

T. C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MALİGN MELANOM HÜCRE
DİZİLERİNDE BRAF İNHİBİTÖRÜ
DİRENCİNİN HİF 1 EKSPRESYONU İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

GÜLSÜM GENÇOĞLAN

TEMEL ONKOLOJİ

DOKTORA TEZİ

İZMİR- 2018

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970094

T. C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MALİGN MELANOM HÜCRE
DİZİLERİNDE BRAF İNHİBİTÖRÜ
DİRENCİNİN HİF 1 EKSPRESYONU İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ
GÜLSÜM GENÇOĞLAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Yasemin BASKIN

(Bu araştırma Türk Dermatoloji Derneği Araştırma Burs Programı (2015) ve Celal
Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970094

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Gülsüm GENÇOĞLAN '***MALİGN MELANOM HÜCRE DİZİLERİNDE BRAF İNHİBİTÖRÜ DİRENCİNİN HİF 1 EKSPRESYONU İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI***' konulu ***Doktora*** tezini 06/02/2018 Tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. Yasemin BASKIN

BAŞKAN

(Dokuz Eylül Üniversitesi, SBE, Onkoloji A.D.)

Prof Dr Kamer GÜNDÜZ

ÜYE

Celal Bayar Üniversitesi, Dermatoloji A.D.

Prof Dr Işıl İNANIR

ÜYE

Celal Bayar Üniversitesi, Dermatoloji A.D.

Prof Dr Turna İLKNUR

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi, Dermatoloji A.D.

Prof Dr Hülya ELLİDOKUZ

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi, SBE, Onkoloji AD

Prof Dr İlhan ÖZTOP

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi, SBE, Onkoloji AD

Prof Dr Seda VATANSEVER

YEDEK ÜYE

Celal Bayar Üniversitesi, Histoloji A.D.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
GENEL BİLGİLER.....	5
GEREÇ VE YÖNTEM	8
3.1. Araştırmanın tipi	8
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı	8
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme	8
3.4. Çalışma materyali	8
3.5. Araştırmanın değişkenleri.....	8
3.6. Veri toplama araçları.....	9
3.7. Araştırma planı	16
3.8. Verilerin değerlendirilmesi.....	17
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	17
3.10. Etik Kurul Onayı.....	17

4. BULGULAR.....	18
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
7. KAYNAKLAR.....	40
8. EKLER.....	43



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: İmmunhistokimya çalışmaları.....	26
--	----



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1 : Her bir hücre hattında BRAF mutasyon analizleri	18
Şekil 2 : Heterozigot mutant hücre hattı IC50 doz çalışması.....	18
Şekil 3: Homozigot mutant hücre hattı IC50 doz çalışması	19
Şekil 4: AZ628 uygulaması sonucu direnç kazanan IGR-39R (100 µM) ve A375R (10 µM) hücre hattı üzerinde 500 µM'a kadar AZ628 dozları uygulaması, 48 saat sonrası hücre canlılık grafikleri.....	20
Şekil 5: A375 hücre hatlarında; Vemurafenib (AZ628)'in tek başına kullanıldığı kuyucuklarda 6. siklustan sonra direnç ve koloni oluşumu	21
Şekil 6: IGR-39 hücre hatlarında; Vemurafenib (AZ628)'in tek başına kullanıldığı kuyucuklarda 6. siklustan sonra direnç ve koloni oluşumu	22
Şekil 7: Hücre hatlarında ve dirençli kolonilerde HİF1 ekspresyon düzeyleri.....	23
Şekil 8: A.10 µM AZ628, B.10 µM AZ628 ve 50 µM Px478 uygulanan A375 hücre hattının 3. siklus sonrası görüntüsü. C.100 µM AZ628, D.100 µM AZ628 ve 50 µM Px478 uygulanan IGR-39 hücre hattının 3. siklus sonrası görüntüsü.	24
Şekil 9: Tüm dirençli kolonilerde HmB45 (C-D) ve S100 (A-B) doğrulaması.....	25
Şekil 10: IGR39 hücre hattında Oct $\frac{3}{4}$ ve CD133 ekspresyonu.....	27
Şekil 11: A375 hücre hattında Oct $\frac{3}{4}$ ve Nestin ekspresyonu.....	28
Şekil 12: Çalışma gruplarında C-Met ekspresyonu.....	29
Şekil 13 : Çalışma gruplarında PGK1 ekspresyonu.....	30
Şekil 14 : Çalışma gruplarında MEK1 ekspresyonu.....	31
Şekil 15: IGR39 gruplarında E-Caderin ve N-Caderin ekspresyonu.....	32

Şekil 16 : A375 gruplarında E-Caderin ve N-Caderin ekspresyonu.....33

Şekil 17 : Deney gruplarında E-Caderin ve N-Caderin ekspresyonunun dağılımı.....34



KISALTMALAR

AZ628: BRAFi: Braf inhibitörü

HIF-1: Hipoksi ile indüklenen faktör-1

Px478: HIFi: HIF inhibitörü

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

PI3K: Fosfatidilinozitol-3-kinaz

MAPK: Mitojen aktive edici protein kinaz

EMT: Epitelyal-mezenkimal transisyon

cMET: Mezenkimal-epitelyal transisyon

PGK1: Fosfogliserat kinaz 1

VEGEF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ATP: Adenozin tri-fosfat

ATCC: *American Type Culture Collection*

FBS: Fötal sığır serumu

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

mm: Milimetre

µm: Mikrometre

mM: Milimolar

μM : Mikromolar

Dk: Dakika



TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmanın haklı gururunu taşıdığım, doktora eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen, akademik hayatımda beni bir basamak yukarı taşıyan ve doktora danışmanlığı dışında akademik danışman kimliğinin hakkını veren çok değerli Hocam, Doç.Dr.Yasemin Baskın'a;

Başta Gizem Çalıbaşı Koçal olmak üzere laboratuvarında çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz çalışkan, disiplinli ve bir o kadar yetenekli dostlarıma;

Kıymetli öneri ve deneyimlerini paylaşarak yol gösteren saygıdeğer Onkoloji Enstitüsü müdürümüz Prof. Dr. Nur Olgun'a, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarıma ve her zaman güler yüzle yardımlarını esirgemeyen Onkoloji Enstitüsü idari personeline;

Akademisyen olarak doktora eğitimime devam etmeme olanak sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Dermatoloji Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma;

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum....

Gülsüm GENÇOĞLAN

İzmir, Ocak 2018

ÖZET

Gülsüm GENÇOĞLAN, MD, PhD

Yazışma adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İZMİR

Malign melanom hücre dizilerinde BRAF inhibitörü direncinin HIF 1 ekspresyonu ile ilişkisinin araştırılması

Malign melanom en ölümcül deri tümörü olup son yıllarda insidansı giderek artmaktadır. melanomun kemoterapotiklere ve radyoterapiye yanıtı azalması, BRAF inhibitörlerine karşı hızlı gelişen direnç tedavi güçlüklerinin başında yer almaktadır. Melanomda MAPK yolağındaki mutasyonlar karsinogenezin kilit noktası olup bu yolağın inhibitörlerine karşı gelişen direncin engellenmesi tedavi stratejilerinin temelini oluşturmaktadır. Hipoksia, tümör mikroçevresinde oluşan düşük oksijen seviyesini tanımlamaktadır. Oluşan reaktif oksijen türleri prolifere edici enzimleri üzerinden HIF-1 α genini ve HIF-1 α hedef mekanizmalarını etkilemektedir. Hipoksik koşullar, hücrede apoptoz veya proliferasyon gibi farklı yolları aktive edebilmektedir. Hipoksinin BRAF inhibitörlerine dirençte etkisi olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Direnç gelişim mekanizmalarının belirlenmesi ve muhtemel hedef moleküllerin tanımlanması bu alandaki tedavi başarısızlıklarının önüne geçecek bu hastalara daha uzun sağ kalım hatta kür şansı tanıyabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Malign melanom, BRAF inhibitörü, direnç, tedavi, HIF inhibitörü

ABSTRACT**Gülsüm GENÇOĞLAN, MD, PhD****Corresponding address:** Dokuz Eylul University, Institute of Oncology,

Department of Basic Oncology, IZMİR

The relation of BRAF inhibitor resistance and HIF 1 expressions in malign melanom cell lines

Malign melanom is the most fatal skin tumour with an increasing incidence. The unresponsiveness to chemotherapy and radiotherapy and rapid resistance to BRAF inhibitors are the main treatment difficulties. Mutations in the MAPK pathway are the main factor in carcinogenesis in melanoma, and the inhibition of resistance to MAPK inhibitors is principal for treatment. Hypoxia defines the low oxygen level in tumour microenviroment. Reactive oxygen species effects the HIF-1 α gene and HIF-1 α target mechanisms. Hypoxic conditions activates different pathways such as apoptosis and proliferation. The effect of hypoxia on resistance to BRAF inhibitors is still unknown. The determination of resistance mechanisms and definion of possible target molecules will prevent therapy failure and obtain longer survival rates and curability.

Key Words: Malign melanoma, BRAF inhibitor, resistance, therapy, HIF inhibitor

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Malign melanom, melanositlerden köken alan en ölümcül deri tümörüdür. Genç erişkinlerde en sık rastlanan kanser türlerinden birisi olup insidansı son yıllarda artış göstermektedir. Malign melanomda MAPK yolağında, %20 oranında NRAS, %50 oranında BRAF mutasyonu olduğu geniş serilerde gösterilmiştir. Bu bulgunun ardından yolağı hedef alan BRAF ve MEK inhibitörlerine yüksek tedavi yanıtına karşın, ortalama olarak tedavinin 7. ayında BRAF inhibitörlerine direnç gelişmekte ve bunun ardından hızlı tümör progresyonu meydana gelmektedir. Kemoterapötik ajanlara direnç, insan kanserlerinin klinik tedavisinde en büyük engellerden biridir.

HIF-1 (Hipoksi ile indüklenen faktör-1) transkripsiyon faktörü, hipoksiye adaptasyon cevabının gelişiminde anahtar rol oynayan düzenleyici bir proteindir. HIF-1 protein sentezi PI3K ve ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK) sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile düzenlenir. Bu transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve diğer hedef genlerin ekspresyonunun artması ve anjiyogenezin hızlanması söz konusudur. Bu proteinin etki ettiği diğer mekanizmalar, çok sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücrelerin dediferansiyasyonu, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktörü üretimi, proliferasyon, invazyon ve metastaz, metabolik yeniden programlanma, tümör büyümesinin artması olarak sıralanabilir.

IGF-1, EGF, insülin, PDGF, malign melanomda BRAF inhibitörlerine olan dirençte muhtemel etkenler olarak bildirilmektele birlikte direncin hipoksik yanıtla ilişkisi konusunda bilgi yoktur.

Malign melanomda direnç gelişiminde, hücre içi birden fazla yolağın rol oynadığı ve bunların kesişim yerlerinin HIF modülasyonu olabileceğini düşünmekteyiz. Malign melanomda BRAF inhibisyonun bu yolağa etkisi ve HIF inhibisyonu ve aktivasyonundan nasıl etkilendiği, direnç gelişiminde anahtar rol üstlenip üstlenmediğiyle ilgili bilgi yoktur. Bu PI3K ve MAPK sinyal iletim yollarının arasında önemli bir düzenleyici olan bu proteinin direnç gelişimindeki

rolünün anlaşılması yeni hedef moleküllerin tanımlanması, metformin gibi mevcut HIF inhibitörlerine yeni kullanım alanı açabilir.

Bu çalışmada Melanom BRAF V600E mutasyonu pozitif hücre hattında vemurafenib direnci oluşturulduktan sonra HIF 1 ve ilişkili yolların aktivasyonu değerlendirilecektir. İlaç direnci ile ilgili olabilecek moleküler hedefler yeni tedavilerin gelişimine temel oluşturacak bilgilerin elde edilmesi hedeflenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

Malign melanomun ölümcül metastaz yapma eğilimi, kemoterapotiklere ve immunmodulator tedavilere direnci agresif klinik davranışının nedenleri olarak iyi bilinmektedir (1,2). Geçen yüzyılda MAPK yolağındaki mutasyonların bu tümörde anahtar rol oynadıkları saptandı. En erken ve en sık saptanan genetik değişiklik BRAF proto onkogeninde meydana gelen (T1799A) nokta mutasyonu sonucunda ortaya çıkan BRAF V600E mutasyonudur. Mutasyon melanomların %50-60'ında görülmekte olup MEK/ERK sinyal iletiminde aktivasyona ve tümöral proliferasyona neden olmaktadır (3).

Vemurafenib FDA tarafından malign melanom tedavisinde ilk onaylanan BRAF inhibitörü olup BRAF mutasyonu (+) tümörlerde %81 gibi yüksek bir yanıtla tümör boyutunda küçülme sağlamaktadır. Ancak, bu başarılı klinik yanıtla tedavinin 6-7. ayında istisnasız tüm hastalarda direnç gelişmektedir (4). Direnç gelişmiş melanomlu hastaların doku örneklerinde yapılan çalışmalarda MEK1C121S mutasyonu tespit edildi (5, 6,7). Direnç gelişimini engellemek için tedaviye MEK inhibitörleri eklendiğinde yine ortalama 13 ayda tedaviye direnç geliştiği gözlemlendi (4). Anti kanser ilaçlara direnç çok iyi bilinen bir fenomen. Malign melanomda BRAF inhibitörlerine direnç birkaç yoldan gelişiyor olabilir.

1. MAPK yolağındaki diğer küçük moleküller BRAF molekülü yerine CRAF ya da ARAF dimerleri MAPK yolağının aktivasyonunu sağlıyor olabilir (8,9). BRAF inhibitörü AZ628 ile tedavi edilen M14 insan melanom hücre hatlarında CRAF protein düzeylerinin arttığı gösterildi (9). Ancak bu durum tek başına direnç gelişiminden sorumlu gibi görünmüyor çünkü BRAF ve MEK inhibitörleri ile kombine tedavi alan hastalarda da süre biraz daha uzun olmakla birlikte direnç gelişimi engellenemiyor.

Tümörögenizde MAPK yolağı çok önemli bir yolak olabilir ancak hedefe yönelik tedavilere dirençte tek başına rol oynamıyor gibi görünmektedir.

2. BRAF domaininde ilacın bağlanmasını engelleyen yeni mutasyon gerçekleşmiş ve bu nedenle BRAF inhibitörü mutant BRAF a bağlanamıyor olabilir. Ancak yapılan çalışmalarda dirençli hücre kültürlerinden elde edilen B-RAF kinazların vemurafenibe dirençli olmayan hücreler gibi yanıt verdikleri bu hücrelerde V600E mutasyonunu korunduğu Bağlanma domaininde herhangi bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (10).

3. MAPK yolağı dışında PI3K/AKT yolağı aktivasyonu gerçekleşiyor olabilir.

Son çalışmalarda, IGF-1'in hem BRAFV600E mutasyonu bulunan hem de wild tip hücrelerde PI3K yolağı üzerinden etki ederek, TNF- α aracılı apoptozdan melanom hücrelerini koruduğu saptanmıştır (11, 12). Melansitler nöral krestten köken alan hücreler olup normalde EGFR eksprese etmezler. Ancak benzer şekilde MEK ve BRAF inhibitörlerine maruz kalan melanom hücrelerinde EGFR (13,14) ve PDGFR upregulasyonu olduğu gösterilmiştir (15). Tüm bu bulgular ışığında tümör hücrelerinde MAPK yolağının bloke edilmesiyle hücre içi sinyalizasyonu yeniden düzenleniyor gibi görünmektedir.

HIF-1 (Hipoksi ile indüklenen faktör-1) transkripsiyon faktörü, hipoksiye adaptasyon cevabının gelişiminde anahtar rol oynayan düzenleyici bir proteindir. HIF-1 protein sentezi PI3K ve ERK mitogen-activated protein kinase (MAPK) sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile düzenlenir. Bu transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile yine bir büyüme faktörü olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve diğer hedef genlerin ekspresyonunun artması ve anjiyogenezin hızlanması söz konusudur. Bu proteinin etki ettiği diğer mekanizmalar, çok sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücrelerin dediferansiyasyonu, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktörü üretimi , proliferasyon, invazyon ve metastaz, metabolik yeniden programlanma, tümör büyümesinin artması olarak sıralanabilir (16,17). Tüm bu bilgiler ışığında malign melanomda direnç gelişiminde hücre içi birden fazla yolağın rol oynadığı ve bunların kesişim yerlerinin HIF modülasyonu olabileceğini düşünmekteyiz. Malign melanomda BRAF inhibisyonunun

bu yolağa etkisi ve HİF inhibisyonu ve aktivasyonundan nasıl etkilendiğı, direnç gelişiminde anahtar rol üstlenip üstlenmediğıyle ilgili bilgi yoktur.

Bu PI3K ve MAPK sinyal iletim yollarının arasında önemli bir düzenleyici olan bu proteinin direnç gelişimindeki rolünün anlaşılması yeni hedef moleküllerin tanımlanması, metformin gibi mevcut HIF inhibitörlerine yeni kullanım alanı açabilir.

Çalışma amacımız;

1. Melanom BRAF V600E mutasyonu pozitif hücre hatlarında BRAF inhibitör direnç gelişiminin HİF 1 ile ilişkisinin değerlendirilmesi
2. HİF inhibitörlerinin kombinasyonunun tedavi yanıtına etkisinin değerlendirilmesi
3. Mutasyon farklılıklarının direnç gelişim sürecindeki rolünün ortaya konulması
4. Direnç geliştirmiş hücrelerin morfolojik analizi ve muhtemel adaptif yanıtların açıklanmasını planladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu çalışma tanımlayıcı bir araştırma olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma Eylül 2013- Ocak 2018 tarihleri arasında, Celal Bayar Üniversitesi Dermatoloji, Histoloji & Embriyoloji ve Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde yürütülmüştür.

3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme

Bu çalışma BRAF V600E mutant malign melanom hücre hatlarındaki BRAF inhibitör direnci geliştirilen ve kombine tedavi yaklaşımı uygulanan çalışma kolları araştırmanın evrenini oluşturmaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada, kolorektal kanser hücre hatları kullanılmıştır. A375 (Homozigot BRAF V600E mutasyonu taşıyan, ATCC) ve IGR39 (Heterozigot BRAF V600E mutasyonu taşıyan, DMSZ) hücre hatları, DMSZ ve ATCC 'den satın alındı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bu çalışma BRAF V600E mutant malign melanomda BRAF inhibitör direnci ve HIF inhibitör kombinasyonunun tedavi etkinliği açısından tanımlayıcı bir çalışma olduğu için melanomda BRAF inhibitör direnci gelişimi süreci bağımlı değişken; analizi yapılan hücre tanımlayıcı yüzey ekspresyonları ve yolak analizleri ise bağımsız değişkendir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Hücre Hatları ve Geleneksel Hücre kültürü

Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 4 g/L glucose, 4.0 mM L-Glutamine) (Gibco by Life Technologies, Katalog no: 11965-092, Grand Island, NY, USA)
- Fötal sıgır serumu (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Penisilin- Streptomisin (10,000U/ml) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, Katalog no: 15140-122, NY, USA)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (1X) ([-] kalsiyum klorür [-] Magnezyum klorür) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, USA)
- Mikropipet set (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Kimwipes (Kimtech Science Brand, Kimberly-Clark Worldwide, Inc, USA)
- 0.05% Tiripsin-EDTA (1X), Fenol-Kırmızı (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, USA)
- 25cm² hücre kültür flaskı (MedSupply Partners, USA)
- 75cm² hücre kültür flaskı (MedSupply Partners, USA)
- 50 mililitre (ml) tüp (MedSupply Partners, USA)
- 15 ml tüp (MedSupply Partners, USA)
- Serolojik pipet-10 ml (MedSupply Partners, USA)
- Serolojik pipet-5 ml (MedSupply Partners, USA)
- Etanol (MedSupplyPartners, USA)
- Karbondioksit inköbatör (Thermo Scientific, USA)

Tümör hücreleri olarak BRAFv600E mutasyonu pozitif A375 (Homozigot BRAF V600E mutasyonu taşıyan, ATCC) ve IGR39 (Heterozigot BRAF V600E mutasyonu taşıyan, DMSZ) hücre hatları kullanıldı. İn vitro 3D, matrijel modeli olarak uygulanacak ve hücrelerin devamlılığı sağlandı. Mikro çevre değişkenleri olarak hipoksi, HIF-1 modülatörleri uygulandı.

Çalışma grupları her bir hücre hattı için;

Grup 1: Kontrol

Grup 2: AZ628

Grup 3: Px478 + AZ628

Px478 sitotoksik etkisi saptanmadığından deney kolu oluşturulmadı.

3.6.2. Hücre Kültürü testleri

Kanser hücre hatları uygun hücre kültürü ortamlarında üretildi (37°C’de, %5’lik CO₂, %10 FBS (fetal bovine serum) (Biochrom), %1 antibiyotik/antimikotik içeren RPMI (Biochrom) içerisinde üretilecektir.) İnvaziv hücre hatları için “Basement membran extract” (BME) ile transwell kaplandı. Transwell içindeki hücreler FBS ile uyarılır ve membrandan geçen hücreler belirlendi. Hücreleri plate’den kaldırmak ve pasajlamak için %0,25 EDTA içeren tripsin (Biochrom), kullanıldı. Hücreler 20X büyütme alanı olan faz kontrast mikroskopta incelenerek canlılık tayini yapıldı.

Hücreler, normoxic koşullarda 37oC’de, 20% O₂, 5% CO₂, ve 75%N₂ içeren nemli inkübatör içerisinde inkübe edildi.

In vitro çalışmalar için melanoma hücre hatları,

- Heterozigot BRAF V600E mutasyonu taşıyan IGR-39 (DMSZ)
- Homozigot BRAF V600E mutasyonu taşıyan A-375 (ATCC) kullanıldı.

BRAF mutasyon analizleri her bir hücre hattı için yapılarak mutasyonlar teyit edildi.

AZ628 (vemurafenib) ve Px478 (HIF-1 α inhibitörü) literatür taraması sonucu 5 farklı doz belirlendi.

Hücre kültürlerinin 24. saatinde

- IGR-39 hücre hattı için 100, 75, 50, 25 ve 12,5 μ M dozlarında AZ628
- A-375 hücre hattı için 10, 1, 0,1, 0,01 ve 0,001 μ M dozlarında AZ628
- Her iki hücre hattı için 50, 25, 12,5, 6,25 ve 3,125 μ M dozlarında Px478

Kimyasalların uygulanmasından sonra hücre proliferasyonu Real-time hücre analiz sistemi ile (xCelligence, Roche) 48 saat boyunca 60 dakikalık aralıklarla ölçülerek her hücre hattı için IC50 değerleri hesaplandı. Her bir kimyasal konsantrasyonu için 3 tekrar yapıldı.

3.6.3. xCELLigence ile hücre büyümesi ve çoğalması deneyi

xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA)'nın sitotoksosite deneylerinde kullanımının amacı Cl (cell index-hücre içeriği) değerlerine ulaşmak için gereken zamanın belirlenmesidir (Üreticiler 0,5-1 arası olmasını önermiştir). 100 μ L hücre kültür mediumu içeren kuyucukların arka fonu ölçülecektir. Hücreler, petriden tripsin/EDTA muamelesi ile ayrılacak, hücre kültüründe tekrar süspanse hale getirilerek ve 50 μ L içerisinde $2,5 \times 10^3$, 5×10^3 ve $7,5 \times 10^3$ hücre olacak şekilde ayarlandı. Bu hücre süspanسیونları, 100 μ L hücre kültürü içeren kuyucuklara ilave edildi. Her bir hücre konsantrasyonu için 6 kuyucuğa ekim yapılarak, 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve plaka okuyucuda sürekli öz direnç hesaplandı. İşlemlerin tamamı tabakalı akım kabininde gerçekleştirildi. Hücreler, 37°C'de, %5 nemlendirilmiş CO₂ atm'de gerçek zamanlı görüntülendi. Cl, 145 saat boyunca 15 dakikada bir kaydedilecektir. DMEM içeren kuyucuklar, öz direnç

ana hattı ölçümleri için negatif kontrol olarak kullanıldı. Deney boyunca mikrokuyucukların son hacmi 200 µL olacak şekilde ayarlandı.

3.6.4. Direnç gelişimi deneyleri

Direnç gelişimi deneyleri için hücreler 6 kuyucuklu plate'lere 105/kuyucuk olacak şekilde ekildi.

- 24 saat sonra, hücre hatları 2'şer gruba ayrıldı. HIF inhibitörü tek başına sitotoksik etki göstermediğinden deney kolu oluşturulmadı. Hücreler 72 saat kimyasallarla inkübe edildikten sonra kültür ortamı taze besi ortamıyla değiştirilerek 72 saat boyunca wash out yapıldı.

Kimyasal ve wash out uygulamasından oluşan bu 144 saatlik süreç 1 siklus olarak kabul edildi. Sikluslar ardıl olarak tekrarlanarak hücreler üzerinde direnç geliştirildi. Sonrasında direnç gelişiminin tüm gruplarda yüksek dozlarda teyit edildi.

3.6.5. HIF-1alfa proteinin ve bu genin regülasyonunda rol oynayan ve hedeflediği mekanizmaların ölçümü:

HIF1 alfa ve HIF2 alfa proteinlerinin ekspresyon düzeyi western blot yöntemi ile ölçüldü. Bunun için rabbit poliklonal anti HIF-1alfa ve anti HIF-2alfa birincil antibodileri ve Mouse anti-rabbit ikincil antibodileri kullanıldı.

İmmünohistokimya

Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

- Nestin primer antikor (Abcam, MA, USA)
- Oct3/4 primer antikor (Abcam, MA, USA)
- CD133 primer antikor (Abcam, MA, USA)
- PGK1 primer antikor (Abcam, MA, USA)
- cMET primer antikor (Abcam, MA, USA)
- STAT3 primer antikor (Abcam, MA, USA)

- PTEN primer antikor (Abcam, MA, USA)
- MEK1 primer antikor (Abcam, MA, USA)
- HmB45 primer antikor (Abcam, MA), USA)
- Hematoksilen eosin (Abcam, MA, USA)
- 4% Para-formaldehit (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)
- Parafin, Lam, lamel, alkol
- Işık mikroskop (Nikon, USA)

-“poly-l-lysine” ile kaplanmış lam üzerinde cytospin ile hücreler alındı

-Antijen retrieval: sitrat buffer (ph:6) hazırlanarak lamalar sitrat buffer (ph:6) solüsyonuna alındı ve mikrodalga fırında kaynatıldı. Mikrodalga fırında 5 dk. 800 watt’a şoklandı. İlk kaynama olduktan sonra enerji 150-200 watt’a düşürülerek 15 dk. kademeli şoklama yapıldı. Süre sonunda enerji kesildi ve lamalar 20 dk. Oda ısısında soğumaya bırakıldı

-Lamlar deiyonize distile su ile yıkandı

-Lam yüzeyindeki su uzaklaştırılarak dokuların etrafı pap-pen ile çizildi

-Endojen enzim blokajı: dokulara % 3’ lük H₂O₂ solüsyonu damlatılarak 10 dk bekletildi

-Lamlar PBS ile yıkandı

-Antikor blokajı: dokulara “blocking reagent-ultra v blok- Labvision” damlatılarak 5 dk.

bekletildi

-Primer antikor ile inkübasyon: solüsyon lam yüzeyinden uzaklaştırıldı. Dokulara primer antikor damlatıldı. p16INK4a Ab-7(CIN-tec p16 INK4A histology Kit) 1/50 oranında 45 dk. 1 saat inkübe edildi.

-Lamlar PBS ile yıkandı ve ardından 5 dk. PBS te bekletildi

-Dokulara Sekonder antikor “biotinylated goat anti-polyvalent-Labvision/linking” damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi

-Lamlar PBS ile yıkandı ve ardından 5 dk. PBS te bekletildi

- Dokulara “streptavidin peroksidaz-Labvision/labelling” damlatılarak 20 dk. İnkübe edildi
- Lamlar PBS ile yıkandı
- Kromojen ile inkübasyon: “aminoetil karbazol/AEC substrate buffer” damlatılarak 10 dk. bekletildi
- Lamlar deiyonize distile su ile yıkandı
- Mayer’s hemotoksilen ile 30 sn.zemin boyanması yapıldı
- Lamlar bol su ile yıkandı
- Lamlar “aques medium” ile kapatıldı.

İmmünreaktivitenin değerlendirilmesi:

Boyanma yoğunluğu: pozitif boyanan hücre sayısı 10 alanda sayılarak yapıldı ardından H skoru hesaplandı.

3.6.6. Floresan İmmünositokimya

Kullanılan Malzemeler- Cihazlar

- E-kaderin primer antikor (Abcam, MA, USA)
- N-kaderin primer antikor (Abcam, MA, USA)
- Vimentin primer antikor (Novus Biological, CO, USA)
- 4% Para-formaldehit (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)
- Sığır serum albümin (Sigma Aldrich, MO, USA)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, MO, USA)
- Alexa Fluor-488-goat anti-mouse (Life Technologies, CA, USA)
- Alexa Fluor-568 goat anti-rabbit (Life Technologies, CA, USA)
- Alexa Fluor-647 donkey anti-chicken (Jackson ImmunoResearch Lab, PA, USA)
- 4',6-Diamidino-2-Phenylindole,Dihydrochloride (DAPI) (Invitrogen Molecular Probes, OR, USA)

- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi pH 7.4 (1X) (PBS) ([-] kalsiyum klorür [-] Magnezyum klorür) (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA)
- Floresans mikroskop (Zeiss, Axio Observer, USA)

EMT sürecinin direnç gelişimi ile indüklenip indüklenmediğini göstermek amacıyla immünohistokimya boyamaları yapıldı. Hücrelerin ortamı hücrelere zarar vermeden aspire edilip atıldı ve hücreler PBS ile dikkatlice yıkandı. Ardından, %4 para-formaldehit (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) ile 20 dk oda sıcaklığında inkübe ederek hücrelerin fikse olması sağlandı. Fiksasyondan sonra hücreler boyama tamponu [PBS içinde %1 sıgır serum albümini (Sigma Aldrich, Cat no: A2153, St. Louis, MO, USA) ve %0.3 Triton X-100 (Sigma Aldrich, Cat no: T9289, St Louis, MO, USA)] içinde dilüe edilmiş E-kaderin (Abcam, ab1416, Cambridge, MA, USA) (dilüsyon1:250), N-kaderin (Abcam, ab12221, Cambridge, MA, USA) (dilüsyon 1:500) ve Vimentin (Novus Biological, NB300-223, Littleton, CO, USA) (dilüsyon1:250) antikorları ile gece boyunca 4°C’de inkübe edildiler. Gece boyunca süren inkübasyondan sonra, primer antikor kalıntısının kalmaması için hücreler iki defa PBS ile yıkandı. Yıkama basamaklarından sonra, hücreler Alexa Fluor-488 (Life Technologies, A-10667, Carlsbad, CA, USA) (dilüsyon 1:1000), Alexa Fluor-568 (Life Technologies, A-11011, Carlsbad, CA, USA) (dilüsyon1:500) ve Alexa Fluor-647 (Jackson ImmunoResearch Lab, 703-606-155, West Grove, PA, USA) (dilüsyon 1:500) sekonder antikorları ile oda sıcaklığında hafif çalkalama eşliğinde 2 saat inkübe edildi. Sekonder antikorların uygulanmasından sonra DNA, nükleus boyası 4’,6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidroklorür (DAPI) (Invitrogen Molecular Probes, D1306, Eugene, OR, USA) (dilüsyon 1:1000) ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Tüm boymaların ardından hücreler dikkatlice yıkandı ve floresans mikroskop ile uygun dalga boyu seçilerek (E-kaderin için 488, N-kaderin için 568,) görüntülendi.

3.7 Araştırma planı

1) Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 23/01/2015 tarihinde 10840098-49 sayılı karar numarasıyla etik kurul onayı alınması (2015)



2) Türk Dermatoloji Derneği tarafından Araştırma Bursu olarak araştırma bütçesinin kabulü ve malzemelerin temin edilmesi (2012.KB.SAG.003) (2015- 2016)



3) Melanom hücrelerinin çoğaltılması (2015)



4) Direnç geliştirilmesi (2015- 2016)



5) Hücrelerde direnç sonrası morfolojik değişimin tespiti nedeniyle hücre tanımlama çalışmaları için Celal Bayar Üniversitesi BAP komisyonuna proje sunumu ve projenin kabul edilmesi (2016)



6) Floresans immünohistokimya deneylerinin optimizasyonu ve epitelyal mezenkimal transisyonun gösterilmesi, immünohistokimya çalışmalarının tamamlanması (2016- 2017)



7) Transkriptom analizlerinden elde edilen verinin biyoinformatik ve istatistik tabanlı yazılımlarla analizi (2017)



8) Literatür taraması, tezin, tezden elde edilen yayının yazılması ve bilimsel dergiye gönderilmesi (2017- 2018).

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada doğrultusunda gerçekleştirilen tüm deneyler 3 kez tekrarlandı. İmmünohistokimya fotoğraflarından görüntü analizleri Image J programı ile gerçekleştirildi ve elde edilen piksel değerleri anlamlılık açısından istatistiksel olarak değerlendirildi. Dinamik ve statik olmak üzere, iki deney grubu arasındaki anlamlılığın değerlendirilmesi Non-parametrik Mann Whitney U testi ile yapıldı. İstatistiksel analiz SPSS V.21.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA) ile gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık değeri $p \leq 0.05$ olarak değerlendirildi. Ölçülebilir değişkenler t testi ile analiz edilecektir. Sayılabilenler ki-kare testi ile analiz edildi.

İki grup arasındaki farklılıkların analizi için Mann-Whitney U testi yapılacaktır. P değeri <0.05 olarak kabul edildi. Yolak analizi için Pathway Studio programı kullanıldı. Sağ kalım üzerine etkili faktörler Kaplan Meier ve Cox regresyon analizi ile değerlendirilecektir. Protein ve sitokin analizleri çoklu yöntemlerde Bio-Plex Data Pro Software (BioRad) ile yapıldı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

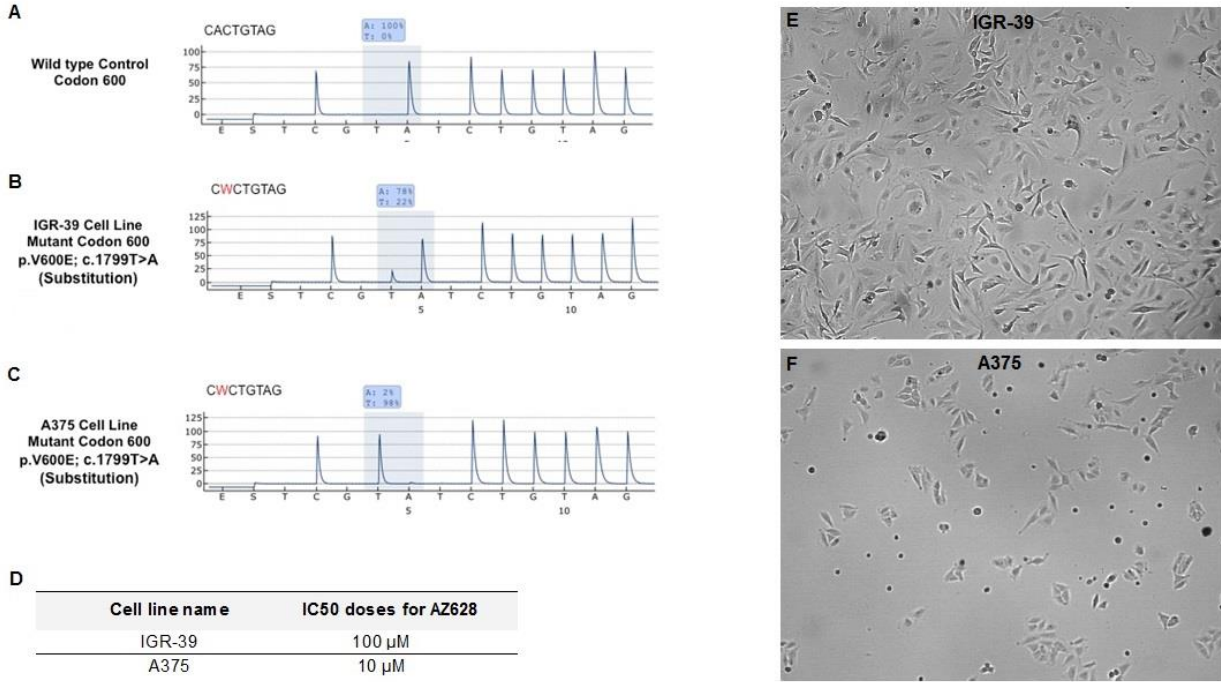
Bu çalışmada 2D hücre kültür teknikleri kullanılmıştır. Deneyler süresince önemli bir sorun ile karşılaşmamıştır. İn-Vitro çalışmalar her zaman tam olarak organizmadaki biyolojik süreci tam olarak mimetize etmekte ne yazık ki yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmada anti-tümöral immunolojik yanıt ve direnç gelişimi sonrası bu iki farklı davranış paterni göçsteren mutasyon tipinde tümör davranışının surveye olan etkisini ortaya koyacak klinik çalışmaların planlanması uygun olacaktır.

3.9. Etik Kurul Onayı

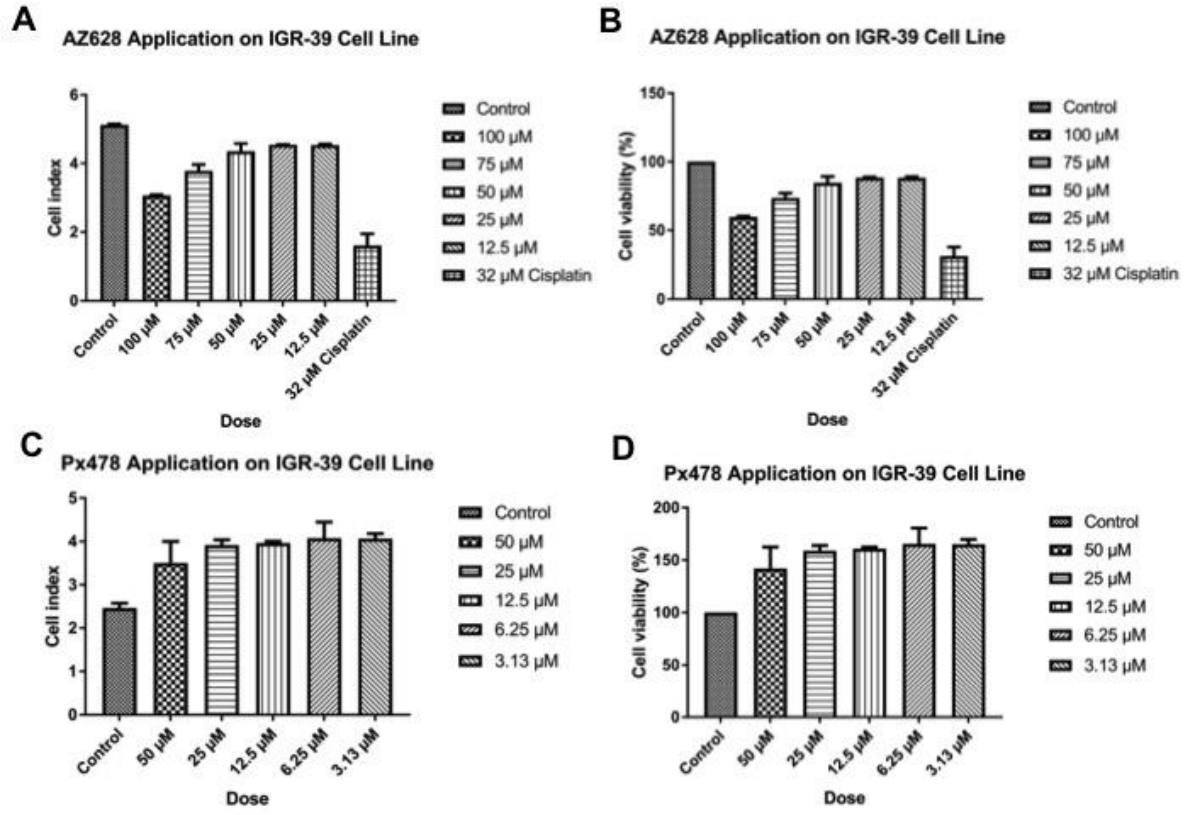
Bu çalışma Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 23/01/2015 tarihinde 10840098-49 sayılı karar numarasıyla etik kurul onayı almıştır (Ek 1).

3. BULGULAR

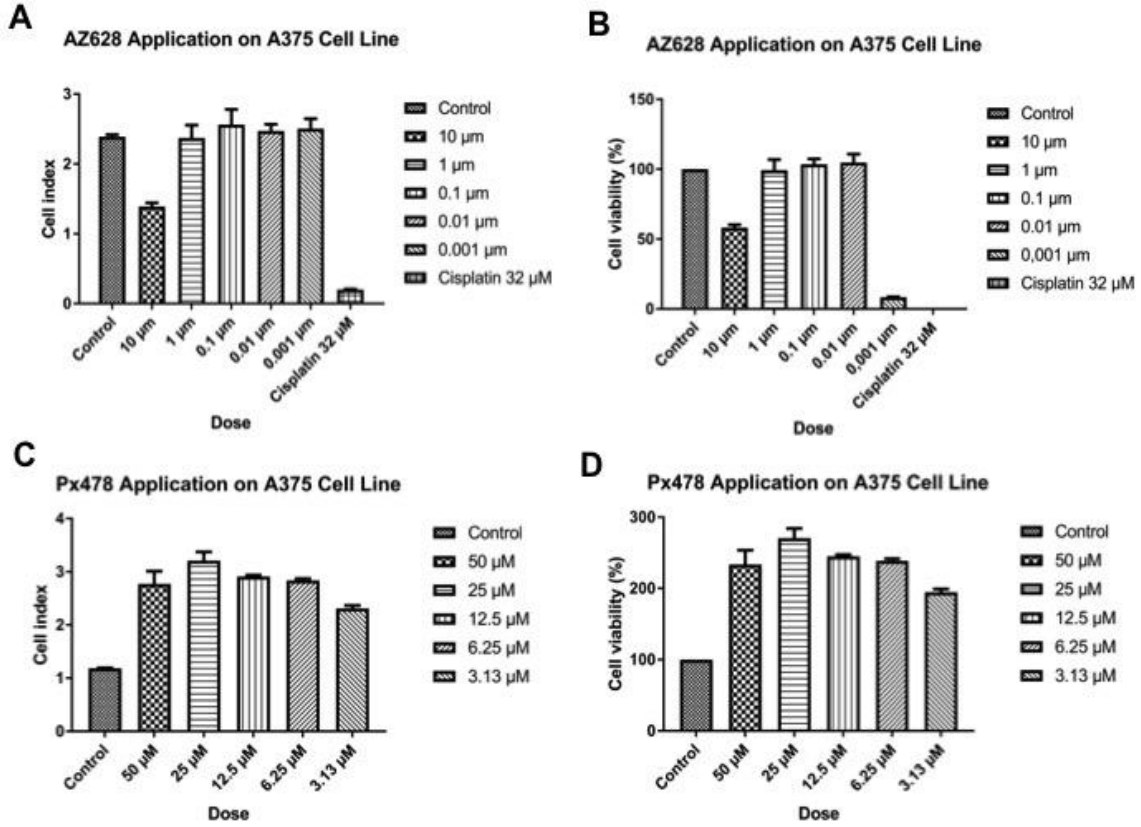
Her iki hücre hattında mutasyon analizleri yapılarak doğrulandı sonra her hücre hattı için IC50 dozları hesaplandı. Bulgularımız aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.



Şekil 1 : Her bir hücre hattında BRAF mutasyon analizleri



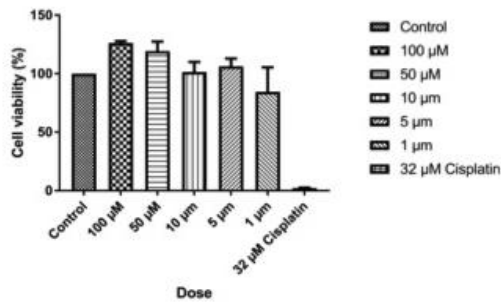
Şekil 2 : Heterozigot mutant hücre hattı IC50 doz çalışması



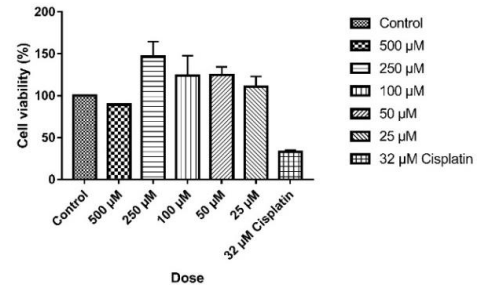
Şekil 3: Homozigot mutant hücre hattı IC50 doz çalışması

A375 ve IGR39 hücre hatlarında; Vemurafenib (AZ628)'in tek başına kullanıldığı kuyucuklarda 6. siklustan sonra direnç ve koloni oluşumu gerçekleşti, direnç yüksek dozlarda ilaç uygulanarak teyid edildi.

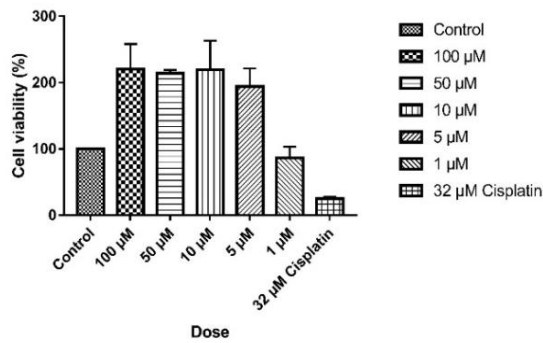
AZ628 Application on A375R-A/P50-2 Cell Line



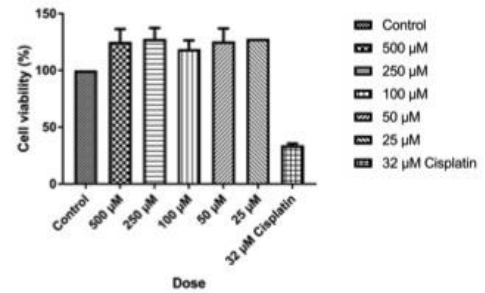
AZ628 Application on IGR-39R-A50 Cell Line



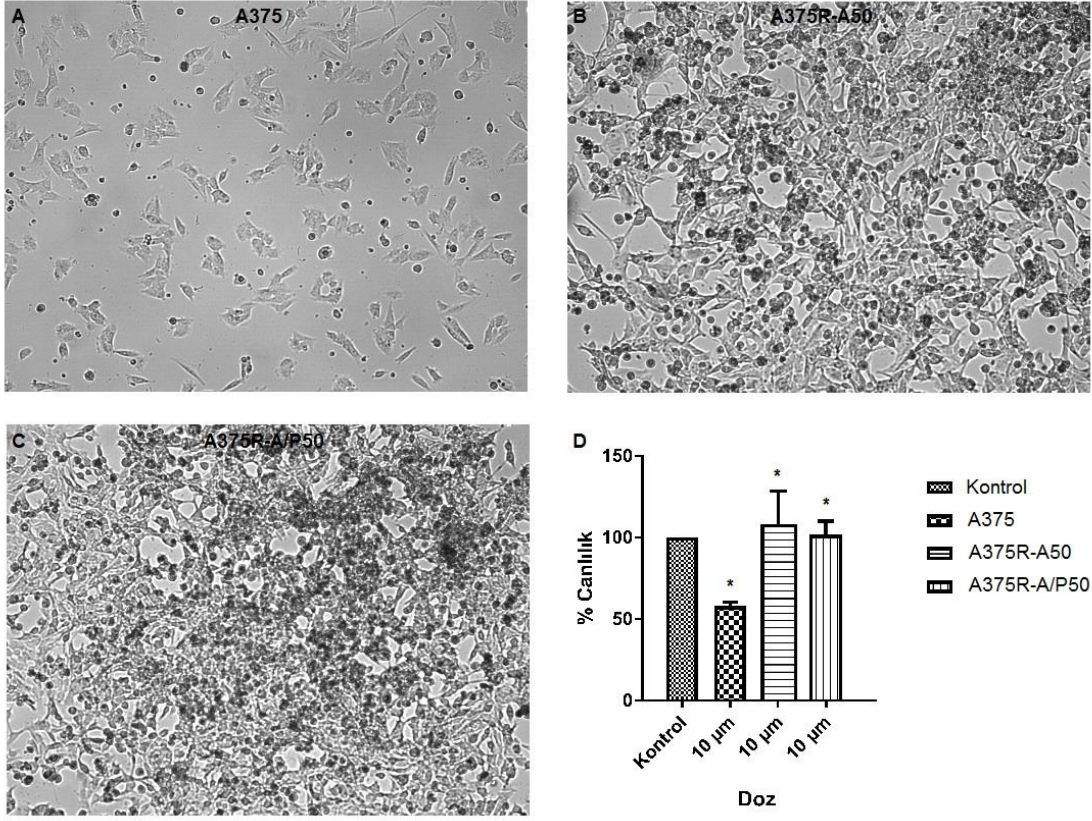
AZ628 Application on A375R-A50 Cell Line



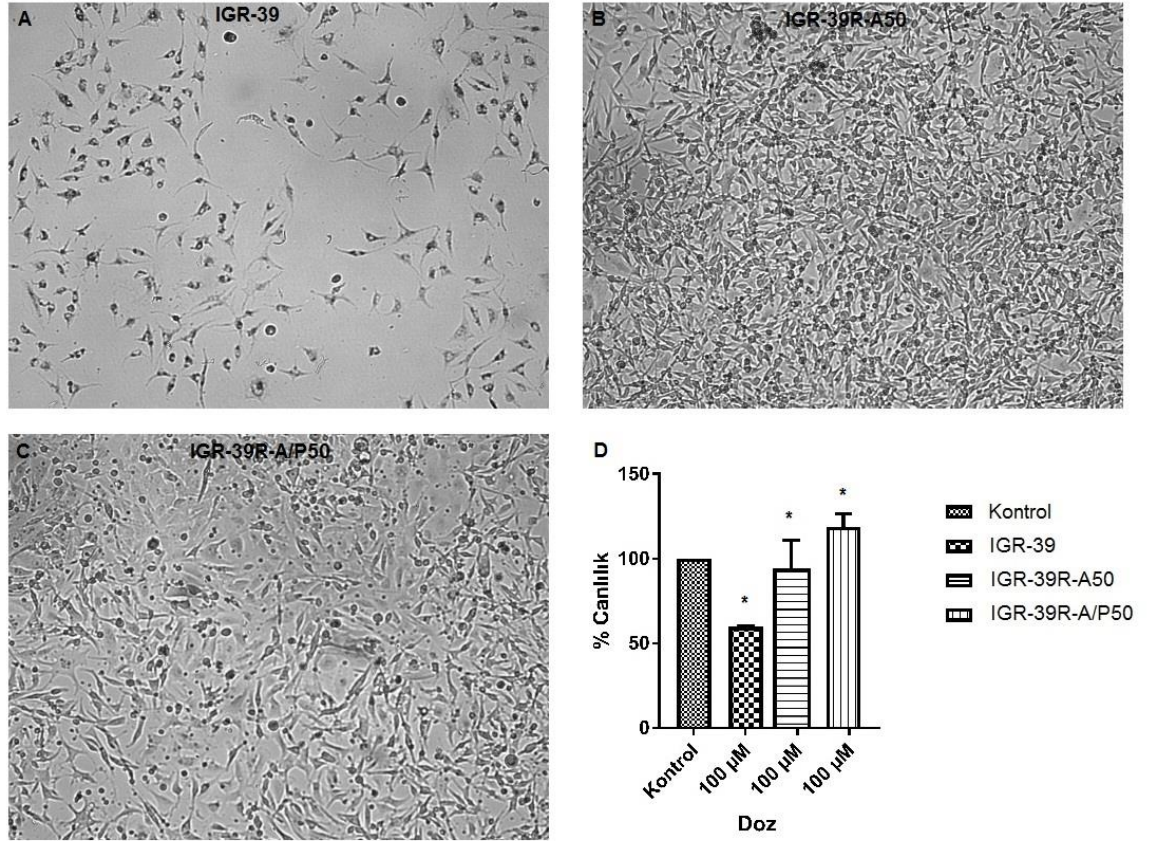
AZ628 Application on IGR-39R-A/P50 Cell Line



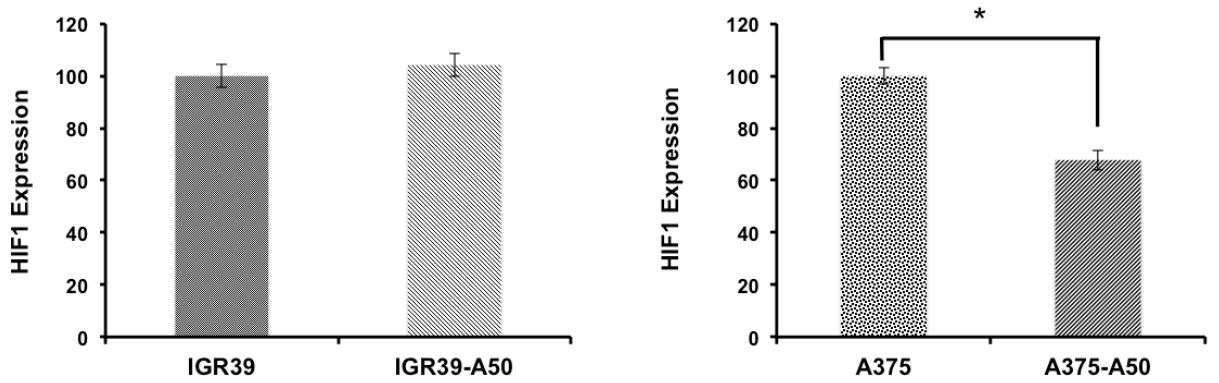
Şekil 3: AZ628 uygulaması sonucu direnç kazanan IGR-39R (100 µM) ve A375R (10 µM) hücre hattı üzerinde 500 µM'a kadar AZ628 dozları uygulaması, 48 saat sonrası hücre canlılık grafikleri.



Şekil 5: A375 hücre hatlarında; Vemurafenib (AZ628)'in tek başına kullanıldığı kuyucuklarda 6. siklustan sonra direnç ve koloni oluşumu

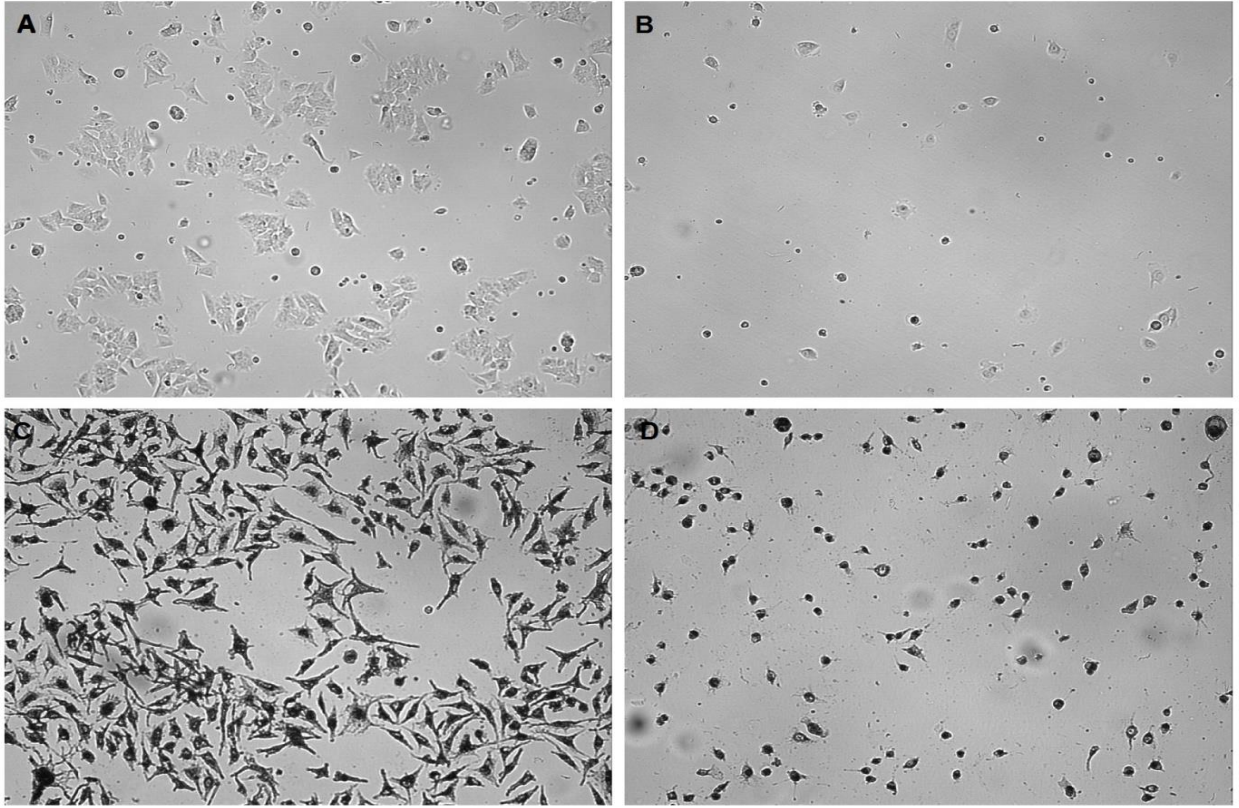


Şekil 6: IGR-39 hücre hatlarında; Vemurafenib (AZ628)'in tek başına kullanıldığı kuyucuklarda 6. siklustan sonra direnç ve koloni oluşumu

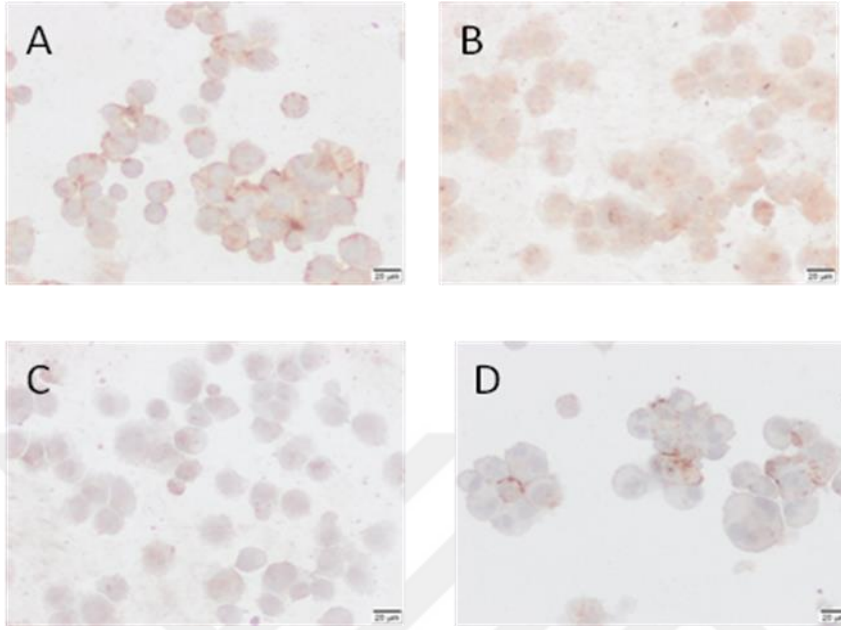


Şekil 7: Hücre hatlarında ve dirençli kolonilerde HIF1 ekspresyon düzeyleri

Vemurafenib ve HIF inhibitörünün birlikte kullanıldığı kuyucuklarda 3. siklusda şiddetli sitotoksosite nedeniyle dozlamaya devam edilemedi. Kalan az sayıda hücrede, hücre morfolojilerinde farklılaşma gözlemlenmeye başladı. Morfolojisi değişen hücrelerin karakterizasyonu ve dirençli koloni elde edilmesi için kombine tedavi uygulanan deney kollarına 10 siklus wash out periyodu uygulandı ve ardından kombine tedavi verildi. 2 siklus sonra bu grupta da dirençli hücreler elde edildi.



Şekil 8: A.10 μ M AZ628, B.10 μ M AZ628 ve 50 μ M Px478 uygulanan A375 hücre hattının 3. siklus sonrası görüntüsü. C.100 μ M AZ628, D.100 μ M AZ628 ve 50 μ M Px478 uygulanan IGR-39 hücre hattının 3. siklus sonrası görüntüsü.



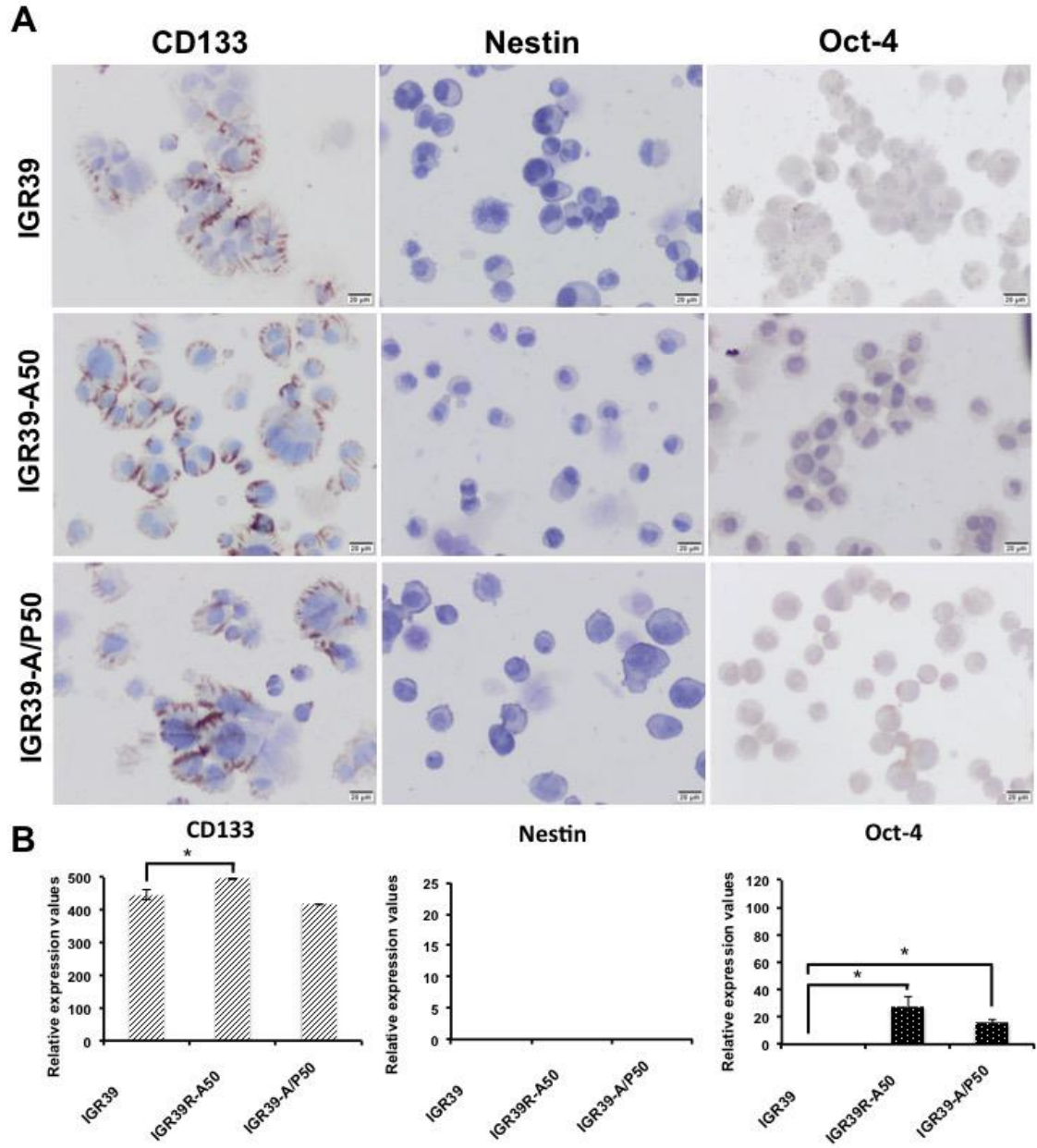
Şekil 9: Tüm dirençli kolonilerde HmB45 (C-D) ve S100 (A-B) doğrulaması

Tüm dirençli kolonilere özellikle morfolojisi değişen hücreleri teyit etmek için HmB45 (C-D) ve S100 (A-B) doğrulaması yapıldı. Daha sonra hücrelerin morfolojik analizi için immunhistokimya çalışmaları uygulandı.

Tablo 1: İmmunhistokimya çalışmaları

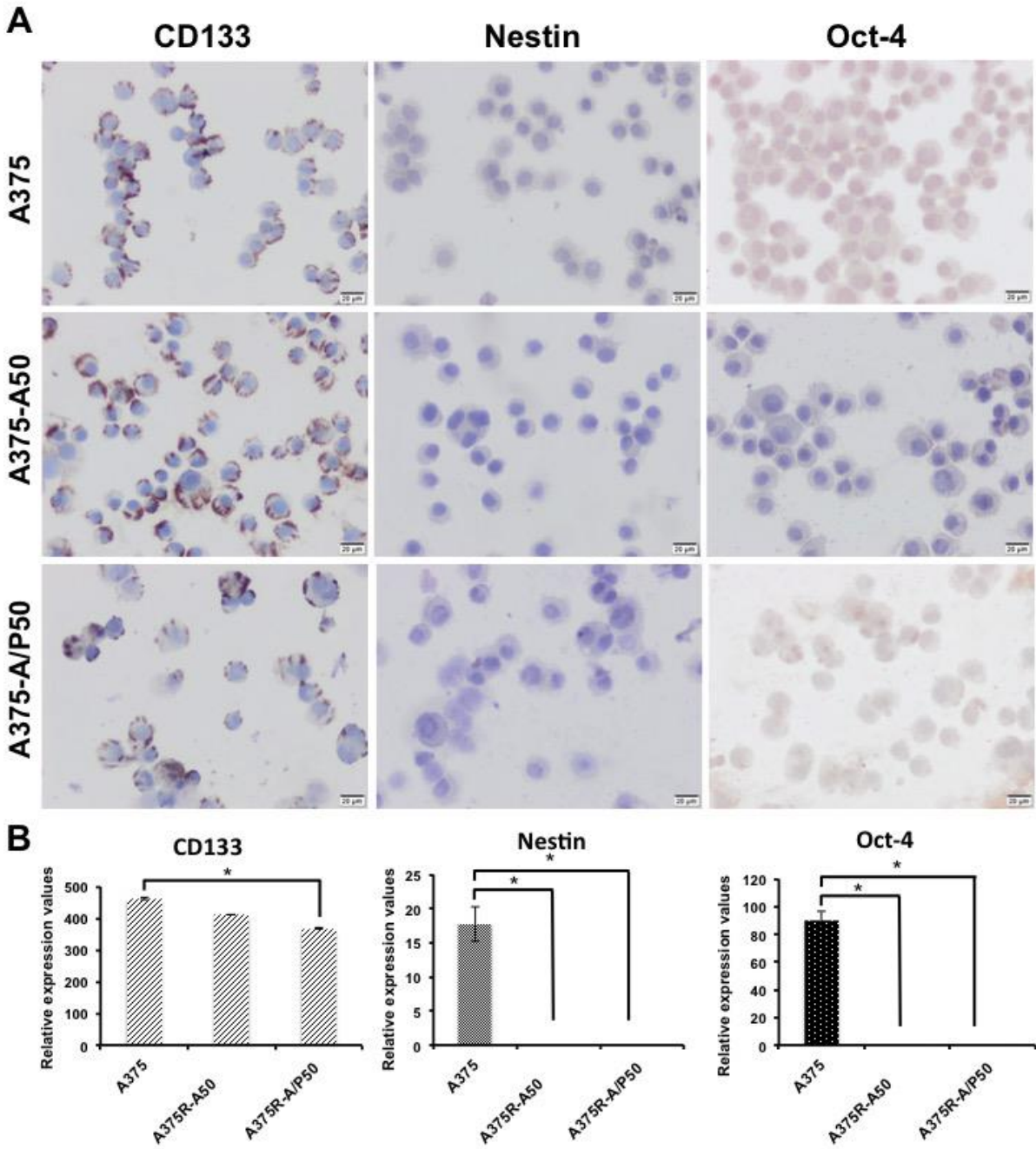
HSCOR E %	A375	A375R- A50	A375R- A/P50-2	IGR39	IGR39- 39R-A50	IGR39- A/P50-2
C-Met	9 ±1.49	0±0	29.8 ± 6.27	12±0.5	6.7 ± 0.82	20.7 ± 5.42
Oct ¾	90.0 ± 6.99	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	27.4 ± 7.05	16.2 ± 1.75
Pgk 1	33.4 ± 2.68	62.5 ± 6.70	0 ± 0	60.9 ± 7.25	46.0 ± 6.28	39.64 ± 3.56
Nestin	17.8 ± 2.57	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
CD133	461.1 ± 6.11	409.3±4.04	366 ± 5.30	446.7±15.01	496 ± 1.73	418.3 ± 1.53
MEK1	376±46.19	409± 0	284.8±81.11	58.67±33.31	487.7±2.52	42.67±9.23
PTEN	200± 0	200± 0	200 ± 0	240±17.32	266.7 ± 2.52	226.7 ± 11.55
STAT3	200± 0	300± 0	200± 0	200± 0	300± 0	300± 0

IGR39 hücre hattında Oct ¾ ve CD133 ekspresyonunda tekli tedavide daha belirgin olmak üzere artış saptandı. Bu durum tümör hücrelerinde kök hücre benzeri transformasyon olarak yorumlandı.



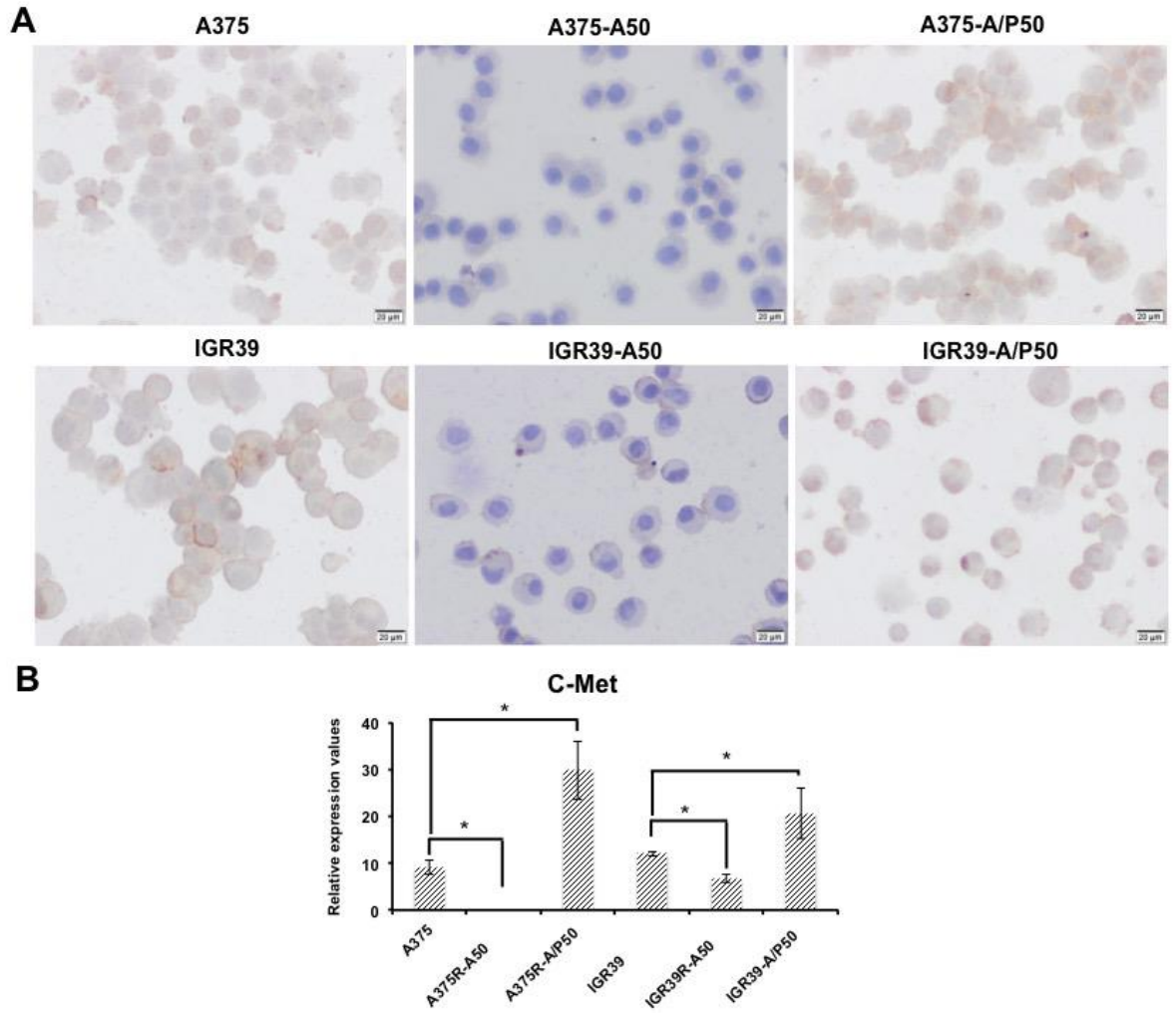
Şekil 10: IGR39 hücre hattında Oct $\frac{3}{4}$ ve CD133 ekspresyonu

A375 hücre hattında Oct $\frac{3}{4}$ ve Nestin ekspresyonunda tedavi sonrası kayıp saptandı. Bu bulgu matur hücre yönünde diferansiyasyon olarak yorumlandı.



Şekil 11: A375 hücre hattında Oct $\frac{3}{4}$ ve Nestin ekspresyonu

Her iki hücre hattı çalışma kollarında C-Met ekspresyonu değerlendirildiğinde Kombine tedavi uygulanan kollarında C-Met ekspresyonunda artış saptanırken tekli tedavi uygulanan kollarında azalma saptandı.

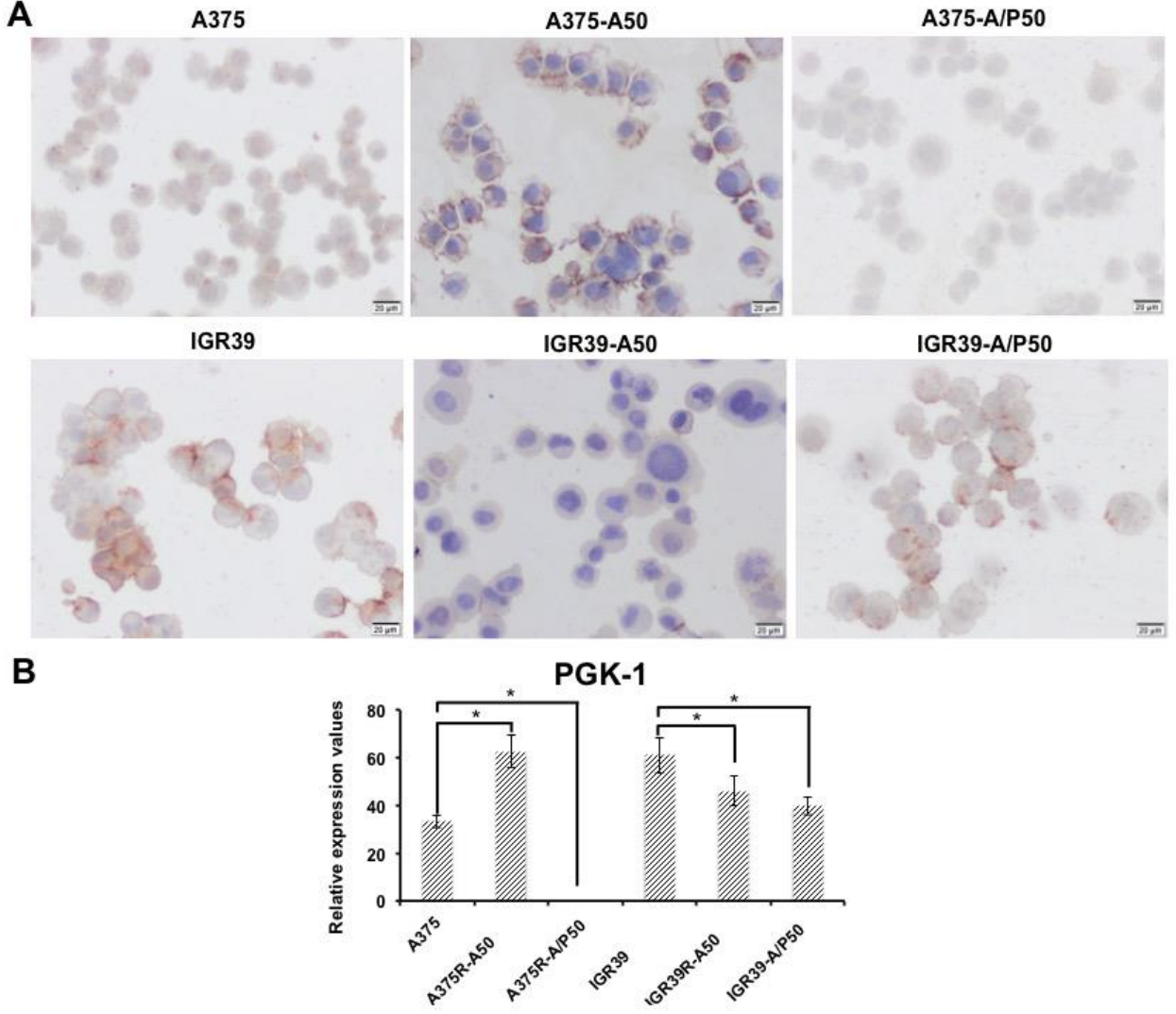


Şekil 12: Çalışma gruplarında C-Met ekspresyonu

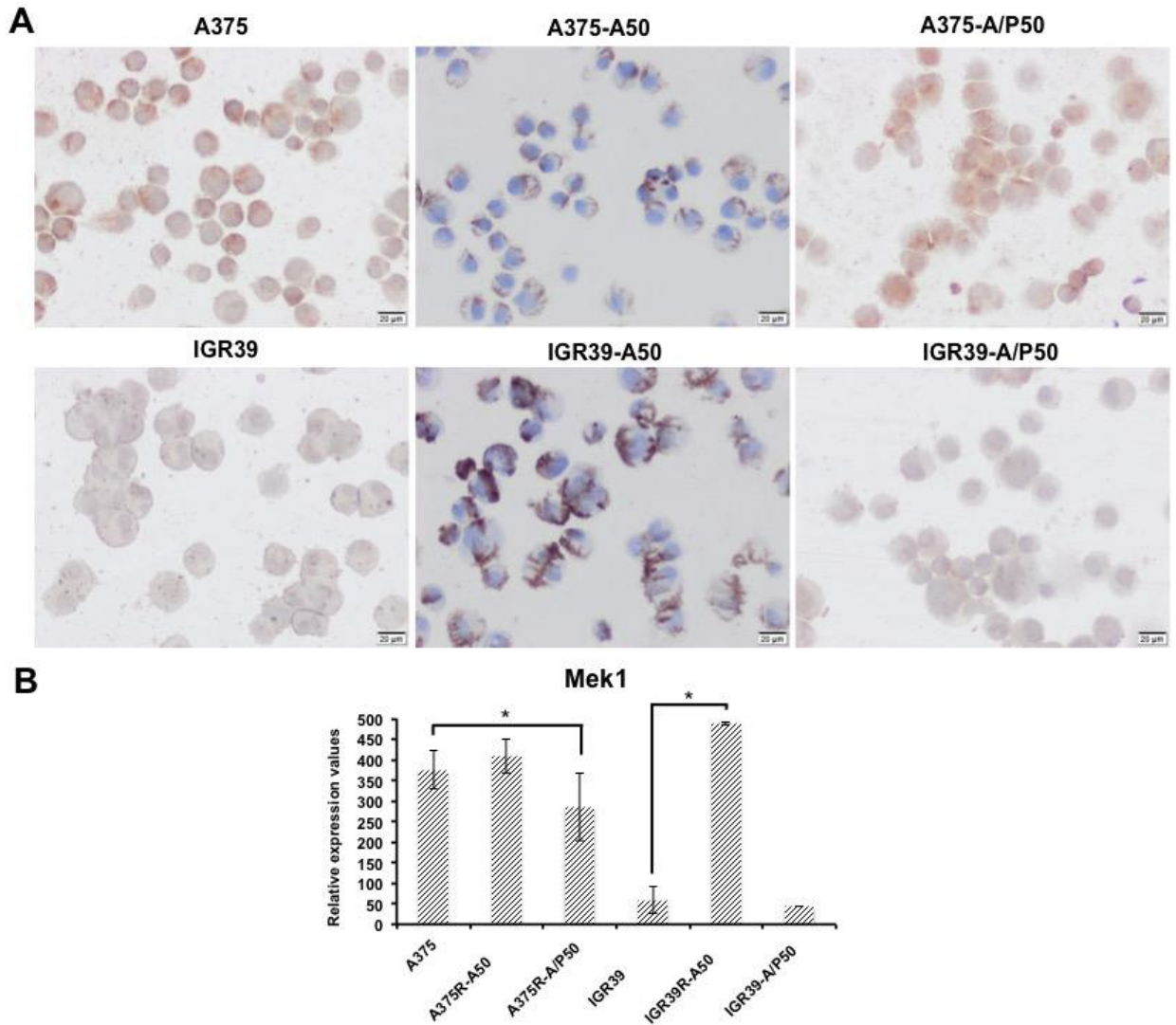
PKG1 up regülasyonu metastatik fenotip kazanımının göstergesi, A375'e ait deney kollarında BRAF inhibitörüne direç kazanımında PKG1 up regüle oluyor ve hücreler metastatik fenotip kazanıyor, HIF inhibitörü ile birlikte BRAF inhibitörü kullanımında ise PKG1 down regüle oluyor ve metastatik potansiyel azalıyor.

IGR39'a ait deney kollarında başlangıçta zaten PKG1 ekspresyonu oldukça yüksek yani bu fenotipte metastatik davranış potansiyeli daha yüksek, HIF ve BRAF inhibitörü birlikte kullanıldığında PKG1 anlamlı şekilde down regüle oluyor ancak

ekspresyonu sürüyor. Bu hücre fenotipi diğerinden daha yüksek bir metastatik potansiyel taşıyor.



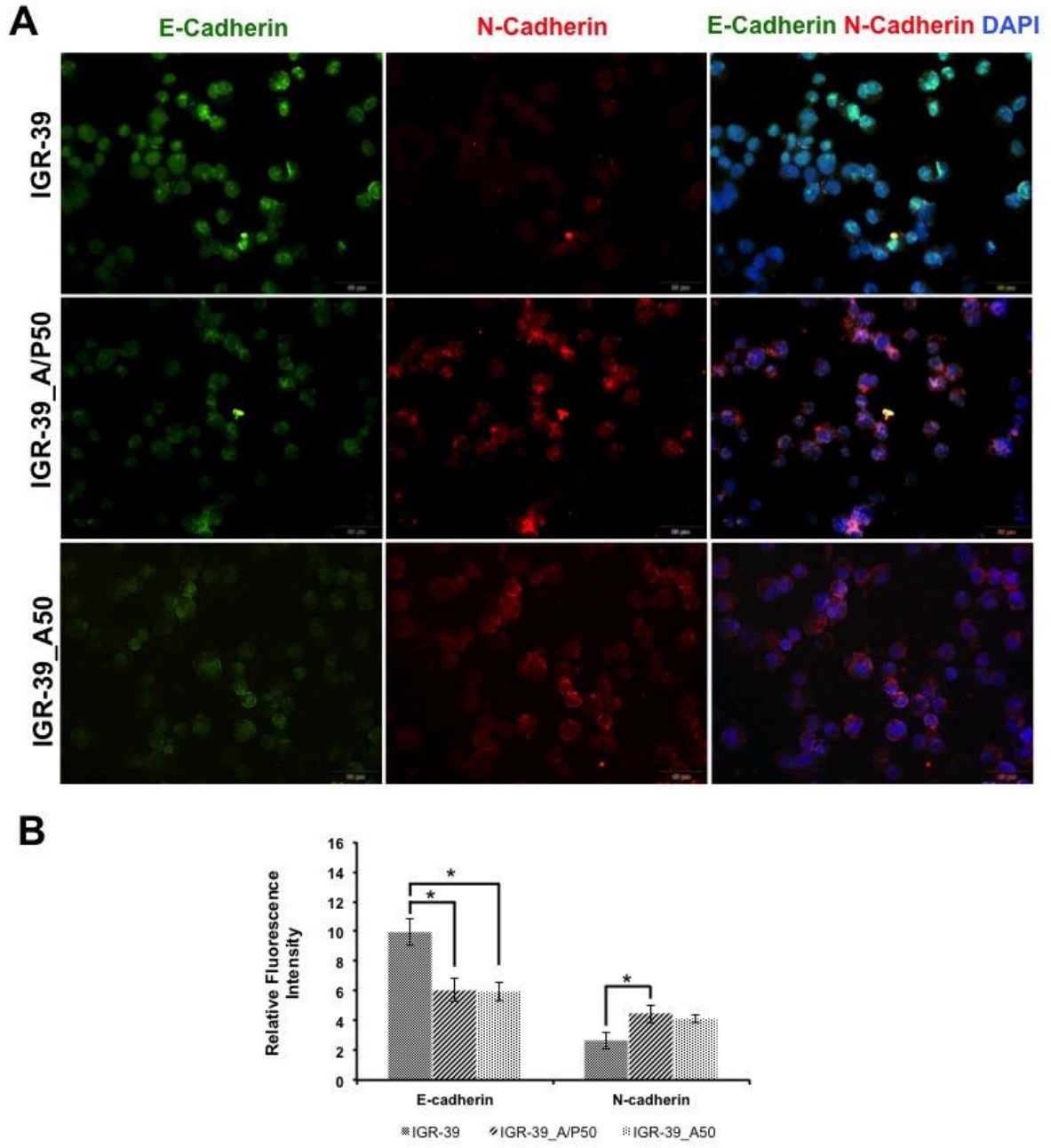
Şekil 13 : Çalışma gruplarında PGK1 ekspresyonu



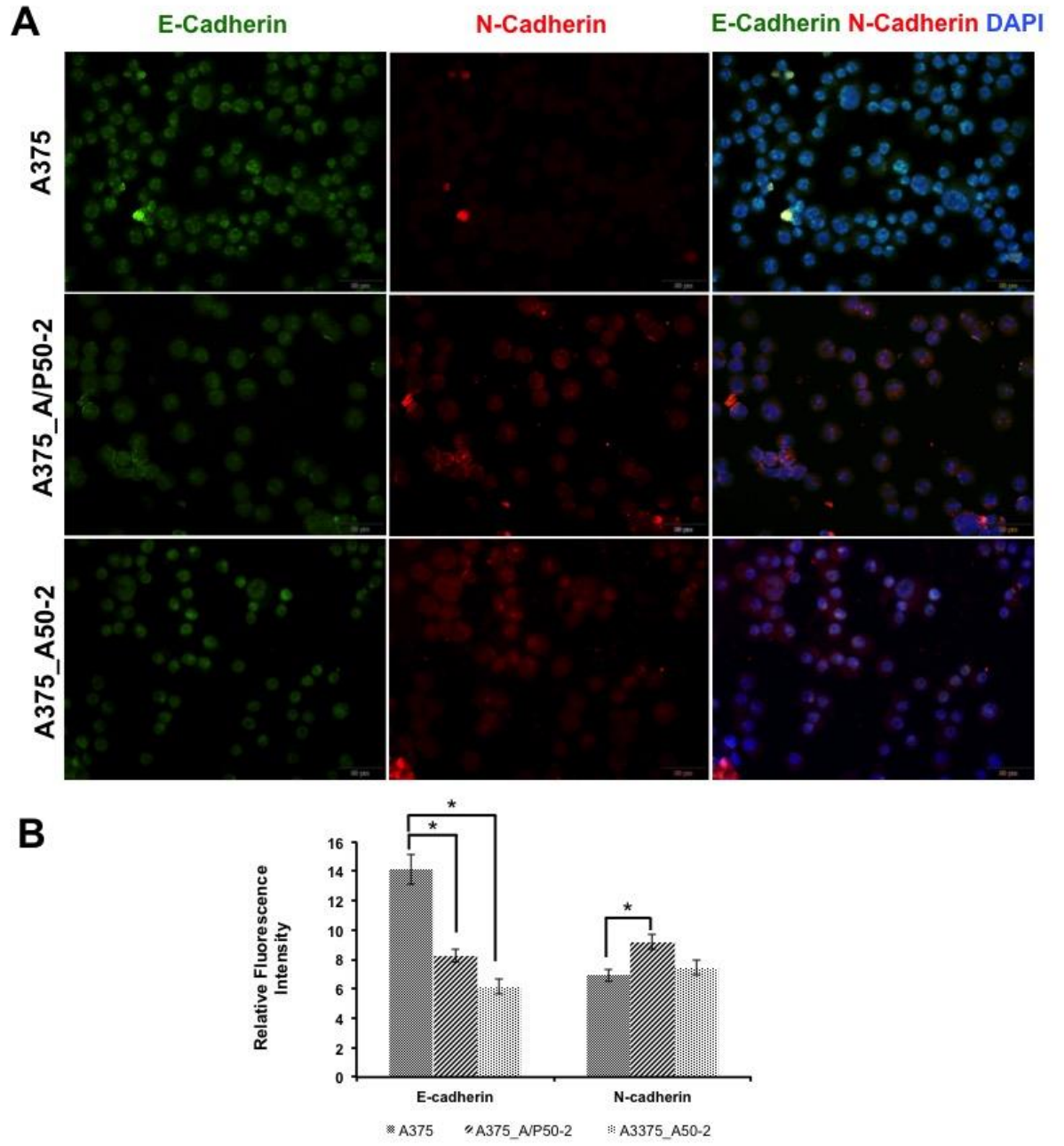
Şekil 14 : Çalışma gruplarında MEK1 ekspresyonu

Tek başına BRAF inhibitörü kullanımında belirgin MEK1 ekspresyonunda artışla MEK1 aracılı direnç görülürken kombine tedavide uygulanan çalışma kollarında ekspresyonda azalma saptandı.

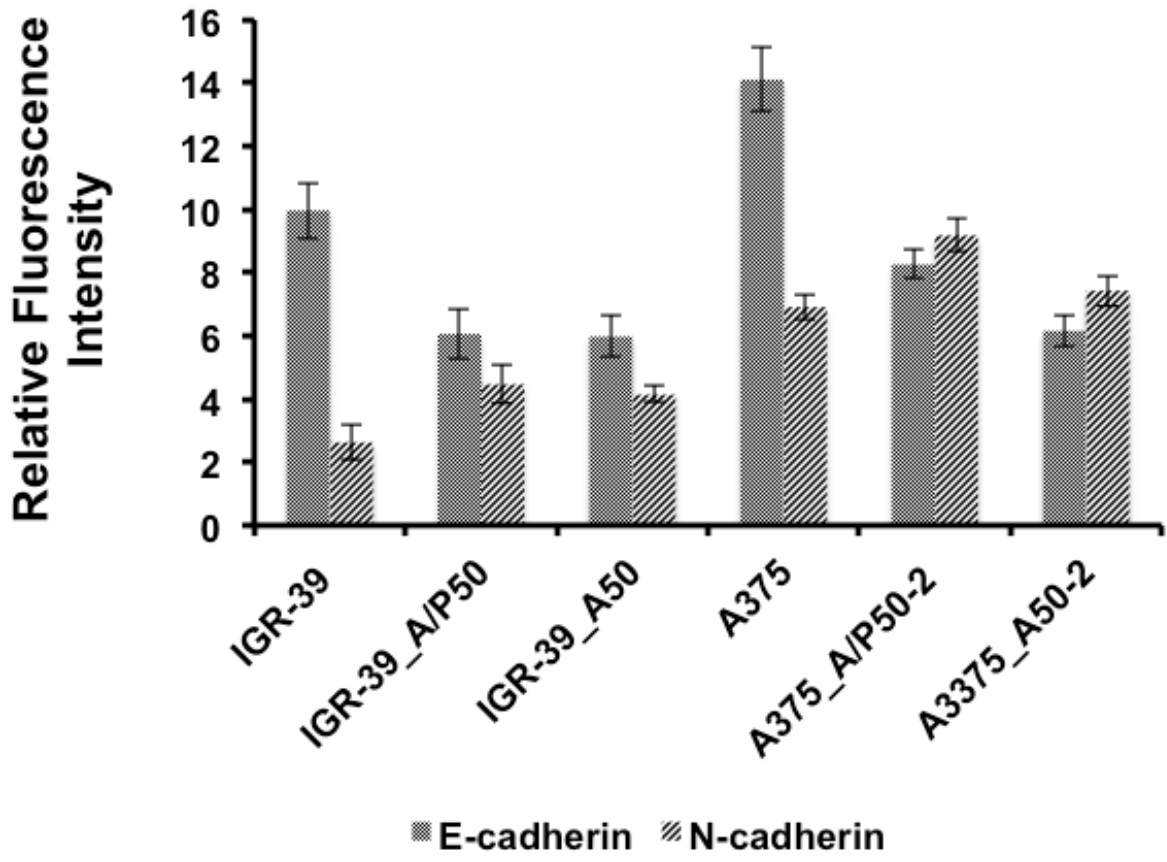
IGR-39 ve A375 deney kollarında direnç gelişimi sonrası hücrelerde E-kaderin ekspresyonunda azalma buna karşılık N-kaderin ekspresyonunda artışla epitelial mezenşimal geçiş ve metastatik karakterde artış saptandı.



Şekil 15: IGR39 gruplarında E-Caderin ve N-Caderin ekspresyonu



Şekil 16 : A375 gruplarında E-Caderin ve N-Caderin ekspresyonu



Şekil 17 : Deney gruplarında E-Caderin ve N-Caderin ekspresyonunun dağılımı

4. TARTIŞMA

Melanom hücre popülasyonları homojen olmayıp farklı migrasyon, proliferasyon ve ilaç direnç potansiyellerine sahip olabilmektedirler. Biz çalışmamızda homozigote mutant BRAF V600E and heterozigote mutant BRAF V600E melanoma cell lines ların BRAFi direnç gelişim sürelerini benzer bulduk. Ancak benzer oranda sitotoksik etki sağlayabilmek için heterozigote mutant hücre hattına 10 kat yüksek dozda BRAFi kullanmamız gerektiğini saptadık. Klinik pratikte tedavi dozumuz standart ve mutasyon tipine göre doz düzenlemesi yapmıyoruz. Her iki hücre hattında, BRAF inhibitör direnci öncesi ve sonrası yüksek miktarda HIF ekspresyonu tespit edildi. HIF1 oksidatif düzenlenmeler, fosfoglisarat kinaz 1 (PGK1)'i de içeren glikolitik yollar, tümör büyümesi ve anjiogenezi control etmektedir. (12,13).

BRAFi direncinde belirgin MEK1, PGK1 ve C-Met ekspresyonu varken HIFi kombinasyonu ile bunlarda belirgin azalma olduğu saptandı. Tek başına toksik etki göstermemesine karşın kombine tedavi kollarında şiddetli sitotoksiste HIF inhibitörünün melanom tedavisinde BRAF inhibitörlerinin etkinliğini belirgin arttırdığını ve daha iyi MAPK yolağı, glikolitik yolk ve tümör invazyon potansiyelinin daha iyi control edildiği saptanmıştır.

Kanser hücrelerinin anormal redoks sistemleri ve metabolizmalarına etkisi ilk olarak Warburg etkisi olarak tanımlanmıştır (14) ATP normal hücresel proseslerin devamı için gereklidir, tümör hücrelerine hızlı üremeyi sağlayacak derecede ATP gerekmektedir. Özellikle tümör hücrelerinin bu çoğalmayı sağlamak için, normalde stres koşulları altında çoğalmayı engelleyecek olan kontrol noktalarından kaçınması gerekirken, böyle koşullar anormal tümör mikro çevreleri olarak belirlenmiştir. Tümör hücreleri bu gereklilikleri sağlamak amacıyla kendi metabolik yollarını kullanırlar. En iyi karakterize olmuş metabolik fenotip Warburg etkisi olarak bilinmektedir. Bu yolk normal oksijen koşullarında bile, oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP sentezinden kaçınmayı sağlar (15). Bunun bir sonucu olarak da, normal hücrelerin aksine, birçok hücre enerji gereksinimini aerobik glikolizden sağlamaya

başlar. Glikozun laktik asite çevrilmesi, mitokondri aracılığıyla oksidatif fosforilasyondan kaçınmaları ile olur (16). ATP üretimi de bu sayede glikoliz ile oksidatif fosforilasyondan daha hızlı bir biçimde gerçekleşir. Warburg etkisi olarak bilinen bu tanımla da tümör hücreleri kendilerine gereken yüksek enerji, redox ve biyosentez ihtiyaçlarını karşılarlar (17).

PGK1 bir glukolitik enzim kanser metabolizmasının koordinasyonunda kritik bir rol oynuyor. PGK1 Warburg etkisi ve kanser hücrelerinin proliferasyonunda kritik destek sağlıyor. BRAF gibi kanser genleri PGK1'in hücrenin mitokondrisinde "translokasyon" yapmasına izin veriyor. Artmış PGK1 ekspresyonu kanser hücrelerinde kötü prognostik faktör ve metastatik potansiyelle ilişkili olarak tanımlanmakta.

Homozigot mutasyona sahip hücrelerde, BRAF inhibitörü direç kazanımı ile PKG1 up regüle oluyorken, HIF inhibitörü ile birlikte kullanımında PKG1 down regüle oluyor ve kök hücre özellikleri de kayba uğramaktadır. Kombine tedavi kullanılan gruplarda direnç gelişimi belirgin olarak C-MET'in up regulasyonu ile ilişkili iken, sadece BRAF inh kullanılan homozigot mutasyona sahip hücrelerde PGK1, heterozigot mutasyon taşıyan grupta MEK ilişkili olarak saptanmıştır.

Heterozigot mutasyona sahip hücrelerde başlangıçta PGK1 ekspresyonu zaten yüksek yani yüksek proliferatif potansiyel mevcutken, HIF1 ve BRAF inh birlikte kullanıldığında ekspresyonu down regüle olmakla birlikte devam ettiği saptandı. Bu mutasyon tipi tedaviye hem doğal hem de edinilmiş direç konusunda çok daha adaptif ancak HIF1 inhibitörü ile yapılan tedavi kombinasyonu her iki hücre hattı içinde çok daha etkili görünüyor. HIF-1 hipoksiye adaptasyon cevabında anahtar rol oynayan düzenleyici proteindir. HIF-1, PI3K ve mitogen-activated protein kinase (MAPK) sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile düzenlenir. Bu transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile yine bir büyüme faktörü olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve diğer hedef genlerin ekspresyonunun artması ve anjiyogenezin hızlanması söz konusudur. Bu proteinin etki ettiği diğer mekanizmalar, çok sayıda

genin transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücrelerin dediferansiyasyonu, vaskülarizasyon, otokrin büyüme faktörü üretimi , proliferasyon, invazyon ve metastaz, metabolik yeniden programlanma, tümör büyümesinin artması olarak sıralanabilir (20,21).

Hem artmış HIF ekspresyonu hem de B-Raf V600E mutasyonu Melanom da yüksek proliferatif ve metastatik potansiyeli beraberinde getirmektedir. Hipoksi fenotipik hücre plastisitesini ve ilaç direncinden sorumlu aynı zamanda BRAF inhibitörleri de kanser hücresinde fenotip değişimini uyarmakta bu da kanser hücresinde invaziv davranış ve metastatic potansiyeli arttırmaktadır (18,19). Çalışmamızda, BRAF inhibitor direnci sonrası, her iki hücre hattında da E-kaderin ekspresyonunda azalma buna karşılık N-kaderin ekspresyonunda artışla epithelial mezenşimal geçişte (EMT) artış saptadık. EMT geridönüslü embriyonik bir process olup kanserlerin disseminasyonu sırasında reaktivasyonu gerçekleşmektedir (20,21), böylece tümör invazyonunu ve metastatic yayılımı yönlendirmektedir (22). Aslında, fenotipik switching, EMT ve kanser kök hücre plastisitesi aynı fenomenin farklı komponentlerini tanımlamaktadır. EMT ile kök hücre benzeri plastisite arasındaki direk ilişki iyi bilinmektedir. Bu ilişki kanser hücresi içinde korunmakta ve uygun koşullarda tekrar active olmaktadır. Kök hücre benzeri fenotipkanser hücresinde kendini yenileme, adaptasyon, heterojenite, diferansiasyon ve tümörün metastatic potansiyelini arttırmaktadır (23, 24). Böylece başta ilaç direnci olmak üzere kanser hücresinin adaptif yetenekleri arttığı gibi daha az diferansiye bir hücreye dönüşerek spesifik antijen sunumunu da azaltmaktadır. Tüm bunlar kanser hücresinin tedaviden ve immune sistemden kaçışını kolaylaştırmaktadır. Fenotip swich konseptine göre tümör progresyonu clonaliteden çok büyük hücre populasyonlarının sinyal ağlarının yeniden düzenlenmesine bağlıdır.

Heterozigot BRaf V600E mutant hücre populasyonu başlangıçta ekspresyon göstermemesine karşın BRAF inhibitor maruziyeti sonrası kök hücre marker ı olan Oct $\frac{3}{4}$ and CD133 ekspresyonu göstererek kök hücre benzeri diferansiyasyon

göstermiştir. Bununla birlikte homozigot BRAf V600E mutant hücreler başlangıçta var olan kök hücre benzeri ekspresyonlarını kaybetmişlerdir. BRAFv600E mutasyonuna sahip bu iki hücre hattından heterozigot mutasyon taşıyan kanser hücrelerinde tedavi sonrası kök hücre benzeri transformasyonla agresif karakter kazanımı meydana gelirken bu mutasyonu homozigot taşıyan melanom hücrelerinde ise bu özelliğin kayba uğradığı daha matur bir diferansiasyon olduğu görüldü. Direnç gelişimi sonrası tüm deney kollarında hücre bağlantılarında kayıpla metastatik potansiyelde artış. BRAF inhibisyonu melanoma hücrelerinde fenotip değişikliğine neden olmaktadır. Fakat BRAf V600E mutasyonunun farklı tipleri bu fenotip değişikliğinin farklı yönlerde gerçekleşmesine neden olmaktadır.

cMET ekspresyonunda artış melanomda BRAF-inhibitör direnci ve tümör invazyonu ile ilişkilidir (25). PGK1 bir glikolitik olup enzim kanser metabolizmasının koordinasyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Hipoksi (ilişkili HIF), EGFR aktivasyonu, ve B-Raf V600E mutasyonu PGK1 de mitokondriyal translokasyona neden olmaktadır (26). Çalışmamızda başlangıçta PGK1 ve C-Met ekspresyonunun homozigote BRAf V600E mutant hücrelerde daha yüksek olması, 10 kat yüksek doz BRAF inhibitörü ile benzer tedavi etkinliğinin sağlanabilmesi, bu fenotipe sahip hücrelerde tedavi öncesi bir miktar primer direnç olduğuna dair güçlü bulgular vermektedir. Direnç gelişimi sonrası kök hücre benzeri fenotip değişikliğinin görülmesi ise tedaviye direnç konusunda çok daha adaptif potansiyele sahip olduklarının göstergesidir. Kök hücre benzeri fenotip kanser hücresinde farklılaşma, tümör heterojenitesi yaratma ve metastatik potansiyeli arttırdığından, bu genotipte mutasyona sahip melanoma hücrelerinin tedaviye direnç ve metastatik davranış açısından daha agresif potansiyele sahip oldukları görüldü. Homozigot mutant hücrelerde ise tedaviye 10 kat düşük dozlarda yanıt söz konusu olup, direnç gelişimi sonrası kanser kök hücre özellikleri kayba uğramaktadır. Daha düşük diferansiasyon, heterojenite ve ilaç direnci potansiyeli taşımaktadırlar. Hem tedavi yanıtının ve hem de tedavi sonrası direnç geliştiğinde meydana gelen fenotip

değişikliğinin homozigot and heterozigot mutant hücrelerde farklı olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçları BRaf V600E mutasyon tipinin melanomda hücre plastisitesi, ilaç adaptasyonu ve direncinin kontrolünde önemli bir etken olduğunu göstermektedir. Daha önce melanomda aynı mutasyonun farklı formlarının tedaviye etkisi çalışılmamıştı. Aynı mutasyon tipine sahip hücrelerde mutasyona spesifik tedaviyle bile tedavi etkinliğinin farklılık gösterdiğini saptadık. Melanom hücre popülasyonları homojen değildir. Farklı migrasyon, proliferasyon, ve tümör başlangıç potansiyelleri mevcuttur. Bu mutasyon tiplerinin hücrenin mevcut metastatik ve hücre içi yeniden düzenlenmelerin adaptif direnç sırasında farklı yanıtlara yol açması nedeniyle, BRAF inhibitör dirençli hastalarda sonraki tedavi basamağında tedavi seçiminde bu yeniden düzenlenmelerin mutasyon tipine göre gözden geçirilmesi tedavi başarısını arttırabilir. Klinik pratikte mutasyon tipine göre ilaç doz düzenlemesi yapılmamaktadır. Başlangıç BRAFi dozlarının mutasyon tipine göre düzenlenmesi ile tedavi başarısı arttırılabilir. Kombinasyon tedavilerinde seçilecek yeni hedeflerde mutasyon tipini de değerlendirmeye almamız gerekecek gibi görünmektedir. Biz tümör heterojenitesini anladıkça, bireyselleştirilmiş tedaviler ön plana çıkmaktadır. Mutasyon tiplerinin direnç sırasında farklı yanıtlara yol açması nedeniyle BRAFi ile kombine edilecek ilaçları seçerken mutasyon tipine göre değişen phenotype switching in göz önünde bulundurulması, BRAF inhibitör dirençli hastalarda sonraki tedavi basamağında tedavi başarısını arttırabilir. Mutasyon tipi ile BRAFi direnç gelişim süresi, direnç gelişimi sonrası immunotherapy yanıtı ve sağ kalım ilişkisini değerlendiren çalışmalar management of BRAFi therapy yeni bir yaklaşım ortaya koyabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, Garbe C. MAPK pathway in melanoma part II-secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Eur J Cancer*. 2017;73:93-101.
2. Richard G, Dalle S, Monet MA, Ligier M, Boespflug A, Pommier RM, de la Fouchardière A, Perier-Muzet M, Depaepe L, Barnault R, Tondeur G, Ansieau S, Thomas E, Bertolotto C, Ballotti R, Mourah S, Battistella M, Lebbé C, Thomas L, Puisieux A, Caramel J. ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Mol Med*. 2016 4;8(10):1143-1161.
3. Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus LE, et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res* 2008; 68:4853–4861.
4. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010; 468:973–977.
5. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 2011; 480:387–390.
6. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010; 468:968–972.
7. Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Ralph SJ, et al. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing overexpression of specific glycolytic isoforms. *MRCM*. 2009;9:1084–1101.
8. Hanna SC, Krishnan B, Bailey ST, Moschos SJ, Kuan PF, Shimamura T, Osborne LD, Siegel MB, Duncan LM, O'Brien ET III, et al: HIF1 α and HIF2 α independently activate SRC to promote melanoma metastases. *J Clin Invest*. 123:2078–2093. 2013.

9. Kumar SM, Yu H, Edwards R, Chen L, Kazianis S, Brafford P, Acs G, Herlyn M and Xu XW: Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. *Cancer Res.* 67:3177–3184. 2007.
10. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(7):455-67.
11. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: 0034.1-0034.11.
12. Hanna SC, Krishnan B, Bailey ST, Moschos SJ, Kuan PF, Shimamura T, Osborne LD, Siegel MB, Duncan LM, O'Brien ET III, et al: HIF1 alpha and HIF2 α independently activate SRC to promote melanoma metastases. *J Clin Invest.* 123:2078–2093. 2013.
13. Semenza GL. Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:347–353.
14. Kim J-w, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer research.* 2006;66(18):8927-30.
15. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-14.
16. Semenza GL, Artemov D, Bedi A, Bhujwalla Z, Chiles K, Feldser D, et al., editors. 'The metabolism of tumours': 70 years later. *The Tumour Microenvironment: Causes and Consequences of Hypoxia and Acidity: Novartis Foundation Symposium 240; 2001: Wiley Online Library.*
17. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer.* 2011;11(2):85-95.
18. O'Connell MP, Marchbank K, Webster MR, Valiga AA, Kaur A, Vultur A, Li L, Herlyn M, Villanueva J, Liu Q, et al: Hypoxia induces phenotypic plasticity and therapy resistance in melanoma via the tyrosine kinase receptors ROR1 and ROR2. *Cancer Discov.* 2013; 3:1378–1393.

19. Kemper K, de Goeje PL, Peeper DS, van Amerongen R. Phenotype switching: tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy. *Cancer Res.* 2014 Nov 1;74(21):5937-41.
20. Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C et al (2008) Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* 68: 937 – 945
21. Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, Devouassoux-Shisheboran M, Treilleux I, Tissier A, Gras B et al (2012) EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* 8: e1002723
22. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871 – 890
23. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Apr 11. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.44.
24. Filitis DC, Rauh J, Mahalingam M. The HGF-cMET signaling pathway in conferring stromal-induced BRAF-inhibitor resistance in melanoma. *Melanoma Res.* 2015; 25(6):470-8.
25. Vergani E, Vallacchi V, Frigerio S, Deho P, Mondellini P, Perego P, et al. Identification of MET and SRC activation in melanoma cell lines showing primary resistance to PLX4032. *Neoplasia* 2011; 13:1132–1142.
26. Li X, Jiang Y, Meisenhelder J, Yang W, Hawke DH, Zheng Y, Xia Y, Aldape K, He J, Hunter T, Wang L, Lu Z. Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. *Mol Cell.* 2016 Mar 3;61(5):705-19. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.009.

7. EKLER

Etik Kurul

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

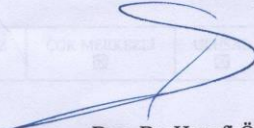
Sayı : 10840098 – 49
Konu: Etik Kurulu Kararı

23/01/2015

Sayın Doç. Dr. Yasemin BASKIN

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Malign melanom hücre dizilerinde BRAF inhibitörü direncinin HIF 1 ekspresyonu ile ilişkisinin araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.


Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

EK:
-Karar Formu (2 sayfa)

Tel: (0216)681 51 37
Faks: (0212)531 75 55
E-mail: ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres: Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No: 19, 34810
Kavacık/BEYKOZ

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Malign melanom hücre dizilerinde BRAF inhibitörü direncinin HİF 1 ekspresyonu ile ilişkisinin araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Yasemin BASKIN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Onkoloji Enstitüsü			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	15.12.2014		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	15.12.2014		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
Karar Bilgileri	Karar No: 46	Tarih: 23.01.2015		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Tangül MÜDOK	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Emir YÜZBAŞIOĞLU	Protetik Diş Tedavisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Muhammed Fatih EVCİMİK	Kulak-Burun Boğaz	Özel Nisa Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	

* :Toplantıda Bulunma



GÜLSÜM GENÇOĞLAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	66223326662
Doğum Tarihi	11/02/1975
İletişim Adresi	CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAK. DERMATOLOJİ A.D.
Telefon	(505) 456 15 29
E-posta	ggencoglan@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2013 - 01 Şubat 2018 (4 yıl 6 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
Tez Başlığı: Mali?gn Melanom Hücre Di?zi?leri?nde Braf I?nhi?bi?törü Di?renci?ni?n
Hi?f 1 Ekspresyonu I?le I?li?şki?si?ni?n Araştırılması
Tez Konusu: Mali?gn Melanom Hücre Di?zi?leri?nde Braf I?nhi?bi?törü
Di?renci?ni?n Hi?f 1 Ekspresyonu I?le I?li?şki?si?ni?n Araştırılması
Tarih: 16 Eylül 2015
Tez Danışmanı: YASEMİN BAŞBINAR

16 Şubat 2001 - 16 Şubat 2005 (4 yıl 1 ay)
DİĞER (Ege Üniversitesi), TÜRKİYE
DİĞER, DİĞER
Eğitim Alt Alanı: DERMATOLOJİ

01 Ocak 1995 - 01 Ocak 1999 (4 yıl 1 ay)
DİĞER (Çukurova Üniversitesi), TÜRKİYE
DİĞER, DİĞER

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Mayıs 2018 - Şu Anda (7 ay) (Tam Zamanlı)
PROF., PROF., MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İdari Görev: ENSTİTÜ/MERKEZ MÜDÜRÜ

01 Ocak 2008 - 01 Ocak 2012 (4 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
DOKTORALI ÖĞRETİM ÜYESİ, YRD. DOÇ. DR., DİĞER (Celal Bayar Üniversitesi)

01 Ocak 2006 - 01 Ocak 2008 (2 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
DOKTORALI ÖĞRETİM ÜYESİ, YRD. DOÇ. DR., DİĞER (Afyon Kocatepe Üniversitesi)

01 Ocak 2005 - 01 Ocak 2006 (1 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
UZMAN, UZMAN, DİĞER (Ege Üniversitesi)

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

G. GENCOGLAN, I. INANIR, M. MISKIOGLU & K. GUNDUZ, Evaluation of sequential effect of isotretinoin on the haematological parameters in patients with acne vulgaris, CUTANEOUS AND OCULAR TOXICOLOGY, 2018, 1556-9527, 37, 2, 139-142.

G. GENCOGLAN, I. INANIR & A. T. ERMERTCAN, Hypopyon-like features: new dermoscopic criteria in the differential diagnosis of cutaneous lymphangioma circumscriptum and haemangiomas?, JOURNAL OF THE EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY, 2012, 0926-9959, 26, 8, 1023-1025.

G. GENCOGLAN & F. OZDEMIR, Nonmelanoma Skin Cancer of the Head and Neck Clinical Evaluation and Histopathology, FACIAL PLASTIC SURGERY CLINICS OF NORTH AMERICA, 2012, 1064-7406, 20, 4, 423-+.

G. ESKIIZMIR, G. GENCOGLAN, P. TEMIZ & A. T. ERMERTCAN, Angiokeratoma circumscriptum of the tongue, CUTANEOUS AND OCULAR TOXICOLOGY, 2011, 1556-9527, 30, 3, 231-233.

G. GENCOGLAN & M. TOSUN, Effects of isotretinoin on spermatogenesis of rats, CUTANEOUS AND OCULAR TOXICOLOGY, 2011, 1556-9527, 30, 1, 55-60.

G. GENCOGLAN, I. INANIR, O. SAHIN & K. GUNDUZ, Imiquimod 5% cream for isolated lichen planus of the lip, JOURNAL OF DERMATOLOGICAL TREATMENT, 2011, 0954-6634, 22, 1, 55-59.

A. T. ERMERTCAN, F. OZTURK, G. GENCOGLAN, I. INANIR, N. OZKUTUK & P. TEMIZ, Pott's disease with scrofuloderma and psoas abscess misdiagnosed and treated as hidradenitis suppurativa, JOURNAL OF DERMATOLOGICAL TREATMENT, 2011, 0954-6634, 22, 1, 52-54.

G. GENCOGLAN, F. OZTURK, I. INANIR, M. MISKIOGLU, P. TEMIZ & K. GUNDUZ, Primary cutaneous anaplastic CD30(+) large-cell lymphoma that completely regressed after incisional skin biopsy, CUTANEOUS AND OCULAR TOXICOLOGY, 2011, 1556-9527, 30, 2, 163-166.

A. T. ERMERTCAN, F. OZTURK, G. GENCOGLAN, G. ESKIIZMIR, P. TEMIZ & G. D. HORASAN, Sensitivity, predictive values, pretest--posttest probabilities, and likelihood ratios of presurgery clinical diagnosis of nonmelanoma skin cancers, CUTANEOUS AND OCULAR TOXICOLOGY, 2011, 1556-9527, 30, 1, 50-54.

A. T. ERMERTCAN, G. GENCOGLAN, G. TEMELTAS, G. D. HORASAN, A. DEVECI & F. OZTURK, Sexual Dysfunction in Female Patients With Neurodermatitis, JOURNAL OF ANDROLOGY, 2011, 0196-3635, 32, 2, 165-169.

G. ESKIIZMIR, G. GENCOGLAN, P. TEMIZ, Z. HIRCIN & A. ERMERTCAN, Staged-surgery with permanent pathology for the management of high-risk nonmelanoma skin cancer of the nose, EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY, 2011, 0937-4477, 268, 1, 117-121.

G. GENCOGLAN, T. DERELI & A. C. KAZANDI, Subungual glomus tumor: surgical and histopathologic evaluation, CUTANEOUS AND OCULAR TOXICOLOGY, 2011, 1556-9527, 30, 1, 72-74.

G. GENCOGLAN, C. CEYLAN & A. C. KAZANDI, White fibrous papulosis of the neck, CUTANEOUS AND OCULAR TOXICOLOGY, 2011, 1556-9527, 30, 1, 69-71.

G. GENCOGLAN, M. TOSUN & O. GENCOGLAN, Isotretinoin-induced Effects of Mast Cells on Wound Healing, JOURNAL OF DRUGS IN DERMATOLOGY, 2010, 1545-9616, 9, 10, 1207-1210.

A. T. ERMERTCAN, G. ESKİİZMİR, G. GENCOGLAN, U. GUNAY, E. KOCABAS & P. TEMİZ, Lentigo Malignant Melanoma Presenting with Cutaneous Horn, DERMATOLOGIC SURGERY, 2010, 1076-0512, 36, 11, 1759-1762.

G. GENCOGLAN, I. K. KARAARSLAN, A. C. KAZANDI & G. OZTURK, Pityriasis Rotunda, TURKDERM-ARCHIVES OF THE TURKISH DERMATOLOGY AND VENEROLOGY, 2010, 1019-214X, 44, 2, 99-101.

G. GENCOGLAN, I. INANIR & K. GUNDUZ, Therapeutic Hotline: Treatment of prurigo nodularis and lichen simplex chronicus with gabapentin, DERMATOLOGIC THERAPY, 2010, 1396-0296, 23, 2, 194-198.

G. GENCOGLAN, S. SAHIN, B. ERTEKIN, A. C. KAZANDI & C. CEYLAN, Angiolymphoid Hyperplasia with Eosinophilia: A Case Report, TURKDERM-ARCHIVES OF THE TURKISH DERMATOLOGY AND VENEROLOGY, 2009, 1019-214X, 43, 3, 119-121.

G. GENCOGLAN, I. INANIR & K. GUNDUZ, Pyogenic Granuloma in Two Children Successfully Treated with Imiquimod 5% Cream, PEDIATRIC DERMATOLOGY, 2009, 0736-8046, 26, 3, 366-368.

G. GENCOGLAN, M. TOSUN & F. AKTEPE, The molecular mechanism of etanercept, an anti-tumour necrosis factor- α receptor-fusion protein, in the treatment of acute generalized exanthematous pustulosis, JOURNAL OF DERMATOLOGICAL TREATMENT, 2009, 0954-6634, 20, 4, 241-245.

G. GENCOGLAN, I. K. KARAARSLAN, T. AKALIN & F. OZDEMIR, Trichilemmal cyst with homogeneous blue pigmentation on dermoscopy, AUSTRALASIAN JOURNAL OF DERMATOLOGY, 2009, 0004-8380, 50, 4, 301-302.

G. GENCOGLAN, S. KARACA & B. ERTEKIN, Angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia successfully treated with imiquimod, DERMATOLOGY, 2007, 1018-8665, 215, 3, 233-235.

G. GENCOGLAN, B. GERCEKER-TURK, I. KILINC-KARAARSLAN, T. AKALIN & F. OZDEMIR, Dermoscopic findings in Laugier-hunziker syndrome, ARCHIVES OF DERMATOLOGY, 2007, 0003-987X, 143, 5, 631-633.

I. K. KARAARSTAN, G. GENCOGLAN, T. AKALIN & F. OZDEMIR, Different dermoscopic faces of dermatofibromas, JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF DERMATOLOGY, 2007, 0190-9622, 57, 3, 401-406.

G. GENCOGLAN & C. CEYLAN, Two cases of acneiform eruption induced by inhibitor of epidermal growth factor receptor, SKIN PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY, 2007, 1660-5527, 20, 5, 260-262.

Projeler

DİĞER, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, MALİGN MELANOM FARE MODELİNDE ANTİ PD-1 MONOKLONAL ANTİKORU VE C NOVYİ-NT INTRAMURAL UYGULAMASININ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ., Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 15 Mayıs 2016, 15 Mayıs 2018.

BAP, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, FOTOYAŞLANMA ETKİLERİNİN GİDERİLMESİNDE LAZER TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 20 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2017.

DİĞER, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, BRAF MUTASYONU + MALİGN MELANOM HÜCRE HATLARINDA BRAF İNHİBİTÖR DİRENCİNİN HIF 1 REGULASYONUyla İLİŞKİSİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 06 Nisan 2015, 06 Nisan 2016.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, DERİ TÜMÖRLERİNİN TANISINDA DERMOSKOPIK, ULTRASONOGRAFİK VE HİSTOPATOLOJİK BULGULARIN KARŞILAŞTIRILMASI,, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Celal Bayar Üniversitesi) (Yurt İçi) , 01 Mart 2010, 01 Haziran 2012.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, NÖRODERÖATİDLERDE OPIOİD RESEPTÖRLERİN EKSPRESYONU, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Celal Bayar Üniversitesi) (Yurt İçi) , 01 Mart 2009, 01 Ekim 2011.

KURUMSAL (BAP V.B.), PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, PSORİAZİSLİ HASTA SERUMLARINDA TGF-BETA, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, MMP-9 DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI., Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Celal Bayar Üniversitesi) (Yurt İçi) , 01 Mart 2010, 01 Ekim 2011.

KURUMSAL (BAP V.B.), PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, 1-KAPOSİ SARKOMU, HEMANJİOM VE PYOJENİK GRANÜLOMLARDA BCL-2, BAX VE BCL-X EKSPRESYONU. , Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Celal Bayar Üniversitesi) (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2009, 01 Nisan 2011.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, PSORİAZİSTE NF KAPA –B VE SURVİVİN EKSPRESYONU. CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR PROJESİ,, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Celal Bayar Üniversitesi) (Yurt İçi) , 01 Haziran 2009, 01 Ekim 2010.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

315S021, Malign Melanom Fare Modelinde Anti PD-1 Monoklonal Antikoru ve C Novyi-NT İntamural Uygulamasının Etkinliğinin Değerlendirilmesi, 1001 - Araştırma, Yürütücü, Yürürlükte, SBAG - Sağlık Bi?li?mleri? Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 04.09.2015, 04.09.2015 - Still continues, 15.03.2017 - 15.03.2019.

116E866, Dolaşımdaki Kanseri Hücrelerin (Ctcs) Mekanik Sertlik (Cell Stiffness) Yapısındaki Değişimini Kantitatif Faz Görüntüleme Yöntemi Kullanarak Ölçen Holografik Tek Hücre Görüntüleme Tekniği, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Araştırmacı/Uzman, Yürürlükte, EEEAG - Elektrik, Elektronik, Enformatik?k Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 17.06.2016, 17.06.2016 - Still continues, 15.12.2017 - 15.12.2020.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı

ARDEB/BİDEB 0

TEYDEB 0

Toplam 0

İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı

ARDEB/BİDEB 0

TEYDEB 0

Toplam 0

Raportörlük Sayısı

ARDEB/BİDEB 0

TEYDEB 0

Toplam 0

