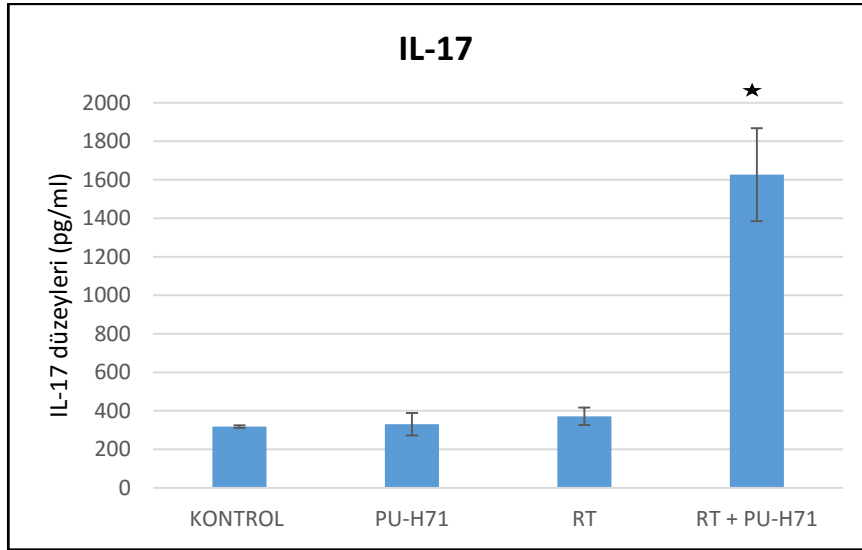
Şekil 49: 4TBM hücre hattıyla oluşturulan ortotopik metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının tümör dokusunda HIF-1 α ekspresyonu üzerine etkisi.

4.16. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan Sitokinlere Etkisi

4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerden alınan dalak ve aksiller lenf nodlarından miks lökosit kültürleri oluşturulduktan sonra toplanan süpernatantlardan pro-inflamatuar sitokinlerden IL-6, IL-17 ve TNF- α ile anti-tümöral sitokinlerden IL-10 ve IFN- γ düzeylerine bakıldı.

4.16.1. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan IL-17 Düzeylerine Etkisi

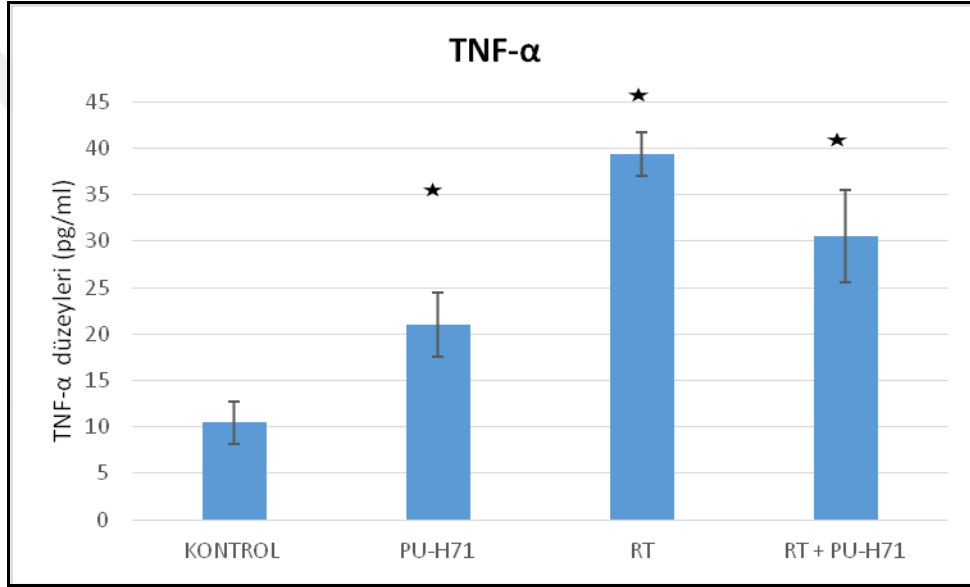
Yalnız PU-H71 ve yalnız RT ile tedavi edilen 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinden alınan süpernatantlarda kontrol grubu farelere göre Konkavalin A ile indüklenen IL-17 sekresyonlarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 50). PU-H71 ile RT kombine tedavisi uygulanan farelerin miks lökosit kültürlerinden alınan süpernatantlarda ise kontrol grubu farelere göre IL-17 sekresyonlarında anlamlı bir artış gözlemlendi (*, $p < 0,05$).



Şekil 50: PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde IL-17 düzeylerine etkisi.

4.16.2. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan TNF- α Düzeylerine Etkisi

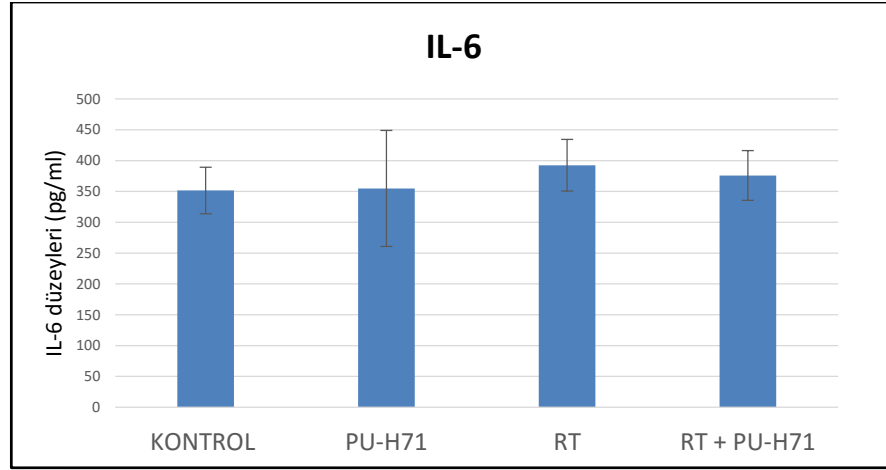
Hem tek başına PU-H71 ve RT hem de kombine tedavi alan 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinden alınan süpernatantlarda kontrol grubu farelere göre ışınlanmış-4TBM hücreleri ile indüklenen TNF- α sekresyonlarında şekil 51'de görüldüğü gibi anlamlı bir artış gözlemlendi (*, $p < 0,05$).



Şekil 51: PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde TNF- α düzeylerine etkisi.

4.16.3 Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan IL-6 Düzeylerine Etkisi

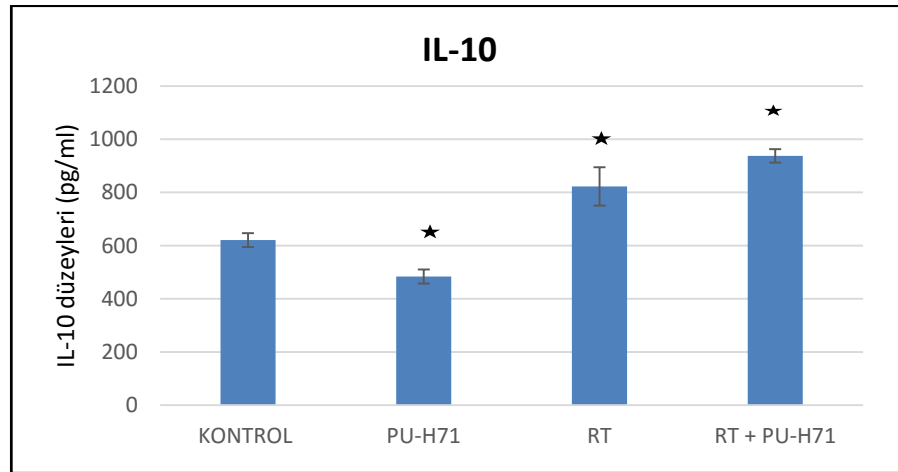
Hem tek başına PU-H71 ve RT hem de kombine tedavi alan 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinden alınan süpernatantlarda kontrol grubu farelere göre LPS ile indüklenen IL-6 sekresyonlarında şekil 52'te görüldüğü gibi anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.



Şekil 52: PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde IL-6 düzeylerine etkisi.

4.16.4. Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan IL-10 Düzeylerine Etkisi

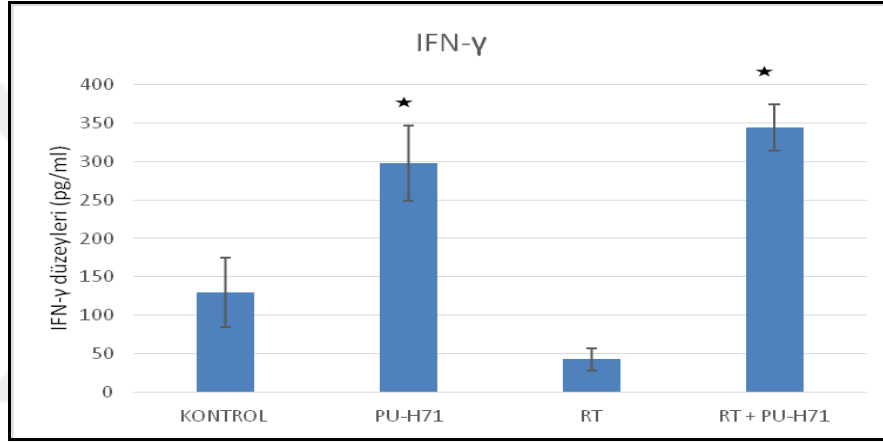
Yalnız PU-H71 ile tedavi edilen 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinden salınan süpernatantlarda kontrol grubu farelere göre ışınlanmış-4TBM hücreleri ile indüklenen IL-10 sekresyonlarında anlamlı bir azalma gözlemlendi. Yalnız RT ve PU-H71 ile RT kombine tedavisi uygulanan farelerin miks lökosit kültürlerinden salınan süpernatantlarda kontrol grubu farelere göre IL-10 sekresyonlarında anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 53) (*, $p < 0,05$).



Şekil 53: PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde IL-10 düzeylerine etkisi.

4.16.5 Metastatik Meme Kanseri Modelinde PU-H71'in Tek Başına ve RT ile Kombine Uygulamasının Miks Lökosit Kültürlerinden Salınan IFN- γ Düzeylerine Etkisi

Yalnız PU-H71 ve PU-H71 ile RT kombine tedavisi alan 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinden alınan süpernatantlarda kontrol grubu farelere göre ışınlanmış-4TBM hücreleri ile indüklenen IFN- γ sekresyonlarında anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 54) (*, $p < 0,05$).



Şekil 54: PU-H71 ve RT uygulamasının 4TBM metastatik meme kanseri modeli oluşturulan farelerin miks lökosit kültürlerinde IFN- γ düzeylerine etkisi.

5. TARTIŞMA

HSP90, 90 kDa ağırlığında total hücresel proteinlerin %1-2'sini oluşturan, tüm hücreler için gerekli bir şaperon proteindir (McClellan ve ark., 2007). Stres koşullarında ekspresyonu artar ve hücredeki proteinlerin degradasyonunu önleyerek hücresel aktivitenin devamlılığı sağlanmaktadır (Gooljarsingh ve ark., 2006). Kanseri hücrelerinde de HSP90 ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (Ferrarini ve ark., 1992). Kanseri hücrelerinin proliferasyon, anjiogenez ve metastazında rol oynayan birçok proteinin koruyuculuğunu üstlenen HSP90'nın ekspresyonunun artması kanseri hücrelerinin değişen stres koşullarına uyum sağlamasını kolaylaştırmaktadır. Dolayısıyla HSP90 proteininin fonksiyonunun bozulmasına neden olan HSP90 inhibitörleri kanseri tedavisinde umut vadeden yeni bir terapötik hedef olarak görülmektedir.

Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin sebepleri arasında ikinci sırada yer alan metastatik meme kanseri lenf düğümü, akciğer, karaciğer, kemik ve beyin gibi hayati organlara metastaz yapmaktadır. Metastazı önleyebilecek ya da tedavi edebilecek bir yöntem ne yazık ki henüz bulunamamıştır. Kanseri hastaları primer tümör nedeniyle değil daha çok tümörün oluşturduğu metastazlar nedeniyle kaybedilmektedir.

HSP90 inhibitörleri tek bir proteini hedef alıyormuş gibi görünse de aslında HSP90'nın koruyuculuğunu üstlendiği, kanseri gelişiminde rol oynayan birçok proteinin işlevini etkileyerek anti-kanseri özellik göstermektedir. Bu nedenle tek bir kanseri tipine ya da monoklonal antikorlar gibi tek bir moleküle özgü değildir. HSP90 inhibitörlerinin en göze çarpan özelliklerinden biri kanseri hücrelerine normal hücrelerden daha fazla afinite göstermesidir (Kamal ve ark., 2003; Moulick ve ark., 2011). İlk geliştirilen geldanamisin bazlı HSP90 inhibitörleri güçlü anti-kanseri özellik göstermelerine rağmen klinik çalışmalarda ciddi yan etki oluşturdıkları için yeni nesil HSP90 inhibitörlerine ihtiyaç duyulmuştur.

Yeni nesil HSP90 inhibitörlerinden biri pürin bazlı bir HSP90 inhibitörü olan PU-H71'dir. Şimdiye kadar yapılan in vivo çalışmalarda ciddi bir toksik etki gözlenmemiştir ve klinikte faz I aşamasına geçmiştir. Tümör hücrelerine afinitesinin daha yüksek olması ve kullanımına ara verildikten sonra direnç gelişmemesi PU-H71'in göze çarpan önemli avantajlarıdır (Caldas-Lopes ve ark., 2009; Moulick ve ark., 2011). Bu nedenle

çalışmamızda yeni bir HSP90 inhibitörü olan PU-H71'i kullanmayı uygun gördük. HSP90 inhibitörleri ile yapılan birçok in vitro ve in vivo çalışmada kanser hücrelerini RT'ye daha duyarlı hale getirdikleri gözlenmiştir (Kim ve Pyo, 2012; Machida ve ark., 2003; Matsumoto ve ark., 2005; Russell ve ark., 2003; Sauvageot ve ark., 2009). Bu nedenle çalışmamızda PU-H71 ile RT'yi kombine ederek hem in vitro hem de in vivo etkilerini değerlendirdik. HSP90 inhibitörleri ile kanser tedavisi üzerine yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde ya da sistemik olarak immün hücrelerde ne gibi immünolojik etkiler oluşturduğu ne yazık ki çok fazla incelenmemiştir. Kanserle mücadelede immün sistemin ne kadar önemli bir rol oynadığı göz önüne alınırsa kanser tedavisini amaçlayan aday ilaçların immünolojik etkilerinin araştırılmaması bu alanda büyük bir boşluk oluşturmaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda PU-H71'in hem tek başına hem de RT ile birlikte metastatik meme kanseri hücre hatlarında MIP-2, SDF ve VEGF gibi anjiogenik faktörler üzerine etkisini inceledik. Bunun yanı sıra 4TBM hücre hattıyla oluşturduğumuz ortotopik metastatik meme kanseri modelinde miks lökosit kültürü yaparak kombine tedavinin pro-inflamatuar ve anti-tümöral mediatörlere etkisini de araştırdık. Ayrıca PU-H71'in tek başına ve RT ile birlikte kullanımının tümör büyümesi ve akciğer makrometastazları üzerine etkisini de araştırdık. Çalışmamızda PU-H71'in etkinliğini eski bir HSP90 inhibitörü olan geldanamisin bazlı 17-AAG ile karşılaştırdık. Ayrıca proliferasyon çalışmalarında metastatik hücrelerin yanı sıra bir de non-metastatik hücre hattı 67NR'yi kullandık.

Çalışmalarımız sonucunda 17-AAG ve PU-H71 doza bağlı olarak fare metastatik meme kanseri hücre hatları 4T1, 4THM, 4TLM, 4TBM ile non-metastatik fare meme kanseri hücre hattı 67NR'de proliferasyonu baskıladı. IC50 değerleri karşılaştırıldığında non-metastatik olan 67NR hücrelerinin IC50 değerinin hem 17-AAG hem de PU-H71 için metastatik hücrelere göre daha yüksek olduğu görüldü. Dolayısıyla metastatik hücrelerin HSP90 inhibitörlerine daha duyarlı olduğu söylenebilir. 17-AAG ile PU-H71'in metastatik hücrelerdeki IC50 değerlerini karşılaştırdığımızda 4TBM ve 4TLM hücrelerinde PU-H71'in 17-AAG'ye göre daha etkin olduğu sonucunu çıkarabiliriz.

HSP90 inhibitörlerinin kanser hücrelerinin RT'ye duyarlılığına etkisini belirlemek için literatürde koloni oluşturma deneyleri yapılmaktadır. Biz de çalışmamızda 4THM, 4TBM ve 4TLM hücre hatlarında PU-H71'in RT'ye duyarlılığı arttırıp arttırmadığını iki

farklı doz kullanarak değerlendirdik. Proliferasyon sonuçlarını değerlendirdiğimizde PU-H71'in 0,1 μ M dozunu 4THM, 4TBM ve 4TLM hücreleri için etkin doz olarak belirlemiştik. Ancak RT ile birlikte kullanıldığında bu dozun hücreler üzerinde öldürücü etki oluşturabileceğini düşünerek normalde etkin olmayan 0,01 μ M dozunu da uygulamayı uygun gördük. Neticede PU-H71'in, 4THM, 4TBM ve 4TLM hücrelerinde 0,1 μ M dozunda RT'ye duyarlılığı arttırdığını gördük. Benzer şekilde Segawa ve ark. insan akciğer kanser hücre hatları SQ-5 ve A-549 ile yaptıkları çalışmada bu hücrelerde PU-H71'in RT'ye duyarlılığını arttırdığını göstermişlerdir (Segawa ve ark., 2014).

PU-H71'in tek başına ve RT ile kombine uygulamasının fare metastatik meme kanser hücrelerinde proliferasyon ve sitokin salınımında rol oynayan hücre içi sinyal yolak proteinlerine etkisini görmek için Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonunu değerlendirdik. PU-H71'in 1 μ M dozunda Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonunu azalttığını gözlemledik. Ayrıca HSP90'nın hedef proteinlerinden N-kadherin ve HER2 ekspresyonları üzerine de PU-H71'in etkisini inceledik. PU-H71'in 1 μ M dozunda N-kadherin ve HER2 ekspresyonlarını da inhibe ettiğini belirledik. Sonuçlarımıza benzer şekilde MDA-MB-231, SKBR3, BT-474 ve MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatlarında HSP90 inhibitörlerinin doza bağlı olarak ERK1/2 ve Akt fosforilasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Caldas-Lopes ve ark., 2009; Huang ve ark., 2015). Başka bir çalışmada kolon kanseri hücrelerinde 17-AAG'nin epitelyal mezenkimal geçişte önemli rol oynayan ve HSP90'nın bir hedef proteini olan N-kadherin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Liu X ve ark., 2016). Bazı meme kanserlerinde yüksek oranda eksprese olan HER2'nin yeni bir HSP90 inhibitörü FW-04-806 tedavisi ile ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Huang ve ark., 2015).

PU-H71 ve RT'yi birlikte kullanarak ERK1/2 ve p38 fosforilasyonuna etkisini incelediğimizde ise ERK1/2 fosforilasyonunun PU-H71'in göreceli olarak yüksek dozları ile azaldığını, bu etkinin RT ile arttığını gözlemledik. p38 fosforilasyonunun ise PU-H71'in göreceli olarak yüksek dozlarında arttığını, bu artışın kombine tedavi ile daha da fazla olduğunu gözlemledik. PU-H71 ile RT'yi kombine kullandığımız durumlarda hücre ölümünü engellemek için daha düşük dozlarda PU-H71 kullandık. Dolayısıyla 0,1 μ M ve düşük dozlar p38'in fosforilasyonunu engellemek için yeterli gelmemiş olabilir. Etki RT'den kaynaklı olabilir.

PU-H71 ve RT kombine tedavisinin 4TBM, 4TLM ve 4THM hücrelerinden salınan anjiogenik faktörler üzerindeki etkilerini VEGF, SDF ve MIP-2 düzeylerini inceleyerek belirledik. 4TLM hücrelerinde tek başına PU-H71 uygulaması MIP-2 ve VEGF salınımını arttırmıştır diğer hücrelerde tek başına belirgin bir etki göstermemiştir. Ancak PU-H71 ve RT kombine uygulaması tüm hücrelerde anjiogenik faktörlerin artmasına sebep olmuştur. Anjiogenik faktörlerin artışı kanser tedavisinde istenilmeyen bir durumdur. PU-H71'in RT ile kombinasyonu proliferasyon açısından olumlu sonuçlar gösterse de anjiogenik faktörlerin artışına sebep olması kanser tedavisini sınırlayıcı etkilere neden olabilir.

Ne yazık ki in vitro koşullar gerçek durumu yansıtmada konusunda yetersiz kalmaktadır. Ex vivo çalışmaların in vivo ortamı taklit etme konusunda in vitro'dan çok daha başarılı olacağını göz önüne alarak 4TLM hücreleriyle ortotopik model oluşturulup ex vivo kültürler oluşturduk. PU-H71 tek başına uygulandığında pro-inflamatuar bir sitokin olan IL-6 salınımını azalttığını, RT ve kombine tedavinin ise IL-6 salınımını anlamlı şekilde arttırdığını gözlemledik. RT tek başına MIP-2 ve VEGF düzeylerini arttırdı. Yalnız PU-H71 uygulaması VEGF ve MIP-2 düzeylerinde bir değişiklik oluşturmazken RT ile indüklenen VEGF ve MIP-2 düzeylerindeki artışı ise engelledi. PU-H71, RT ile kombine kullanıldığında in vitro çalışmalarda anjiogenik faktörleri arttırmıştır. Ex vivo çalışmalarda ise RT'nin oluşturduğu artışın geri dönmesine neden olmuştur. HSP90 inhibitörlerinin anjiogenik faktörler üzerine etkisine dair çok az çalışma vardır. Bu çalışmaların birinde MDA-MB-231 hücrelerinde hipoksik durumlarda VEGF salınımının PU-H71 ile anlamlı şekilde azaldığı ancak normoksik durumda anlamlı bir fark oluşturmadağı bildirilmiştir (Azoitei ve ark., 2014). HSP90 inhibitörlerinin HUVEC hücrelerinin tübül formasyonunu inhibe ettiğini bilinmektedir (Okawa ve ark., 2009). Dolayısıyla çalışmamızda PU-H71'in anjiogenik faktörlerin salınımını azaltmasını bekledik. Hücre kültürlerinde hipoksik koşullar oluşturmadağı için anjiogenik faktörlerin tetiklenmesine neden olamamış olabiliriz. Bunun yanı sıra RT ile anjiogenezin arttığına dair birçok çalışma bulunmaktadır (Sofia Vala ve ark., 2010). Kombine tedavi uyguladığımız hücrelerde anjiogenik faktörlerin artması HSP90 inhibitörünün etkisinden çok RT'nin etkisinden kaynaklanabilir.

PU-H71 ve RT kombine tedavisinin in vivo koşullardaki etkisine dair yapılan bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Dolayısıyla çalışmamız metastatik meme kanser modelinde PU-H71 ve RT'nin kombine kullanımının tümör büyümesi, akciğer metastazı ve immünolojik etkilerini gösteren ilk çalışmadır.

İn vivo sonuçlarımıza baktığımızda PU-H71 tek başına uygulandığında kontrol grubuna göre tümör büyümesini anlamlı olarak geciktirmiştir. PU-H71 ve RT kombine tedavisi ise kontrol, yalnız PU-H71 ve yalnız RT gruplarıyla kıyaslandığında tümör büyümesi anlamlı şekilde geciktirmiştir. Sonuçlarımıza benzer olarak diğerk HSP90 inhibitörlerinin RT ile birlikte kullanıldığında etkinliğin arttığına dair farklı kanser modellerinde yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların birinde HSP90 inhibitörü NW457'nin CT26 kolorektal kanser modelinde RT ile kombine kullanıldığında tümör büyümesini tek başına RT'ye göre anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (Kinzel ve ark., 2016). Başka bir çalışmada HSP90 inhibitörü Ganetespib'in RT ile kombine kullanımında HepG2 karaciğer kanseri modelinde supra-aditif etki gösterdiği bildirilmiştir (Chettiar ve ark., 2016). Gandhi ve ark. yaptıkları çalışmada prostat kanser modeli oluşturulmuş farelerde HSP90 inhibitörü AUY-922'nin RT ile kombine kullanımının tümör büyümesinde supra-aditif etki gösterdiklerini bildirmişlerdir (Gandhi ve ark., 2013).

Çalışmamızın metastaz açısından etkisi değerlendirildiğinde tek başına PU-H71 akciğer makrometastaz sayısında anlamlı bir değışiklik oluşturmazken PU-H71 ve RT kombine tedavisi RT'ye göre anlamlı şekilde akciğer makrometastazlarını azalttı. HSP90 inhibitörleri ve RT kombine kullanımının in vivo modellerde metastaz üzerine etkisine dair çalışmaya rastlanmamıştır. Tek başına kullanılan HSP90 inhibitörlerinin tümör modellerinde metastaza etkisine dair ise çok az çalışma vardır. Bunlardan biri küçük hücreli akciğer kanseri ile oluşturulmuş kanser modelinde HSP90 inhibitörü 17-DMAG'ın karaciğer metastazlarını azalttığını gösteren çalışmadır (Takeuchi ve ark., 2016).

Tümörün kendisinden, mikroçevresinden ve çeşitli immün hücrelerden salgılanan sitokinler kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bunların bir kısmı tümör gelişiminde birbirine zıt yönlü etkiler gösterebilmektedir. Bu durumda tümörün tipi, hangi aşamada olduğu ve uygulanan tedaviler gibi birçok faktör immün sistemin kansere karşı geliştirdiğı yanıtı değıştirebilir veya yönlendirebilir. HSP'lerin immün sistem

üzerinde de önemli rol oynadıkları bilinmektedir. HSP'ler antijen sunumunda, makrofaj ve lenfositlerin aktivasyonunda, dendritik hücrelerin olgunlaşması ve aktivasyonunda görev alırlar. Bu nedenle çalışmamızda HSP90 inhibitörünün tümör büyümesi ve metastaza olan etkileriyle birlikte immün hücrelerden salınan sitokinler üzerinde nasıl bir etki oluşturduğunu da araştırdık.

İn vivo çalışmalarımızda 4TBM meme kanser modeli oluşturduğumuz farelerin dalak ve lenf nodlarından elde edilen miks lökosit kültür süpernatantlarında IL-17'nin kombine tedavi ile anlamlı bir şekilde arttığını gözlemledik. Pro-inflamatuar bir sitokin olarak bilinen IL-17'nin hem tümör progresyonunu artırıcı hem de anti-tümoral etkilerinin bulunduğunu bildiren çalışmalar vardır (Qian ve ark., 2015). HSP90 inhibitörlerinin IL-17 üzerine etkisine dair yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. IL-17'nin T lenfositlerini çağırdığını, doğal öldürücü hücrelerin aktivitesi arttırdığını ve sitotoksik T lenfositlerinin olgunlaşmasına ve aktivasyonuna neden olduğunu düşündüğümüzde PU-H71 ve RT kombine kullanımının tümöre karşı oluşturulan immüniteyi desteklediğini söyleyebiliriz.

TNF- α da IL-17'ye benzer olarak kanser gelişiminde çift taraflı bir rol oynamaktadır. Kronik olarak sentezlendiğinde farklı, lokal olarak yüksek doz uygulandığında farklı etkiler oluşturabilmektedir. Örneğin rekombinant TNF- α lokal olarak tekrarlayan dozlarda uygulandığında tümör modellerinde tümör nekrozunu indüklemiştir. Bunun aksine düşük doz ve kronik TNF- α uygulaması anjiogenik aktivite göstermiş ve tümör progresyonunu arttırmıştır (Wu ve Zhou , 2010). Ancak tümör mikroçevresindeki TNF- α 'nın tümör oluşumunu ve progresyonunu indüklediği ve tümör anjiogenezini arttırdığı bilinmektedir. Oluşturduğumuz miks lökosit kültürlerinde hem tek başına tedavilerde (PU-H71 veya RT) hem de kombine tedavide TNF- α anlamlı olarak artış gösterdi. Çalışmamızda in vitro tümör hücre proliferasyonu ve in vivo tümör büyümesinde etkili olan PU-H71'in ve RT ile kombine kullanımının TNF- α 'ya yönelik immünolojik etkileri anti-tümöral tedaviyi engelleyici etki gösterebilir.

Anti-inflamatuar bir sitokin olan IL-10'un da kanser gelişiminde çift yönlü bir etkisi vardır (Mannino ve ark., 2015). Çalışmamızda miks lökosit kültür süpernatantlarında yalnız PU-H71'in IL-10 salınımını anlamlı şekilde azalttığı, yalnız RT ve kombine tedavinin ise IL-10 düzeylerini anlamlı şekilde arttırdığını gördük. İnflamatuar bir

mediatör olan TNF- α ile anti-inflamatuar bir sitokin olan IL-10 birbirlerinin etkisini zıt yönde etki gösteriyor olabilir.

IFN- γ anti-tümöral etkisini direkt antianjiogenik ve antiproliferatif özellikleriyle göstermektedir (Bekisz ve ark., 2013). Oluşturduğumuz miks lökosit kültür süpernatantlarında IFN- γ salınımı yalnız PU-H71 ve kombine tedavi ile anlamlı şekilde artmıştır. IFN- γ güçlü anti-tümöral özelliğinden dolayı klinikte çeşitli kanser tedavilerinde denenmiştir ancak FDA'dan onay alamamıştır. Dolayısıyla PU-H71'in IFN- γ salınımını arttırması tümör gelişimde immünolojik olarak da etkin rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

HSP90 inhibitörlerinin hücre kültürlerinde immünolojik etkilerine dair çok az sayıda çalışma vardır. HSP90 inhibitörlerinin tek başına ya da RT veya farklı kemoterapötiklerle birlikte kanser modellerinde immünolojik etkilerini inceleyen bir yayına rastlanmamıştır. Bu durumda çalışmamız bu konuda yapılan ilk çalışmadır. Sonuçlarımızın daha iyi değerlendirebilmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. HSP90 inhibitörleri 17-AAG ve PU-H71 fare metastatik ve non-metastatik meme kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak proliferasyonu azaltmıştır.
2. PU-H71 ve RT kombine kullanıldığında fare metastatik meme kanseri hücrelerinde proliferasyon üzerinde supra-aditif etki göstermiştir.
3. PU-H71 fare metastatik meme kanseri hücrelerinde RT ile uygulandığında koloni oluşumunu azaltmış ve kanser hücrelerini RT'ye duyarlı hale getirmiştir.
4. PU-H71 metastatik meme kanseri hücrelerinde HSP90 ekspresyonunu değiştirmemiştir ancak HSP90 fonksiyonunun inhibisyonunu kompanse etmek için doza bağlı olarak HSP70 ekspresyonunu arttırmıştır.
5. Fare metastatik meme kanseri hücre hatlarında PU-H71, Akt, ERK1/2 ve p38 fosforilasyonunu azaltmıştır.
6. Fare metastatik meme kanseri hücre hatlarında PU-H71, HSP90 hedef proteinleri N-kadherin ve HER2 ekspresyonunu azaltmıştır.
7. Fare metastatik meme kanseri hücre hatlarında PU-H71 ve RT kombine uygulandığında HSP90 ekspresyonlarını değiştirmemiştir, doza bağlı olarak HSP70 ekspresyonlarını arttırmıştır.
8. PU-H71 ve RT kombine uygulandığında meme kanseri hücre hatlarından anjiogenik faktörlerin salınımını arttırmıştır.
9. Metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in RT ile kombine uygulaması tümör büyümesini ve akciğer metastazlarını azaltmıştır.
10. Metastatik meme kanseri modelinde PU-H71'in RT ile kombine uygulaması miks lökosit kültürlerinden salınan pro-inflamatuar ve anti-tümöral sitokinlerin artışına neden olmuştur.

HSP90 inhibitörleri ve RT kombine kullanımına dair in vitro ve in vivo çalışmalarda bizim çalışmamızda da olduğu gibi umut vadeden sonuçlar vardır. HSP90 inhibitörleri ve RT kombine kullanımının özellikle immünolojik mekanizmalara etkisine dair çok az sayıda çalışma olması nedeniyle sonuçlarımızın daha detaylı değerlendirilebilmesi için bu konuda yapılacak daha fazla çalışmaya gereksinim duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Andrews JL, Kim AC, Hens JR. 2012. The role and function of cadherins in the mammary gland. *Breast Cancer Res* 14: 203.

Azoitei N, et al. 2014. HSP90 supports tumor growth and angiogenesis through PRKD2 protein stabilization. *Cancer Res* 74: 7125-7136.

Banerji U, et al. 2005. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 23: 4152-4161.

Bekisz J, Sato Y, Johnson C, Husain SR, Puri RK, Zoon KC. 2013. Immunomodulatory effects of interferons in malignancies. *J Interferon Cytokine Res* 33: 154-161.

Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. 2005. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 9: 777-794.

Caldas-Lopes E, et al. 2009. Hsp90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8368-8373.

Calderwood SK. 2013. Molecular cochaperones: tumor growth and cancer treatment. *Scientifica (Cairo)* 2013: 217513.

Candido J, Hagemann T. 2013. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol* 33 Suppl 1: S79-84.

Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM. 2010. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29: 751-759.

Cerchietti LC, et al. 2009. A purine scaffold Hsp90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas. *Nature Medicine* 15: 1369-U1363.

Chatterjee A, Dimitropoulou C, Drakopanayiotakis F, Antonova G, Snead C, Cannon J, Venema RC, Catravas JD. 2007. Heat shock protein 90 inhibitors prolong survival, attenuate inflammation, and reduce lung injury in murine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 667-675.

Chen S, Smith DF. 1998. Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* 273: 35194-35200.

Chettiar ST, et al. 2016. Ganetespib radiosensitization for liver cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 17: 457-466.

Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. 1989. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-1478.

da Silva VC, Ramos CH. 2012. The network interaction of the human cytosolic 90 kDa heat shock protein Hsp90: A target for cancer therapeutics. *J Proteomics* 75: 2790-2802.

De Larco JE, Wuertz BR, Furcht LT. 2004. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clin Cancer Res* 10: 4895-4900.

DeBoer C, Meulman PA, Wnuk RJ, Peterson DH. 1970. Geldanamycin, a new antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 23: 442-447.

Di K, Keir ST, Alexandru-Abrams D, Gong X, Nguyen H, Friedman HS, Bota DA. 2014. Profiling Hsp90 differential expression and the molecular effects of the Hsp90 inhibitor IPI-504 in high-grade glioma models. *J Neurooncol* 120: 473-481.

Dillon RL, White DE, Muller WJ. 2007. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 26: 1338-1345.

Dimopoulos MA, Mitsiades CS, Anderson KC, Richardson PG. 2011. Tanespimycin as antitumor therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 11: 17-22.

Djuzenova CS, Blassl C, Roloff K, Kuger S, Katzer A, Niewidok N, Gunther N, Polat B, Sukhorukov VL, Flentje M. 2012. Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 enhances radiation sensitivity of tumor cell lines under hypoxia. *Cancer Biol Ther* 13: 425-434.

Driscoll KE. 1994. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp Lung Res* 20: 473-490.

Erin N, Boyer PJ, Bonneau RH, Clawson GA, Welch DR. 2004. Capsaicin-mediated denervation of sensory neurons promotes mammary tumor metastasis to lung and heart. *Anticancer Res* 24: 1003-1009.

Erin N, Korcum AF, Tanriover G, Kale S, Demir N, Koksoy S. 2015. Activation of neuroimmune pathways increases therapeutic effects of radiotherapy on poorly differentiated breast carcinoma. *Brain Behav Immun* 48: 174-185.

Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. 1992. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 51: 613-619.

Fizman GL, Jasniss MA. 2011. Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer. *Int J Breast Cancer* 2011: 352182.

Formenti SC, Demaria S. 2009. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* 10: 718-726.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1: 2315-2319.

Gallerne C, Prola A, Lemaire C. 2013. Hsp90 inhibition by PU-H71 induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway in cancer cells and overcomes the resistance conferred by Bcl-2. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1356-1366.

Gandhi N, et al. 2013. Novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 radiosensitizes prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther* 14: 347-356.

Garcia-Morales P, Carrasco-Garcia E, Ruiz-Rico P, Martinez-Mira R, Menendez-Gutierrez MP, Ferragut JA, Saceda M, Martinez-Lacaci I. 2007. Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G(2)/M arrest in glioblastoma cell lines. *Oncogene* 26: 7185-7193.

Giubellino A, Sourbier C, Lee MJ, Scroggins B, Bullova P, Landau M, Ying W, Neckers L, Trepel JB, Pacak K. 2013. Targeting heat shock protein 90 for the treatment of malignant pheochromocytoma. *PLoS One* 8: e56083.

Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. 2003. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol* 14: 1169-1176.

Gooljarsingh LT, et al. 2006. A biochemical rationale for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors: slow, tight binding inhibition by geldanamycin and its analogues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7625-7630.

Gupta J, Nebreda AR. 2015. Roles of p38alpha mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *FEBS J* 282: 1841-1857.

Ha K, Fiskus W, Rao R, Balusu R, Venkannagari S, Nalabothula NR, Bhalla KN. 2011. Hsp90 inhibitor-mediated disruption of chaperone association of ATR with hsp90 sensitizes cancer cells to DNA damage. *Mol Cancer Ther* 10: 1194-1206.

Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. 1997. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun* 4: 399-411.

Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. 2000. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148: 779-790.

Hertlein E, et al. 2010. 17-DMAG targets the nuclear factor-kappaB family of proteins to induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia: clinical implications of HSP90 inhibition. *Blood* 116: 45-53.

Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G. 2010. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J Leukoc Biol* 87: 501-508.

Huang W, Wu QD, Zhang M, Kong YL, Cao PR, Zheng W, Xu JH, Ye M. 2015. Novel Hsp90 inhibitor FW-04-806 displays potent antitumor effects in HER2-positive breast cancer cells as a single agent or in combination with lapatinib. *Cancer Lett* 356: 862-871.

Hwang A, Muschel RJ. 1998. Radiation and the G2 phase of the cell cycle. *Radiat Res* 150: S52-59.

Jackson SE. 2013. Hsp90: structure and function. *Top Curr Chem* 328: 155-240.

Jameel A, Skilton RA, Campbell TA, Chander SK, Coombes RC, Luqmani YA. 1992. Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer. *Int J Cancer* 50: 409-415.

Jego G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. 2013. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 332: 275-285.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90.

Joshi P, Maidji E, Stoddart CA. 2016. Inhibition of Heat Shock Protein 90 Prevents HIV Rebound. *J Biol Chem* 291: 10332-10346.

Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, Burrows FJ. 2003. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 425: 407-410.

Karu T. 1999. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 49: 1-17.

Kim YM, Pyo H. 2012. Cooperative enhancement of radiosensitivity after combined treatment of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin and celecoxib in human lung and colon cancer cell lines. *DNA Cell Biol* 31: 15-29.

Kinzel L, et al. 2016. A novel HSP90 inhibitor with reduced hepatotoxicity synergizes with radiotherapy to induce apoptosis, abrogate clonogenic survival, and improve tumor control in models of colorectal cancer. *Oncotarget*.

Kobayashi Y. 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 13: 2400-2407.

Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. 2007. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C987-995.

Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. 2016. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol*.

Langlands FE, Horgan K, Dodwell DD, Smith L. 2013. Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. *Br J Radiol* 86: 20120601.

Lee S, Margolin K. 2011. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)* 3: 3856-3893.

Lee Y, et al. 2009. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8+ T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood* 114: 589-595.

Li J, Buchner J. 2013. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomed J* 36: 106-117.

Lin RC, Rosenfeld PJ. 2007. Antiangiogenic therapy in neovascular age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin* 47: 117-137.

Liu X, et al. 2016. Acquired resistance to HSP90 inhibitor 17-AAG and increased metastatic potential are associated with MUC1 expression in colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 27: 417-426.

Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77: 638-643.

Machelon V, et al. 2011. CXCL12 expression by healthy and malignant ovarian epithelial cells. *BMC Cancer* 11: 97.

Machida H, Matsumoto Y, Shirai M, Kubota N. 2003. Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, sensitizes human tumour cells to radiation. *Int J Radiat Biol* 79: 973-980.

Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. 2009. Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer* 100: 1523-1529.

Mandrekar P, Catalano D, Jeliaskova V, Kodys K. 2008. Alcohol exposure regulates heat shock transcription factor binding and heat shock proteins 70 and 90 in monocytes and macrophages: implication for TNF-alpha regulation. *J Leukoc Biol* 84: 1335-1345.

Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. 2015. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett* 367: 103-107.

Martin HL, Smith L, Tomlinson DC. 2014. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 6: 1-13.

Matsumoto Y, Machida H, Kubota N. 2005. Preferential sensitization of tumor cells to radiation by heat shock protein 90 inhibitor geldanamycin. *J Radiat Res* 46: 215-221.

McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J. 2007. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131: 121-135.

McCubrey JA, et al. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1263-1284.

Mimnaugh EG, Chavany C, Neckers L. 1996. Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin. *J Biol Chem* 271: 22796-22801.

Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasberg R, Massague J. 2005. Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest* 115: 44-55.

Moasser MM. 2007. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26: 6469-6487.

Moulick K, et al. 2011. Affinity-based proteomics reveal cancer-specific networks coordinated by Hsp90. *Nat Chem Biol* 7: 818-826.

Mueller H, Flury N, Eppenberger-Castori S, Kueng W, David F, Eppenberger U. 2000. Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients. *Int J Cancer* 89: 384-388.

Neckers L. 2007. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci* 32: 517-530.

Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, Cros J, Faivre S, Raymond E. 2014. MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacol Ther* 141: 160-171.

Nicosia RF. 1998. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol* 153: 11-16.

Noh H, Kim HJ, Yu MR, Kim WY, Kim J, Ryu JH, Kwon SH, Jeon JS, Han DC, Ziyadeh F. 2012. Heat shock protein 90 inhibitor attenuates renal fibrosis through degradation of transforming growth factor-beta type II receptor. *Laboratory Investigation* 92: 1583-1596.

Okawa Y, et al. 2009. SNX-2112, a selective Hsp90 inhibitor, potently inhibits tumor cell growth, angiogenesis, and osteoclastogenesis in multiple myeloma and other hematologic tumors by abrogating signaling via Akt and ERK. *Blood* 113: 846-855.

Okayasu R, Hirakawa H, Masaoka A, Noguchi M, Hirayama R, Li H, Matsumoto Y, Fujimori A. 2014. Hsp90 inhibitor is a good candidate for effective combination therapy with carbon ions. *J Radiat Res* 55 Suppl 1: i59-i60.

Palacios-Arreola MI, Nava-Castro KE, Castro JI, Garcia-Zepeda E, Carrero JC, Morales-Montor J. 2014. The role of chemokines in breast cancer pathology and its possible use as therapeutic targets. *J Immunol Res* 2014: 849720.

Paul S, Mahanta S. 2014. Association of heat-shock proteins in various neurodegenerative disorders: is it a master key to open the therapeutic door? *Mol Cell Biochem* 386: 45-61.

Petrikaite V, Matulis D. 2011. Binding of natural and synthetic inhibitors to human heat shock protein 90 and their clinical application. *Medicina (Kaunas)* 47: 413-420.

Pick E, Kluger Y, Giltane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. 2007. High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res* 67: 2932-2937.

Qian X, Chen H, Wu X, Hu L, Huang Q, Jin Y. 2015. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine*.

Qu Z, Wang S, Teng R, Yi X. 2014. PU-H71 effectively induces degradation of IkappaB kinase beta in the presence of TNF-alpha. *Mol Cell Biochem* 386: 135-142.

Ritossa F. 1996. Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1: 97-98.

Rodrigues LM, Chung YL, Al Saffar NM, Sharp SY, Jackson LE, Banerji U, Stubbs M, Leach MO, Griffiths JR, Workman P. 2012. Effects of HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) on NEU/HER2 overexpressing mammary tumours in MMTV-NEU-NT mice monitored by Magnetic Resonance Spectroscopy. *BMC Res Notes* 5: 250.

Russell JS, Burgan W, Oswald KA, Camphausen K, Tofilon PJ. 2003. Enhanced cell killing induced by the combination of radiation and the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin: a multitarget approach to radiosensitization. *Clin Cancer Res* 9: 3749-3755.

Sauvageot CM, et al. 2009. Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. *Neuro Oncol* 11: 109-121.

Schilling D, Bayer C, Li W, Molls M, Vaupel P, Multhoff G. 2012. Radiosensitization of normoxic and hypoxic h1339 lung tumor cells by heat shock protein 90 inhibition is independent of hypoxia inducible factor-1alpha. *PLoS One* 7: e31110.

Schulte TW, Neckers LM. 1998. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemother Pharmacol* 42: 273-279.

Seaton A, Maxwell PJ, Hill A, Gallagher R, Pettigrew J, Wilson RH, Waugh DJ. 2009. Inhibition of constitutive and cxc-chemokine-induced NF-kappaB activity potentiates ansamycin-based HSP90-inhibitor cytotoxicity in castrate-resistant prostate cancer cells. *Br J Cancer* 101: 1620-1629.

Segawa T, Fujii Y, Tanaka A, Bando S, Okayasu R, Ohnishi K, Kubota N. 2014. Radiosensitization of human lung cancer cells by the novel purine-scaffold Hsp90 inhibitor, PU-H71. *Int J Mol Med* 33: 559-564.

Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.

Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. 2010. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab* 30: 459-473.

Senju M, Sueoka N, Sato A, Iwanaga K, Sakao Y, Tomimitsu S, Tominaga M, Irie K, Hayashi S, Sueoka E. 2006. Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 132: 150-158.

Shimp SK, 3rd, Parson CD, Regna NL, Thomas AN, Chafin CB, Reilly CM, Nichole Rylander M. 2012. HSP90 inhibition by 17-DMAG reduces inflammation in J774 macrophages through suppression of Akt and nuclear factor-kappaB pathways. *Inflamm Res* 61: 521-533.

Sofia Vala I, et al. 2010. Low doses of ionizing radiation promote tumor growth and metastasis by enhancing angiogenesis. *PLoS One* 5: e11222.

Sreedhar AS, Kalmar E, Csermely P, Shen YF. 2004. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 562: 11-15.

Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L. 1995. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol* 36: 305-315.

Takeuchi S, Fukuda K, Arai S, Nanjo S, Kita K, Yamada T, Hara E, Nishihara H, Uehara H, Yano S. 2016. Organ-specific efficacy of HSP90 inhibitor in multiple-organ metastasis model of chemorefractory small cell lung cancer. *Int J Cancer* 138: 1281-1289.

Taldone T, Ochiana SO, Patel PD, Chiosis G. 2014. Selective targeting of the stress chaperome as a therapeutic strategy. *Trends Pharmacol Sci* 35: 592-603.

Terwisscha van Scheltinga AG, Berghuis P, Nienhuis HH, Timmer-Bosscha H, Pot L, Gaykema SB, Lub-de Hooge MN, Kosterink JG, de Vries EG, Schroder CP. 2014. Visualising dual downregulation of insulin-like growth factor receptor-1 and vascular endothelial growth factor-A by heat shock protein 90 inhibition effect in triple negative breast cancer. *Eur J Cancer* 50: 2508-2516.

Todorovic-Rakovic N, Milovanovic J. 2013. Interleukin-8 in breast cancer progression. *J Interferon Cytokine Res* 33: 563-570.

Tong JP, Yao YF. 2006. Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: a need for balanced expressions. *Clin Biochem* 39: 267-276.

Trendowski M. 2015. PU-H71: An improvement on nature's solutions to oncogenic Hsp90 addiction. *Pharmacol Res* 99: 202-216.

Tsai MJ, Hsu YL, Wu KY, Yang RC, Chen YJ, Yu HS, Kuo PL. 2013. Heat effect induces production of inflammatory cytokines through heat shock protein 90 pathway in cornea cells. *Curr Eye Res* 38: 464-471.

Tse AN, et al. 2008. A phase 1 dose-escalation study of irinotecan in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 14: 6704-6711.

Voellmy R, Boellmann F. 2007. Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv Exp Med Biol* 594: 89-99.

Walton-Diaz A, Khan S, Bourboulia D, Trepel JB, Neckers L, Mollapour M. 2013. Contributions of co-chaperones and post-translational modifications towards Hsp90 drug sensitivity. *Future Med Chem* 5: 1059-1071.

Wang X, Song X, Zhuo W, Fu Y, Shi H, Liang Y, Tong M, Chang G, Luo Y. 2009. The regulatory mechanism of Hsp90 α secretion and its function in tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21288-21293.

Wang YQ, Zhang XM, Wang XD, Wang BJ, Wang W. 2010. 17-AAG, a Hsp90 inhibitor, attenuates the hypoxia-induced expression of SDF-1 α and ILK in mouse RPE cells. *Mol Biol Rep* 37: 1203-1209.

Wax S, Piecyk M, Maritim B, Anderson P. 2003. Geldanamycin inhibits the production of inflammatory cytokines in activated macrophages by reducing the stability and translation of cytokine transcripts. *Arthritis Rheum* 48: 541-550.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. 2005. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5: 591-602.

Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. 1994. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8324-8328.

Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F. 2009. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res* 11: 209.

Wirk B. 2011. Heat shock protein inhibitors for the treatment of fungal infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 6: 38-44.

Wolff AC, et al. 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25: 118-145.

Wu Y, Zhou BP. 2010. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 102: 639-644.

Yan W, Xiao J, Liu T, Huang W, Yang X, Wu Z, Huang Q, Qian M. 2013. The effects of Hsp90 expression alteration on spinal metastases of breast carcinoma. *Tumour Biol* 34: 1391-1397.

Yano M, Naito Z, Yokoyama M, Shiraki Y, Ishiwata T, Inokuchi M, Asano G. 1999. Expression of hsp90 and cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett* 137: 45-51.

Yoshida S, Koga F, Tatokoro M, Kawakami S, Fujii Y, Kumagai J, Neckers L, Kihara K. 2011. Low-dose Hsp90 inhibitors tumor-selectively sensitize bladder cancer cells to chemoradiotherapy. *Cell Cycle* 10: 4291-4299.

You BC, Park SY, Lee YD, Lee JN, Hwang YJ, Park HK. 2008. The Expression of Heat Shock Protein 60 kDa in Tissues and Cell Lines of Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer* 11: 161-171.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şule	Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Soyadı	KALE	Tel no	0 536 855 12 66
Doğum tarihi	04.04.1984	e-posta	suleozkabak2003@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Tekirdağ Anadolu Öğretmen Lisesi	2002
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	2007
Yüksek lisans	-----	----
Doktora	Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Farmakoloji ABD	2016

İş deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Diş Hekimi	Özel muayenehane	2007-2010
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enst.	2011-2016

Yabancı dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	70.00

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen Kurum	Süre (yıl-yıl)
Substance P'nin anti-tümoral etkilerinin in-vivo ve in-vitro değerlendirilmesi. 109S449 (Bursiyer)	TÜBİTAK	2010-2013
HSP90 inhibitörü PU-H71'in ve radyoterapi ile kombine uygulamasının metastatik meme kanseri üzerine etkisinin hücre kültüründe araştırılması. (Araştırmacı)	BAP	2014-2016
HSP90 inhibitörlerinin tek başına ve radyoterapi ile kombine uygulamasının metastatik meme kanseri üzerine etkisinin araştırılması. (Araştırmacı)	BAP	2015-2016

Burslar-Ödüller:

1. TÜBİTAK 109S449 nolu projeden burs
2. 'Substance P Decreases Mip-2 and Sdf-1alpha Secretion From Cancer-associated Fibroblasts.' EACR 2011 En iyi poster ödülü
3. 'Activation of neuroimmune pathways increases therapeutic effects of radiotherapy on poorly differentiated breast carcinoma.' Güven Hastanesi VIII. Dr. Aysun-Ahmet Küçükkel Tıp Ödülü (2016)

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Erin N, **Kale S**, Tanrıöver G, Köksoy S, Duymuş O, Korcum AF. Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma. Breast Cancer Res Treat. 2013 Jun;139(3):677-89
2. Dalaklioglu S, Tasatargil A, **Kale S**, Tanrioever G, Dilmac S, Erin N. Metastatic breast carcinoma induces vascular endothelial dysfunction in Balb-c mice: Role of the tumor necrosis factor- α and NADPH oxidase. Vascu Pharmacol. 2013 Sep-Oct;59(3-4):103-11.
3. Erin N, Korcum AF, Tanrıöver G, **Kale S**, Demir N, Köksoy S. Activation of neuroimmune pathways increases therapeutic effects of radiotherapy on poorly differentiated breast carcinoma. Brain Behav Immun. 2015 Aug;48:174-85.

Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde sunulan ve kongre kitapçığında yayınlanan bildiriler:

1. Nuray Erin, Gamze Tanrıöver, **Şule Kale**, Özlem Duymuş. Differential Effects of Liver Metastatic and Brain Metastatic Subset of Murine Breast Carcinoma Cells American Association of Cancer Research, AACR 102. Annual Meeting 2-6 Nisan 2011, Orlando, USA
2. **Şule Kale**, Aylin Fidan Korcum, Özlem Duymuş, Adem Yavaş, Nuray Erin. Effects of Radiotherapy and Substance P on MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2) Levels in Metastatic Breast Carcinoma Cell Lines. EACR Anti-cancer Agents research Congress 13-16 Ekim 2011 Antalya
3. Özlem Duymuş, **Şule Kale**, Adem Yavaş, Nilüfer Ekinci, Nuray Erin. Tnf-alpha as well as Conditioned Medium of Liver Metastatic Tumor (4t1m) Induces Mip-2 and Sdf-1 Alpha Secretion From Mammary-pad Fibroblasts. EACR Anti-cancer Agents research Congress 13-16 Ekim 2011 Antalya
4. Adem Yavaş, Özlem Duymuş, **Şule Kale**, Nuray Erin. Intracellular Signaling Pathways in Proliferation of Metastatic Breast Cancer Cell Lines. EACR Anti-cancer Agents research Congress 13-16 Ekim 2011 Antalya
5. Nuray Erin, Özlem Duymuş, **Şule Kale**, Adem Yavaş, Nilüfer Ekinci. Substance P Decreases Mip-2 and Sdf-1alpha Secretion From Cancer-associated Fibroblasts. EACR Anti-cancer Agents research Congress 13-16 Ekim 2011 Antalya
6. Gamze Tanrıöver, Adem Yavaş, **Şule Kale**, Nuray Erin. Liver Metastatic Subset Of Murine Breast Carcinoma Cells Induces More Metastasis Than Parental Cells. EACR Anti-cancer Agents research Congress 13-16 Ekim 2011 Antalya
7. Arda Taşatargil, **Şule Kale**, Adem Yavaş, Nuray Erin. Effects of Metastatic Breast Carcinoma on Vascular Reactivity of Thoracic Aorta of Balb-c Mice. EACR Anti-cancer Agents research Congress 13-16 Ekim 2011 Antalya
8. Nuray Erin, Gamze Tanrıöver, **Şule Kale**, Özlem Duymuş, Adem Yavaş. Beyine ve Karaciğere Metastaz Yapmış Meme Kanseri Hücrelerin in-vivo ve in-vitro Etkilerinin Değerlendirilmesi: Metastatik İndeksteki ve MIP-2

Sekresyonundaki Değişiklikler. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi. 19-22 Ekim 2011 Eskişehir

9. Nuray Erin, Özlem Duymuş, **Şule Kale**, Adem Yavaş, Nilüfer Ekinici. P Maddesi Kanseri İlişkili Fibroblastlarda MIP-2 ve SDF-1alfa Sekresyonunu Azaltmaktadır: Olası anti-tümöral etki. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi. 19-22 Ekim 2011 Eskişehir
10. **Şule Kale**, Aylin F. Korcum, Özlem Duymuş, Adem Yavaş, Nuray Erin. Metastatik meme kanseri hücrelerinde radyoterapi ve SP (SubstanceP)'nin MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) üzerine etkileri. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi. 19-22 Ekim 2011 Eskişehir
11. Adem Yavaş, Özlem Duymuş, **Şule Kale**, Nuray Erin. Metastatik meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunda yer alan hücre içi sinyal yolları. . 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi. 19-22 Ekim 2011 Eskişehir
12. Arda Taşatargil, **Şule Kale**, Adem Yavaş, Nuray Erin. Metastatik ve metastatik olmayan meme kanserinin Balb-c farelerde torasik aorta damar reaktivitesine etkisi. 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi. 19-22 Ekim 2011 Eskişehir
13. Gamze Tanrıöver, Sayra Dilmaç, **Şule Kale**, Necdet Demir, Nuray Erin. C-fos protein ekspresyonunun metastatik mikroçevreyle ilişkisi var mıdır? 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. 16-19 Mayıs 2012 Denizli
14. Gamze Tanrıöver, Sayra Dilmaç, **Şule Kale**, Nuray Erin. Karaciğer metastatik hücreleri, kalp ve beyin metastatik hücrelerine göre daha hızlı hareket eder ve daha agresiftir. 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. 16-19 Mayıs 2012 Denizli
15. Korcum A.F., Erin N., **Kale Ş.**, "Effects Of Radiotherapy And Substance P On Mip-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2) Levels In Metastatic Breast Carcinoma Cell Lines", 48th ASCO Annual Meeting, , 31 Mayıs - 4 Haziran 2012, CHİCAGO, ABD
16. Sayra Dilmaç, Gamze Tanrıöver, Nuray Erin, **Şule Kale**, Özlem Duymuş, Necdet Demir. Metastatik meme kanserinde Nefronektin ve Ki67 ekspresyonlarının değerlendirilmesi. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 28-31 Mayıs 2013, Mersin
17. Gamze Tanrıöver, Sayra Dilmaç, **Şule Kale**, Özlem Duymuş, Nuray Erin. Fare meme kanseri modelinde; kalp, karaciğer ve beyine metastaz yapan hücreler

farklı karakteristik özellikler sergilerler. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı) 28-31 Mayıs 2013, Mersin

18. Selvinaz Dalaklıoğlu Taşatargil, Arda Taşatargil, **Şule Kale**, Gamze Tanrıöver, Sayra Dilmaç, Nuray Erin. Balb-c farelerde metastatik meme karsinomunun neden olduğu endotel disfonksiyonunda Tümör Nekrozis Faktör- α ve NADPH oksidaz'ın rolü. 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi 4-7 Kasım 2013, Antalya
19. **Şule Kale**, Nuray Erin. HSP90 inhibitörü Geldanamisin'in metastatik potansiyeli farklı hücreler üzerine etkisi. 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi 4-7 Kasım 2013, Antalya
20. Aylin Fidan Korcum, Selvinaz Dalaklıoğlu, **Şule Kale**, Nuray Erin. Metastatik meme kanserinde radyoterapi'nin vasküler endotel disfonksiyonuna etkisi. 20. Ulusal Kanser Kongresi, 19-23 Nisan 2013, Antalya
21. **Şule Kale**, Nuray Erin. Effect of Hsp90 Inhibitor Geldanamycin on Cells With Different Metastatic Potential. EACR- Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress & 5th Multidisciplinary Cancer Research Congress. 23rd-27th of April 2014 BODRUM
22. **Şule Kale**, Nuray Erin. Effects of Hsp90 Inhibitor 17-AAG and Radiotherapy on Cell Proliferation in Metastatic Breast Carcinoma Cell Lines. EACR- Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress & 5th Multidisciplinary Cancer Research Congress. 23rd-27th of April 2014 BODRUM
23. Korcum A.F., **Kale Ş.**, Erin N., "Meme Kanseri Hücrelerinde, Radyoterapi Ve Substans P'Nin Makrofaj İnflamatuar Protein-2 Düzeyine Etkisi.", 10. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 9 - 23 Nisan 2014, Antalya
24. **Şule Kale**, Yiğit Çeçen, Aylin F Korcum, Nuray Erin. Effects of Radiotherapy on Expression of Angiogenic Factors in Different Subsets of 4T1 Metastatic Breast Cancer Cell Lines. International Symposium on Advances in Predictive & Personalized Medicine. 2-3 April 2015, İstanbul
25. **Şule Kale**, Nuray Erin. Effects of Heat Shock Protein 90 (HSP90) Inhibitor 17-AAG and Radiotherapy on Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2) and Vascular Endothelial Growth Factor Alpha (VEGF- α) Secretion in Metastatic Breast Carcinoma Cell Lines. International Symposium on Advances in Predictive & Personalized Medicine. 2-3 April 2015, İstanbul
26. **Şule Kale**, Aylin F Korcum, Ertuğrul Dündar, Nuray Erin. HSP90 İnhibitörü PU-H71, Metastatik Meme Kanseri Hücrelerinin Radyoterapiye Duyarlılığını

Arttırmaktadır. 12. Ulusal Radyasyon Onkolojisi Kongresi, 20-24 Nisan 2016, Antalya

27. **Şule Kale**, Aylin F. Korcum, Nuray Erin. The effects of PU-H71, a novel HSP90 inhibitor, and radiotherapy co-treatment in metastatic breast carcinoma: Changes in IL-6 and macrophage inflammatory protein 2. 14th CIMT ANNUAL MEETING 10–12 Mayıs 2016, Mainz, Germany
28. **Şule Kale**, Nuray Erin. A novel HSP90 inhibitor, PU-H71 Decreases Tumor Growth and alters anti-tumoral immune response in Metastatic Breast Carcinoma Model. 7.th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), 26-30 Haziran 2016, İstanbul
29. **Şule Kale**, Yiğit Çeçen, Aylin F Korcum, Nuray Erin. PU-H71 and Radiotherapy in Combination Decreases Tumor Growth And Lung Metastasis In Metastatic Breast Carcinoma Model. 7.th European Congress of Pharmacology (EPHAR2016), 26-30 Haziran 2016, İstanbul